

2M11.3399.6

Université de Montréal

Identification et caractérisation des isolats de *Staphylococcus* coagulase négative,  
provenant du lait de vache

par

Mariame Dembélé

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Octobre 2005

© Mariame Dembélé, 2005



SF  
607  
U54  
2006  
V. 024



## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Identification et caractérisation des isolats de *Staphylococcus* coagulase négative,  
provenant du lait de vache

Présenté par:

Mariame Dembélé

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Marie Archambault	Présidente-rapporteuse
Serge Messier	Directeur de recherche
Moussa Sory Diarra	Co-directeur
Jean Philippe Roy	Co-directeur
Madeleine Fortin	Membre du jury

Mémoire accepté le.....

## Résumé

Cette étude fut effectuée sur un total de 300 isolats de *Staphylococcus* coagulase négative, dont 200 provenaient de 395 échantillons de lait prélevés sur des vaches de la Montérégie (Québec) et 100 provenant de 173 échantillons de lait de vache d'Agassiz (Colombie Britannique).

Le but du projet consistait à mettre au point une méthode d'identification rapide et simple des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative (SCN) à partir des échantillons de lait de vache.

L'objectif principal était d'identifier et caractériser des isolats de SCN provenant du lait de vache par trois méthodes d'identification différentes: l'API 20Staph, la chromatographie en phase gazeuse et le séquençage de l'ARN ribosomal 16S.

Les objectifs particuliers de l'étude étaient de comparer les espèces isolées dans les deux différentes régions, de comparer les différentes méthodes d'identification, d'évaluer le degré de similarité entre les résultats obtenus, et proposer un schéma simplifié d'identification des espèces de SCN à partir des échantillons de lait de vache.

Les résultats des analyses ont permis de mettre en évidence la présence de différentes espèces de SCN dans le lait de vache. Les espèces *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. hyicus*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis* et *S. auricularis* furent identifiées dans les deux régions. L'espèce *S. lentus* était absente des échantillons de la Montérégie. *Staphylococcus lugdinensis*, *S. urealyticum* et *S. schleiferi* étaient absentes des échantillons de la Colombie Britannique. La présente étude nous a permis de déterminer l'hétérogénéité des souches de SCN provenant du lait de bovin.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont permis de réaliser que peu d'isolats de SCN présentent de la résistance vis-à-vis des antimicrobiens mais que quelques rares isolats ont présenté de la résistance envers plusieurs antibiotiques.

**Mots-clés:** *Staphylococcus*, coagulase, lait, vache, identification, caractérisation, PCR, API, séquençage, chromatographie.

## Abstract

This study was carried out on a total of 300 isolates of coagulase negative *Staphylococcus* (CNS), 200 of which came from 395 milk samples taken on cows from Montérégie (Québec) and 100 from 173 cow's milk samples of Agassiz (British Columbia).

The goal of this research project was to establish a method for fast and simple identification of CNS species obtained from cow's milk samples.

The objectives of the study were to identify and characterize the CNS isolates from the cow's milk by three different methods: API 20 Staph, gas chromatography and sequencing of the 16S ribosomal RNA. We also compared the species isolated from the two geographical regions, compared the various methods of identification and evaluated differences between the results obtained. This was done in order to propose a simplified diagram of identification of the CNS species.

The results of the analyses enabled us to highlight the presence of several species of CNS in the cow's milk. The species *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. hyicus*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis* and *S. auricularis*, were isolated in the two areas. The species *S. lentus* was absent from samples of the Montérégie. *Staphylococcus lugdinensis*, *S. urealyticum* and *S. schleiferi* were not found in samples from British Columbia. The present study enabled us to determine the heterogeneity of the stocks of CNS of bovine origin.

Antimicrobial sensitivity testing allowed us to realize that few isolates of CNS show antimicrobial resistance but that some isolates were resistant to several antibiotics.

**Key words:** *Staphylococcus*, coagulase, milk, cow, identification, characterization, PCR, API, sequencing, chromatography

## Table des matières

Identification du jury.....	i
Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des signes et abréviations.....	ix
Dédicace.....	xii
Remerciements.....	xiii
Introduction.....	1
Recension de la littérature.....	3
Systématique.....	
Nomenclature.....	
Taxonomie.....	
Généralité sur les staphylocoques.....	
L’habitat naturel des staphylocoques coagulase négative.....	
Incidence de la mammite sur la qualité du lait de vache.....	
Étude de l’implication des espèces de staphylocoque coagulase négative dans des cas de mammite clinique et sub-clinique chez la vache.....	
Gènes et virulence.....	
Sensibilité aux antibiotiques.....	
Mode d’action des antibiotiques.....	
Mécanismes généraux de résistance des bactéries aux antibiotiques.....	
Les types de résistance.....	
Les phénotypes de résistance.....	
Incidence des <i>Staphylococcus</i> coagulase négative chez les humains.....	
Identification par API Staph.....	
La chromatographie en phase gazeuse.....	
Identification par séquençage de l’ARNr 16S des <i>Staphylococcus</i> coagulase négative.....	
Matériels et Méthodes.....	20

Échantillonnage.....	
Culture primaire.....	
Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	
Identification microbiologique des isolats.....	
Identification par chromatographie en phase gazeuse.....	
Identification par séquençage de l'ARNr 16S .....	
Extraction de l'ADN bactérien.....	
Réaction d'amplification en chaîne par la polymérase.....	
Électrophorèse sur gel d'agarose.....	
Révélation de l'ADN sur gel.....	
Purification de l'ADN.....	
Principe.....	
Méthodologie.....	
Séquençage de l'ARN 16S .....	
Résultats.....	28
Résultats des identifications à l'aide des tests classiques de diagnostic bactériologique et de l'API.....	
Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques effectués sur les isolats de SNC provenant de la Montérégie et d'Agassiz.....	
Résultats des identifications par chromatographie en phase gazeuse des isolats de la Montérégie et d'Agassiz.....	
Résultats du séquençage de l'ARNr 16S des isolats.....	
Comparaison des identifications obtenues par API, chromatographie en phase gazeuse et séquençage .....	
Discussion.....	50
Conclusion.....	57
Bibliographie.....	58
Annexes.....	xv



## Liste des tableaux

**Tableau 1.** Répartition sommaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative selon certains caractères phénotypiques

**Tableau 2.** Évaluation des colonies sur gélose au sang après 24 h d'incubation

**Tableau 3.** Programme du thermocycleur

**Tableau 4.** Inventaires des isolats identifiés par API Staph en Montérégie (QC) et à Agassiz (BC)

**Tableau 5.** Répartition, selon les deux régions étudiées, des isolats de *Staphylococcus* coagulase-négative identifiées par chromatographie en phase gazeuse

**Tableau 6.** Répartitions des isolats de *Staphylococcus* coagulase-négative provenant de la Montérégie en fonction du résultat du séquençage de l'ARN 16S (n=50)

**Tableau 7.** Répartitions des isolats de *Staphylococcus* coagulase-négative provenant d'Agassiz en fonction du résultat du séquençage de l'ARN 16S (n=23)

**Tableau 8.** Inventaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative provenant de la Montérégie et d'Agassiz ayant obtenus des résultats d'identification similaires par les trois méthodes étudiées

**Tableau 9.** Inventaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative provenant de la Montérégie et d'Agassiz ayant obtenus des résultats d'identification similaires par API 20 Staph et séquençage

**Tableau 10.** Inventaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative provenant de la Montérégie et d'Agassiz ayant obtenus des résultats d'identification similaires par chromatographie en phase gazeuse et par séquençage

**Tableau 11.** Inventaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative provenant de la Montérégie et d'Agassiz ayant obtenus des résultats d'identification similaires par API 20 Staph. et chromatographie en phase gazeuse

**Tableau 12.** Inventaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative provenant de la Montérégie et d'Agassiz ayant obtenus des résultats d'identification divergents par les trois méthodes étudiées

## Liste des sigles et abréviations

ADH	Arginine dihydrolase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATCC	American Type Culture Collection
ATPases	Adénosine triphosphatase
CB	Colombie Britannique
CC-2	Clindamycine 2 $\mu$ g
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DNase	Désoxyribonucléase
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
E-15	Érythromycine 15 $\mu$ g
EB	Elution buffer
EDTA	Ethylene Diaminetetraacetic acid
ENO-5	Enrofloxacin 5 $\mu$ g
ExhA	Genes encoding exfoliative toxins
F	Forward
Fc	Fragment cristallisable
FRU	D-fructose
G+C %	Guanine plus cytosine pourcent
<i>gse</i>	Gène codant la serine protéase spécifique à CluSE

GluSE	Acide glutamique de <i>Staphylococcus epidermidis</i>
HCl	Acide chlorhydrique
ica	Adhésine intercellulaire
KDa	Kilo Dalton
MDG	Méthyl-D-glucopyranoside
<i>mecA</i>	Gène de résistance à la méthicilline
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
µg	Microgramme
µL	Microlitre
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mM	Millimole
NaCl	Chlorure de sodium
NAG	N-acétyl-glucosamine
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NIT	Nitrate
Novo-R	Novobiocine resistance
OX-1	Oxacilline 1µg
P-10	Pénicilline 10UI
PAI	Adhésine intercellulaire polysaccharidique
P10-NB	Pénicilline/Novobiocine 10U/30µg
PAL	Phosphatase alcaline
PE	Tampon PE

PCR	Réaction d'amplification en chaîne par la polymérase
R	Reverse
SXT	Triméthoprime/sulfaméthoxazole 1.25µg/23.75µg
TAE	Tris acétate EDTA
TE-30	Tétracycline 30µg
TRE	D-tréhalose
Tris HCl	Tris Chlorure de sodium
TSA	Trypticase Soy Agar
UV	Ultra violet
VP	Sodium pyruvate (Voges Proskauer)
Zym	Réactif pour le test Phosphatase alcaline

## Dédicace

Je dédie ce mémoire:

À mon mari Mr. Bary Diakité qui a toujours été un soutien moral infailible pour moi;

À mon grand-père maternel feu Sinaly Fofana (paix à son âme) qui m'a appris que les échecs de la vie ne sont que des petits reculs pour mieux sauter;

À ma mère Djénéba Fofana qui n'est jamais lassée de me prodiguer de sages conseils sur la vie de tous les jours et le rapport entre humains quelque soit la différence;

À ma belle mère qui m'a enseigné un bon sens de la tolérance et du pardon;

À mes enfants, qui sont aujourd'hui ma raison d'être.

## Remerciements

La réalisation de ce projet de recherche a pu avoir lieu grâce à l'aide des personnes et des organismes à qui j'adresse aujourd'hui mes sincères remerciements.

Dr Serge Messier pour sa supervision, son soutien financier au projet, pour la confiance qu'il m'a témoignée, et surtout pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Dr Moussa Sory Diarra pour son encouragement à reprendre le chemin de l'école, son soutien financier, pour ses nombreux conseils, et surtout pour m'avoir accueillie pendant trois mois dans son laboratoire en Colombie Britannique. Sans oublier sa technicienne, Mme Heidi Rampel, qui n'a ménagé aucun effort pour me fournir tous ceux dont j'avais besoin pour le bon déroulement de mes tests.

Dr Jean-Philippe Roy de m'avoir aidé dans l'obtention des échantillons de lait et pour ses conseils lors des comités.

Dr Carl Uhland pour son aide infaillible dans la réalisation des tests de chromatographie en phase gazeuse.

Le Programme Canadien de Bourse de la Francophonie (PCBF) et à travers lui le bailleur de fonds qui a financé ma formation: Agence Canadienne pour le Développement International (ACDI). L'Université de Montréal et tout le corps professoral du GREMIP pour la formation de qualité dont j'ai bénéficiée.

Agriculture et Agro-alimentaire Canada pour m'avoir acceptée dans son Centre de recherches en agroalimentaire du Pacifique d'Agassiz.

*L'University of British Columbia Dairy Education and Research Centre* pour les échantillons de lait de vache.

Les techniciennes du laboratoire de diagnostic bactériologique pour leur aide de tous les jours et du fait qu'elles ont contribué à rendre l'atmosphère de travail agréable dans le laboratoire.

Le personnel du laboratoire de biologie moléculaire du Dre Josée Harel et plus particulièrement Donald Tremblay pour son aide dans la réalisation des tests de PCR et de séquençage.

Manon Salvas du CRRA pour la réalisation des tests de séquençage.

Toute ma famille et ma belle famille qui malgré la grande distance qui nous sépare, ont fait preuve d'un grand soutien moral.



## Introduction

Au Canada, la production annuelle de lait pour l'année 2004 s'élevait à 76,099,219 d'hectolitres dont 28,886,526 provenaient du Québec (Statistique Canada 2005). Cette production répond à une demande d'environ 85 à 90 litres de lait de consommation par personne par an au Canada. Cette importance du lait dans l'alimentation de la population canadienne, nécessite un contrôle strict de qualité de ce produit de première nécessité. Ceci explique la fréquence élevée des contrôles de qualité effectués sur des échantillons de lait provenant des fermes laitières dans différents laboratoires de diagnostic bactériologique. Ce contrôle de qualité a pour objectif de surveiller les cas d'infections des glandes mammaires chez les vaches laitières.

La mammite constitue de nos jours un problème important de santé animale. Elle représente un grand facteur de perte économique pour l'industrie laitière à cause du fait qu'elle entraîne une diminution de la production laitière, une augmentation des coûts de traitement des animaux malades et des pertes supplémentaires de lait en raison des retraits lors des traitements avec des antibiotiques. Elle entraîne l'augmentation de la quantité de cellules somatiques dans le lait et par conséquent, détériore la qualité du lait de vache et le rend impropre à la consommation humaine.

La mammite est un problème d'origine multiple. Les infections d'origines microbiennes sont dues, entre autres, à des bactéries telles que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et autres bactéries à Gram-négatif (Golodetz, 1985; Lohuis et coll., 1990; Pyörälä et coll., 1994 a, b; Kuttila et coll., 2004); à des bactéries à Gram-positif comme *Streptococcus uberis* (Milne et coll., 2005; Denamiel et coll., 2005), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* (Denamiel et coll., 2005), *Staphylococcus aureus* (Diarra et coll., 2002) et staphylocoques coagulase négative, tel que *Staphylococcus equorum*, *S. xylosum*, *S. simulans*, *S. capitis* (Harifaran et coll., 2004). On peut également rencontrer des levures, bâtonnets à Gram-positif, mycoplasmes et algues (NMC, 1999).

Dans les laboratoires de diagnostic bactériologique, il n'est pas rare d'isoler des *Staphylococcus coagulase négative* (SCN) dans des échantillons de lait de vache mais on s'attarde rarement à les identifier jusqu'à l'espèce car les SCN sont généralement considérés comme étant des agents

pathogènes mineurs de la mammite bovine. On les classe parmi les microflores opportunistes de la peau (Devriese and De Keyser, 1980; Boddie et coll., 1987). Cependant, des études récentes indiquent que les SCN sont la cause principale des infections intra mammaires dans les fermes laitières modernes (Smith and Hogan, 2001).

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'identifier et de caractériser des espèces de SCN isolées à partir des échantillons de lait de vache par des méthodes classiques de diagnostic clinique, par chromatographie en phase gazeuse, et par séquençage de l'ARN 16S le but étant de mettre au point une méthode d'identification rapide et simple des espèces de SCN provenant d'échantillons de lait de vache prélevés dans la région de la Montérégie (province de Québec) et dans la ville d'Agassiz (province de la Colombie Britannique).

## Recension de la littérature

Dans un premier temps, nous parlerons de la systématique, de l'habitat naturel et des généralités sur les espèces du genre *Staphylococcus*. Dans un deuxième temps, nous aborderons l'implication des staphylocoques coagulase négative (SCN) dans les infections des glandes mammaires chez la vache et l'incidence de la mammite sur la qualité du lait de vache. Nous parlerons par la suite de la pathogénicité des SCN chez les humains en milieu hospitalier ce qui permettra de souligner d'avantage l'ampleur des problèmes de santé causés par ces espèces bactériennes. Nous terminerons avec une revue des caractéristiques bactériologiques, biochimiques, génétiques et de la structure des acides gras membranaires des SCN en étudiant les tests d'API 20 Staph, la chromatographie en phase gazeuse et le séquençage de l'ARN ribosomal 16S.

### Systématique

### Nomenclature

Les staphylocoques furent découverts pour la première fois en 1878 par Robert Koch, mais c'est en 1880 que Louis Pasteur les cultiva pour la première fois dans un milieu de culture (Davis et coll., 1968). C'est en 1884 que des études menées par Rosenbach permettent de distinguer 2 espèces: *Staphylococcus (pyogenes) doré* et *Staphylococcus (pyogenes) albus* (Davis et coll., 1968). Des staphylocoques non pathogènes furent retrouvés sur la peau des humains en 1900. De 1925 à 1930 Von Daranzy s'attarde à la coagulase et affirme qu'elle est un caractère indicatif de la pathogénicité. En 1960, Baird Parker propose un schéma de classification des *Staphylococcus* spp. et des *Micrococcus* spp. (Baird-Parker, 1963; Baird-Parker, 1965; Giger, 1984)

### Taxonomie

Sur le plan taxonomique, les staphylocoques appartiennent au règne des Protistes, à la classe des Schizomycètes et à l'ordre des Micrococcales. Dans l'édition 1986 du «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» (Kloos et Schleifer, 1986), le genre *Staphylococcus* est classé dans la famille des *Micrococcaceae*. Il est constitué des genres *Micrococcus*, *Stomatococcus*,

*Planococcus* et *Staphylococcus*. Depuis 1976, les premiers résultats d'application des techniques génomiques situent les espèces et les genres décrits dans un contexte d'évolution phylogénique sur la base de l'analyse de la composition de l'ADN (Seifert et coll., 1995). Le contenu en G + C %, l'hybridation ADN/ARNr (Kilpper et coll., 1980), la séquence de l'ARNr 16S (Ludwig et coll., 1981; Bannerman, et coll., 2003) ainsi que les analyses de paroi suggèrent que le genre *Staphylococcus* est proche des genres *Macrococcus*, *Brochotrix*, *Bacillus*, *Gemella*, *Listeria* et *Planococcus* qui font partie du groupe *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* (Ludwig et coll., 1985; Bannerman, et coll., 2003). Le genre *Micrococcus* est lié quant à lui au genre *Arthrobacter* du groupe des bactéries corynéformes. En 1997, une étude des groupes phylogéniques obtenus sur la base d'une analyse des séquences codant pour les ARNr 16S a conduit Stakebrandt et coll. à proposer une modification de la famille des *Micrococcaceae*. Cette famille sera dorénavant constituée des genres *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Nesterenkonia*, *Renibacterium*, *Rothia* et *Stomatococcus* (Bannerman, et coll., 2003).

### Généralité sur les staphylocoques

Les staphylocoques (du grec *staphylé*, grappe de raisin et *kokkos*, grain) sont des coques à Gram positif mesurant 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre, isolés, en diplocoques, en courtes chaînettes ou en amas. Les staphylocoques sont non mobiles, asporulés et habituellement non capsulés (Bisognano, 2001; Bannerman, 2003). Les SCN deviennent visible à l'œil nu en formant des colonies sur des milieux de culture solides appropriés (boîtes gélosées). Les colonies ont des morphologies différentes selon les espèces. Le frottis montre une organisation des cellules parfaitement arrondies regroupées en amas sous forme de grappe de raisin. Les staphylocoques sont des bactéries anaérobies facultatives (exception faite de *Staphylococcus aureus* ssp. *anaerobius* et *Staphylococcus saccharolyticus* qui sont des anaérobies stricts) (Euzéby, 1999). Le pourcentage molaire en G+C est de 30-39% pour les staphylocoques ce qui les différencie des microcoques qui sont non seulement strictement aérobies mais qui ont un pourcentage molaire en G+C de 64-75% (Kloos et Schleifer, 1986).

Le genre *Staphylococcus* comprend actuellement une quarantaine d'espèces et de sous-espèces. Parmi elles, 36 espèces ou sous-espèces ont été décrites comme étant coagulase négative et

peuvent être réparties sommairement selon leur sensibilité à la novobiocine la présence de cytochrome oxydase (Tableau 1) (Euzéby, 1999).

**Tableau 1.** Répartition sommaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative selon certains caractères phénotypiques

<b>Espèce</b>	<b>Coagulase</b>	<b>Novobiocine<sup>a</sup></b>	<b>Oxydase</b>
<i>S. auricularis</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. capitis</i> ssp. <i>capitis</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. capitis</i> ssp. <i>ureolyticus</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. caprae</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. carnosus</i> ssp. <i>carnosus</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. carnosus</i> ssp. <i>utilis</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. chromogenes</i> ,	Négative	Sensible	Négative
<i>S. condimentii</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. epidermidis</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. felis</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. haemolyticus</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. hominis</i> ssp. <i>hominis</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. lugdunensis</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. muscae</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. pasteurii</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. piscifermentan</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. schleiferi</i> ssp. <i>schleiferi</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. simulans</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. warneri</i>	Négative	Sensible	Négative
<i>S. arlettae</i>	Négative	Résistante	Négative
<i>S. cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	Négative	Résistante	Négative
<i>S. cohnii</i> ssp. <i>urealyticum</i>	Négative	Résistante	Négative
<i>S. equorum</i>	Négative	Résistante	Négative
<i>S. gallinarum</i>	Négative	Résistante	Négative
<i>S. hominis</i> ssp. <i>novobiosepticus</i>	Négative	Résistante	Négative
<i>S. kloosii</i>	Négative	Résistante	Négative
<i>S. saprophyticus</i> ssp. <i>bovis</i>	Négative	Résistante	Négative
<i>S. saprophyticus</i> ssp. <i>saprophyticus</i>	Négative	Résistante	Négative
<i>S. succinus</i>	Négative	Résistante	Négative
<i>S. xylosum</i>	Négative	Résistante	Négative
<i>S. lentus</i>	Négative	Résistante	Positive
<i>S. sciuri</i> ssp. <i>carnaticus</i>	Négative	Résistante	Positive
<i>S. sciuri</i> ssp. <i>rodentium</i>	Négative	Résistante	Positive
<i>S. sciuri</i> ssp. <i>sciuri</i>	Négative	Résistante	Positive
<i>S. vitulus</i>	Négative	Résistante	Positive

<sup>a</sup>Sensibilité ou résistance à 5 µg de novobiocine (Euzéby, 1999; Hajek et coll., 1996)

L'espèce *S. caseolyticus* a été récemment reclassée dans un nouveau genre de coques à Gram positif, le genre *Macrococcus*. L'espèce *S. pulvereri* n'est pas une espèce validée et serait identique à *S. vitulinus*. Vingt-quatre espèces ou sous-espèces ont été initialement isolées de divers prélèvements chez l'animal, d'aliments dérivés de produits animaux ou de l'environnement. Cependant, pour six d'entre-elles (*S. intermedius*, *S. caprae*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *S. sciuri* ssp. *carnaticus*, *S. sciuri* ssp. *rodentium*, *S. sciuri* ssp. *sciuri*), des infections humaines ont été rapportées dans la littérature (infections de morsures, endocardites, septicémies, infections osseuses et infections cutanées) (Bannerman, 2003)

### **L'habitat naturel des staphylocoques coagulase négative**

Les staphylocoques se trouvent à l'état naturel sur la peau, les tissus membranaires et les muqueuses des mammifères et des oiseaux (Bannerman, 2003). Elles sont généralement localisées dans la bouche, les glandes mammaires, l'intestin, les voies génitales et urinaires et les voies respiratoires supérieures des hôtes. Ce sont des bactéries qui sont en général inoffensives et vivent en symbiose avec l'organisme de leur hôte (Bannerman, 2003). Cependant, elles peuvent se transformer en agent pathogène lorsque qu'elles se retrouvent dans des tissus endommagés, traversent la barrière cutanée ou lorsqu'elles se fixent sur des implants des patients (Otto, 2004; Gemmell et coll., 1982).

Les espèces de SCN d'origine humaine et d'autres primates sont : *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri*, *S. pasteurii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdinensis*, *S. auricularis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosum* et *S. simulans* (Bannerman, 2003; Kloos, 1986, Kloos et coll., 1991, 1998). Cependant, parmi ces espèces précitées, *S. xylosum*, et *S. simulans* sont constamment transmis aux animaux domestiques et se retrouvent également dans les produits alimentaires d'origine animale.

*Staphylococcus schleiferi* ssp. *schleiferi* et *S. felis*, proviennent des carnivores (Kloos, 1998; Kloos et coll., 1991). Cependant, *S. schleiferi* peut provoquer de sérieuses infections chez l'humain (Fleurette et coll., 1989; Hernandez et coll., 2001; Jean Pierre et coll., 1989). *Staphylococcus hyicus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. lentus* et *S. vitulinus* proviennent des

ongulés et peuvent être isolés à partir de leurs produits alimentaires (Bannerman, 2003), alors que *S. xylosus*, *S. kloosi* et *S. sciuri* proviennent des rongeurs (Kloos, 1998). Ces trois dernières espèces sont également des résidants communs des baleines et des mammifères aquatiques.

D'autre part, certaines espèces de staphylocoques d'origine humaine sont des transiteurs ou des résidants provisoires sur les animaux domestiques. *Staphylococcus schleiferi*, *S. intermedius* et *S. felis* sont retrouvées sur les carnivores. *Staphylococcus lutrae* a été récemment isolé chez des huîtres européennes et des carnivores. D'autres staphylocoques sont associés aux produits alimentaires, dont *S. fleurettii*, *S. condimenti*, *S. piscifermentans* et *S. carnosus* (Bannerman, 2003). Quelques espèces de staphylocoques montrent un tropisme pour certaines parties du corps. Par exemple, *S. capitis* ssp. *capitis* est trouvé en grande partie sur la tête des adultes, particulièrement le cuir chevelu et le front, alors que *S. capitis* ssp. *urealyticus* est également trouvé sur la tête mais beaucoup plus au niveau des aisselles de quelques individus (Bannerman, 2003). *Staphylococcus auricularis* a une préférence pour le conduit auditif externe. *Staphylococcus hominis* et *S. haemolyticus* se retrouvent généralement en plus grande population dans les secteurs de la peau où les glandes apocrines sont nombreuses, comme les aisselles et la région du pubis (Bannerman, 2003). Les staphylocoques résistants à la novobiocine, tel que *S. cohnii* se rencontrent particulièrement sur les pieds des humains. *Staphylococcus saprophyticus* apparaît particulièrement chez les femmes âgées de 10 à 29 ans (Bannerman, 2003).

### **Incidence de la mammite sur la qualité du lait de vache**

Les SCN qui infectent les quartiers des glandes mammaires y restent durant toute la durée de la période de lactation car ils ont la capacité d'échapper au système immunitaire soit par l'adhérence ou par la production de biofilm (Ben Hassen et coll., 2003, Chaffer et coll., 1999).

Les vaches qui souffrent de mammite produisent un lait dont la valeur nutritive et de transformation est diminuée. Le lait provenant des quartiers infectés par des SCN, présente une hausse du nombre de cellules somatiques (Scholl et coll., 2004). L'analyse de la composition leucocytaire révèle une augmentation significative des polynucléaires et une diminution



significative du pourcentage total des lymphocytes (CD4+ et CD8+). Le lait produit par une vache souffrant de mammite est pauvre en caséine, en lactose et en matières grasses alors que la quantité de protéines solubles, d'ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> augmente (Scholl et coll., 2004). En 1999, la mammite clinique était la principale cause d'utilisation des antibiotiques chez la vache laitière et elle était la deuxième cause de réforme au Québec (Scholl et coll., 2004).

### **Étude de l'implication des espèces de SCN dans des cas de mammite clinique et sub-clinique chez la vache.**

Les espèces de SCN étaient considérées comme des agents pathogènes mineurs de la mammite bovine. On les considère comme faisant partie de la microflore opportuniste de la peau (Devriese et De Keyser, 1980; Boddie et coll., 1987). Cependant, des études récentes indiquent que les SCN sont la cause principale des infections intra mammaires dans les fermes laitières modernes (Giannechini et coll., 2002; Soltys et Quinn, 1999; Songlin et Maddox, 2000; Younis et coll., 2003; dos Santos Nascimento et coll., 2005). Les espèces de SCN impliquées dans des cas de mammite sont: *S. epidermidis* (Berghash et coll., 1983; Rajala-Schultz et coll., 2004; Tormo et coll., 2005), *S. hyicus* et *S. simulans* (Honkanen-Buzalski et coll., 1994; Rajala-Schultz et coll., 2004), *S. xylosus* (Tormo et coll., 2005), *S. caprae*, *S. warneri*, *S. hominis* et *S. chromogenes* (Rajala-Schultz et coll., 2004; Chaffer et coll., 1999) *S. haemolyticus* (Chaffer et coll., 1999), *S. sciuri* (Euzéby, 1999).

Les SCN étant des commensaux des mammifères (humains) et des oiseaux (Bannerman, 2003) peuvent se trouver facilement dans l'environnement. L'animal se trouve donc exposé à cette bactérie constamment présente dans son milieu de vie. Le pis est un milieu propice pour la prolifération des bactéries. Les infections mammaires à staphylocoque ont parfois un caractère persistant (Almeida et Oliver, 2001). Ce caractère persistant est dû au fait que les SCN ont une très grande capacité d'adhésion aux cellules épithéliales des glandes mammaire. L'adhérence des staphylocoques aux cellules épithéliales des glandes mammaires est facilitée par l'hydrophobicité des capsules de surface de certaines souches (Almeida et Oliver., 2001). L'entrée des SCN à l'intérieur des cellules épithéliale commence par une première scène de colonisation qui induit une endocytose (Otto, 2004). Il y a deux types d'endocytose.

Premièrement, il y a induction d'un mécanisme éclair de contact entre les ligands et les récepteurs et progressivement il y a un encerclement et un englobement du microorganisme par la cellule hôte (Almeida et Oliver, 2001). La deuxième possibilité est que la bactérie envoie un signal à la cellule hôte. Ceci engendre un réarrangement des éléments du cytosquelette, particulièrement le F-actine et les microfilaments, avec changement de la structure du cytosquelette des cellules épithéliales et un englobement de la bactérie dans une vacuole membranaire (Otto, 2004). Le caractère persistant des infections à staphylocoque est dû aussi à la production des exopolysaccharides appelé biofilm (Ben Hassen et coll., 2003). La production de biofilm permet aux SCN d'adhérer aux cellules épithéliales des glandes mammaires, d'échapper au système immunitaire de l'hôte et à l'action des antimicrobiens (Almeida et Oliver, 2001; Bannerman, 2003).

### **Gènes et virulence**

Les SCN produisent plusieurs toxines et enzymes. Les souches productrices d'hémolysine, de leucocidine, de lipase, de protéase et de DNase sont les plus virulentes (Hebert et Hancock, 1985; Scheifele et coll., 1987; Watts et Owens, 1987). Beaucoup de souches de SCN isolées à partir des cas de mammite présentent une haute activité de protéase, de DNase et de lecitinase comparativement aux souches isolées à partir de vaches saines (Karadzhov et coll., 1981). Le rôle de plusieurs enzymes dans la pathogénie des SCN n'est pas connu.

*Staphylococcus chromogenes* a une très grande prévalence dans la mammite sub-clinique chez la vache (Devriese et coll., 2002; Euzéby, 1999). Les cultures de *S. chromogenes* se caractérisent par la présence d'hémolyse et les résultats des tests de DNase sont intermédiaires (Devriese et coll. 2002). Les surnageants de culture de *S. chromogenes*, possèdent un effet cytotoxique réversible sur les cellules HEp-2, CHO-K1, Int 407 et Y-1. Cette cytotoxicité semble due à des métalloprotéases de 34-36 kDa qui joueraient un rôle dans la pathogénie des mammites (Songlin et Maddox, 2000). Certaines souches de *S. chromogenes* ont des gènes codant pour des surfaces cellulaires hydrophiles qui pourraient être liés à un facteur de pathogénicité (Birgersson et coll., 1992).

*Staphylococcus epidermidis* se différencie des autres espèces de SCN par la présence du gène *gseA* codant la sérine protéase spécifique à l'acide glutamique, GluSE (Ikeda et coll., 2004). Les souches de *S. epidermidis* contenant les gènes *icaA* et *icaD* sont capables de produire du biofilm ce qui les rend responsables de la colonisation des biomatériaux (Arciola et coll., 2001). Certaines souches de *S. epidermidis* produisent la «Delta-Like toxin» qui est cytotoxique et est souvent impliquée dans des cas d'entérocolite nécrotique néonatale chez les nouveaux nés (Scheifele et coll., 1987). L'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PAI) fut isolée à partir des souches de *S. epidermidis* provenant des patients avec une faible résistance immunitaire. Ce gène permet à la bactérie de croître dans une forte concentration de NaCl, il favorise la formation des biofilms et confère à la bactérie une bonne résistance aux antimicrobiens (Vuong et coll., 2004).

Certaines souches de *S. xylosus* sont encapsulées, ce qui peut être lié à un facteur de pathogénicité (Birgersson et coll., 1992).

Environ 80% des souches de *S. hyicus* isolées du porc possèdent une protéine comparable à la protéine A de *S. aureus*. Cette protéine est capable de lier le fragment Fc des immunoglobulines G et de s'opposer au rôle opsonisant de ces immunoglobulines. Les souches d'origine bovine ou d'origine aviaire sont dépourvues de protéine A. Les souches d'origine porcine et notamment les souches isolées de lésions (environ 51%) produisent une staphylokinase. La staphylokinase se lie au plasminogène et le convertit en plasmine. Par son action fibrinolytique la plasmine jouerait un rôle dans la dissémination des souches et par son action protéolytique elle permettrait aux souches de *S. hyicus* d'obtenir des acides aminés utiles à sa croissance. *Staphylococcus hyicus* excrète une lipase, unique au sein du monde bactérien car elle a une activité enzymatique sur les lipides et sur les phospholipides. L'importance de cette enzyme dans la pathogénie des infections est encore mal connue. La lipase pourrait permettre la persistance de la bactérie sur la peau en s'opposant à la phagocytose. Cette espèce synthétise également deux métalloprotéases, ShpI et ShpII. (Andresen, 2005). Leurs rôles dans la pathogénicité de cette bactérie sont incertains, mais elles pourraient être responsables d'une cytotoxicité. La protéase ShpII est également nécessaire à la maturation extracellulaire de la lipase qui est excrétée sous la forme d'une pro-lipase. Les souches isolées du porc produisent des exfoliatines, d'un poids moléculaire de 27-30 kDa, appelées ExhA, ExhB et ExhC (Ahrens and Andresen, 2004). La toxine ExhA serait une

métalloprotéine à zinc et la toxine ExhB une métalloprotéine à cuivre ou à cobalt (Andresen, 1998).

### **Sensibilité aux antibiotiques**

La résistance à la méthicilline des souches de staphylocoques d'origine animale a été mise en évidence dès 1972 pour *S. aureus* ssp. *aureus* mais peu de publications font état d'une telle résistance chez les SCN. Toutefois une souche de *S. auricularis* et 7 souches de *S. sciuri* résistantes à la méthicilline (Perrin-Couilloud et coll., 1991) ont été isolées de bovins atteints de mammite. Ultérieurement, on a isolé de la peau et des voies respiratoires supérieures de poulets, 37 souches de *S. sciuri*, 5 souches de *S. epidermidis* et 3 souches de *S. saprophyticus* résistantes à la méthicilline (Euzéby, 1999).

La plupart des souches de *S. chromogenes* sont sensibles à la pénicilline, à l'érythromycine et à la tétracycline. Certaines souches sont sensibles à la néomycine, à la gentamicine, à l'érythromycine, à l'enrofloxacin et aux céphalosporines. Certaines souches sont résistantes à la lincomycine et portent le gène *linA*. (Devriese et coll., 2002).

Toutes les souches de *S. epidermidis* sont résistantes au lysozyme et à la streptomycine, mais moins résistantes à la lysostaphine (dos Santos Nascimento et coll., 2005).

Toutes les souches de *S. xylosus* sont sensibles à la pénicilline et à la streptomycine. Environ 80% des souches sont sensibles à l'érythromycine et à la tétracycline et 70% des souches sont résistantes à la novobiocine (5 µg/mL) (dos Santos Nascimento et coll., 2005).

Toutes les souches de *S. saprophyticus* ssp. *bovis* sont sensibles à la pénicilline, à la tétracycline et à la lysostaphine, mais sont résistantes au lysozyme (dos Santos Nascimento et coll., 2005).

Toutes les souches de *S. simulans* sont sensibles à la lysostaphine (CMI=12,5-25 µg/mL) et à la streptomycine (1,6-3,1 µg/m); 54% des souches sont sensibles à la pénicilline G (0,012 µg/mL) et 77% à l'érythromycine 0,4-0,8 µg/mL mais elles sont toutes résistantes au lysozyme (dos Santos Nascimento et coll., 2005).

Toutes les souches de *S. warneri* sont sensibles à l'érythromycine (0,4-1,6 µg/mL) et à la tétracycline (0,4-0,8 µg/mL) et 98% des souches sont sensibles ou peu résistantes à la

streptomycine (6,2-25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) alors que 78% des souches sont sensibles à la pénicilline G (0,012-0,025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Toutes les souches sont résistantes au lysozyme et faiblement résistantes à la lysostaphine (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (dos Santos Nascimento et coll., 2005)

### **Mode d'action des antibiotiques**

Les antibiotiques se répartissent en quatre grandes catégories selon leur mode d'action:

- ceux qui inhibent la synthèse de la paroi des bactéries (pénicilline, carbapénèmes, céphalosporines, bacitracine, vancomycine, teicoplanine, etc.) (Bisognano, 2001);
- ceux qui inhibent la synthèse des protéines bactériennes au niveau ribosomal ou des ARN de transferts (chloramphénicol, tétracycline, érythromycine, streptomycine, gentamicine, tobramycine);
- ceux qui ont pour cible l'ADN ou sa réplication via les topoisomérases de type II (fluoroquinolones);
- les inhibiteurs du métabolisme intermédiaire (sulfamidés et triméthoprime)

### **Mécanismes généraux de résistance des bactéries aux antibiotiques**

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour contrecarrer l'action des antibiotiques. Quatre mécanismes de résistance sont connus (Bisognano, 2001):

- Production d'enzymes (e.g.  $\beta$ -lactamase) capables d'hydrolyser les composés  $\beta$ -lactamines ou de modifier les aminoglycosides (par transfert de divers groupes chimiques) ce qui inactive les antibiotiques et les rend inoffensifs vis à vis de leur cible ( $\beta$ -lactamines, aminosides, chloramphénicol, fosfomycine, macrolides, lincosamides, streptogramines, nitroimidazoles)

-Modification de la perméabilité, bloquant ainsi l'influx des antimicrobiens et empêchant l'accès de l'antibiotique à sa cible (changement des pores dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif) (e.g. tétracycline, macrolides, quinolones) (Bisognano, 2001)

-Augmentation de l'efflux des antibiotiques par des pompes à efflux, (e.g. acide fusidique, streptomycine, tétracyclines, fluoroquinolones, etc.) ou antiseptiques (ammoniums quaternaires, etc.) (Bisognano, 2001)

-Substitution ou modification des cibles des antibiotiques (e.g. fluoroquinolones, méthicilline, sulfamides, triméthoprime, glycopeptides)

### **Les types de résistance**

Il existe chez les bactéries deux types de résistance. La résistance naturelle est programmée sur le génome bactérien, donc fixe et constante à l'intérieur du taxon. À ce titre, elle constitue un critère d'identification. Cette résistance est connue dès la découverte d'un antibiotique.

La résistance acquise est consécutive à une mutation ou à l'acquisition d'un déterminant génétique comme un plasmide, un phage un transposon ou un intégron. Elle constitue un marqueur épidémiologique car varie dans le temps et dans l'espace et ne concerne que quelques souches d'une même espèce.

### **Les phénotypes de résistance**

On détermine le phénotype de résistance d'une souche en étudiant sa sensibilité à plusieurs antibiotiques. Si la souche n'exprime que des résistances naturelles, on dit qu'elle appartient au phénotype sauvage ou sensible. C'est le cas de certaines espèces de *Staphylococcus* coagulase négative telles que: *S. saprophyticus* ssp. *bovis*, *S. xylosus*, *S. cohnii* ssp. *cohnii* qui ont comme une de leurs caractéristiques phénotypique la résistance à la novobiocine (Hajek et coll., 1996).

Si des résistances acquises ont modifié sa sensibilité aux antibiotiques, l'isolat exprime un phénotype de résistance qu'on peut identifier et dont on peut tenter de déterminer le mécanisme. Ces phénotypes sont souvent désignés par les initiales des antibiotiques devenus inactifs. C'est le cas de *S. aureus* qui a développé une résistance envers la pénicilline dès 1942, seulement une année après l'introduction de cette molécule d'antibiotique en thérapeutique et ensuite contre les anti-staphylocoques de la famille de la méthicilline (flucloxacilline, oxacilline). Les souches de staphylocoque doré ayant présenté une résistance à la méthicilline constituent le groupe des MRSA (Méthicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) (Pittet et coll., 2000).

### **Incidence des *Staphylococcus* coagulase négative chez les humains**

Les souches de SCN les plus impliquées dans des cas d'infections nosocomiales chez les humains sont : *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. simulans*, *S. xylosus* et *S. saprophyticus* (Oren et coll., 1990), *S. epidermidis* (Wieser et coll., 2000; Kloos et Wolfshohl, 1982; Marisk et Brake, 1982; Sewell et coll., 1982; Jordan et coll., 1980). Elles sont isolées à partir des hémocultures dans des cas de bactériémie (Melvin et coll., 1998) de même que de cas de péritonite et d'infections urinaires (Gatermann et coll., 1994; Gemmell et coll., 1982). Elles sont impliquées dans la colonisation d'implants chez des patients souffrant d'endocardite (Ikeda, 2004), ainsi que de cathéters et appareil de drainage du liquide céphalorachidien (Gemmell et coll., 1982).

### **Identification par API Staph.**

La galerie API Staph est de plus en plus utilisée de nos jours pour l'identification phénotypique des bactéries du genre *Staphylococcus* (Heikens et coll., 2005). L'API 20 Staph associe des tests conventionnels et des tests de fermentation constituant les tests de référence pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria*. Il est composé de tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. La galerie API 20 Staph comporte 20 cupules contenant des substrats déshydratés. Les tests composant la galerie sont les tests d'acidification du D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-maltose, D-lactose, D-tréhalose, D-mannitol, xylitol,

D-mélibiose, D-raffinose, D-xylose, D-saccharose, méthyl-D-glucopyranoside, N-acétylglucosamine, la réduction des nitrates en nitrites, la phosphatase alcaline, la production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer), la production d'arginine dihydrolase et d'uréase. Après la lecture des réactions, l'identification se fait à l'aide du catalogue analytique ou la consultation du site web ([www.apiweb](http://www.apiweb)).

Une étude menée par Heikens et coll. (2005) et portant sur la comparaison des méthodes d'identification phénotypiques et génotypiques d'identification des espèces de staphylocoques, a permis de démontrer une nette supériorité de la méthode d'API sur le système de microbiologie automatisée BD (Becton Dickinson). Mais, comparativement au séquençage de l'ARN 16S, l'API s'est avéré moins efficace (Heikens et coll., 2005).

Une étude portant sur la comparaison de 4 méthodes, à savoir, la méthode de référence (méthodes conventionnelles), proposée par Kloos et Schleifer (1986) et modifié par Bannerman (2003), le système API Staph (bioMérieux) et deux méthodes modifiées de la méthode de référence (la méthode simplifiée et la méthode de disque) fut menée par Cunha et coll. (2004). Les résultats de cette étude ont montré que l'identification de certaines espèces de SCN telles que *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* et *S. warneri* à l'aide des galeries API Staph est un peu moins précise. Toutefois, selon Piccolomini et coll. (1994) ce faible écart entre les résultats du système API Staph et les méthodes biochimiques traditionnelles peut être expliqué par l'utilisation de différents temps d'incubation, de concentrations en substrat et/ou de marqueurs de sensibilité.

### **La chromatographie en phase gazeuse**

En chromatographie, les constituants d'un mélange se partagent entre deux phases: une phase mobile et une phase stationnaire. Ceci explique le mécanisme de la séparation chromatographique. Ce phénomène est dynamique. Les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre; ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier. La chromatographie en phase gazeuse est utilisée pour analyser les acides gras membranaires des bactéries. Les espèces du genre *Staphylococcus* diffèrent des



autres bactéries à Gram positif à cause du fait qu'elles sont capables de synthétiser le C20:0 et le C18:0 sur les branches iso et anté-iso des acides gras (Freney et coll., 1991; Minnikin et coll., 1977; Freney et coll., 1999). La chromatographie en phase gazeuse est utilisée depuis 1962, pour faire une analyse de la composition chimique des bactéries afin de pouvoir les identifier (Abel et coll., 1962, Welch, 1991). Elle permet de définir la composition des lipides cellulaires et la longueur des chaînes de carbone qui varie de 9 à 20 atomes. Les acides gras des bactéries sont majoritairement localisés dans les membranes sous forme de glycolipides et de phospholipides. Les acides gras entrent dans la composition des lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif et de l'acide lipothéichoïque chez les bactéries à Gram positif. *Staphylococcus aureus* et les SCN ont une composition qualitative assez similaire en acide gras (Durham et Kloos, 1978; Kottilainen et coll., 1991; O'Donnell et coll., 1985). Les acides gras des staphylocoques contiennent des branches de chaîne iso C15:0, anté-iso C15:0, anté-iso C17:0, C18:0 et de C20:0. À partir de la composition des acides gras, on peut distinguer les *Staphylococcus* des *Micrococcus*. Ces derniers contiennent le iso C19:0, l'anté-iso C19:0 et le C20:0. Ils contiennent rarement le C15:0 (Durham et Kloos, 1978). Une étude menée par Sincoway et coll. en 1981, portant sur 61 souches de SCN provenant du lait de vache et appartenant à 9 espèces différentes, et 19 souches de référence de *S. aureus* et *S. epidermidis*, a montré qu'elles contenaient des formes de chaîne de carbone iso-C15:0, anté-iso C15:0, C18:0 et le C20:0 dans leur acide gras, ce qui ne présente pas de différence marquante avec la composition des acides gras des autres espèces de staphylocoque. Quand on observe le pourcentage d'acides gras contenu chez chaque espèce en quantité et qu'on fait une analyse de variabilité par la méthode de configuration unitaire, on se rend compte que *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, et *S. xylosus* ne présentent qu'une légère différence avec les autres espèces. En se basant sur le contenu en iso C15:0 et en anté-iso C15:0, un regroupement des souches analysées a pu être fait (Sincoway et coll., 1981). Un premier qui contient iso C15:0 était composé des espèces *S. hyicus* et *S. lentus*; le deuxième groupe qui contient le anté-iso C15:0 était composé des espèces *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, et *S. warneri* et les espèces *S. aureus*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. xylosus* sont dans les deux groupes.

Toutes les souches de staphylocoque contiennent iso C15:0, anté-iso C15:0, C18:0 et C20:0 (Sincoway et coll., 1981). Cependant, quelques espèces se distinguent par la présence de

certaines composés. Par exemple, *S. warneri* se caractérise par la présence de C:22 et *S. saprophyticus* par la présence de C16:0 et C20:0.

L'analyse par chromatographie d'un composé aboutit à l'obtention d'un chromatogramme. C'est un diagramme à deux dimensions montrant l'évolution en fonction du temps d'un paramètre qui dépend de la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne. Le temps d'élution est en abscisse et le signal du détecteur en ordonnée. La séparation produite par la colonne conduit à une série de pics plus ou moins isolés les uns des autres.

L'analyse des acides gras cellulaires, a suscité peu d'attention comme méthode d'identification et cela, en raison de la nécessité de normaliser des substrats et des états de croissance pour obtenir des résultats reproductibles. Kotilainen et coll. (1991) ont trouvé l'analyse des acides gras comparable à la norme (Kloos et coll., 1994).

#### **Identification par séquençage de l'ARNr 16S des *Staphylococcus coagulase négative***

Le ribosome est un organe cytoplasmique universel impliqué dans la traduction des ARN messager (ARNm) en protéines. Il est responsable de l'assemblage des acides aminés que lui délivrent les ARN de transfert (ARNt) en protéines. Il est composé de trois ARN ribosomal (ARNr) de taille différente (5S, 16S, 23S) autour de son site actif et porte plusieurs dizaines de protéines ribosomales en périphérie (Drancourt, 1998).

L'ARNr est un des deux constituants des ribosomes. C'est une séquence d'acide nucléique linéaire, simple brin (monocaténaire). Il s'agit d'une molécule fonctionnelle mais non traduite et impliquée dans la traduction. Parmi les trois ARNr présents autour du site actif du ribosome, l'ARNr 16S est le plus étudié car il contient plus d'information génétique que le 5S et est plus facile à déchiffrer que le 23S (Drancourt, 1998).

L'ARNr 16S existe chez toutes les espèces bactériennes. Il est encodé par un gène chromosomique d'une taille de 1,500 paires de base. On l'appelle le gène universel. On l'utilise pour l'identification moléculaire des bactéries car sa séquence est spécifique à chaque espèce et les extrémités 5' et 3' des 15 premières et 15 dernières bases sont conservées dans toutes les espèces bactériennes (Drancourt, 1998).

Pour faire le séquençage, il faut obligatoirement procéder à l'amplification de l'ADN bactérien par une réaction en chaîne à l'aide de la polymérase. La réaction permet d'amplifier, *in vitro*, des

séquences génétiques par utilisation d'ADN polymérase et d'amorces nucléotidiques spécifiques. Elle repose sur la répétition de trois processus: la dénaturation des deux brins d'ADN à température élevée (environ 95°C) afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares, l'hybridation d'oligonucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible (à la température 40°-65°C ce qui permet la fixation des amorces sur chaque brin séparé) et la réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (la Taq polymérase) à partir des oligonucléotides, réalisée à la température optimale de 72°C. Les produits de ce premier cycle sont ensuite dénaturés par la chaleur. Les amorces sont à nouveau hybridées avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à la polymérase. À chaque cycle, le nombre de copies du fragment d'ADN double.

La réaction d'amplification en chaîne est utilisée avec des espèces de *Staphylococcus* pour l'identification des gènes de virulence, d'adhésion ou de résistance aux différents antimicrobiens. Elle est peu utilisée actuellement pour l'identification des espèces de SCN à partir des échantillons. Cette rareté s'explique par le fait qu'il y a peu d'amorces spécifiques élaborées qui permettront d'identifier chaque espèce de SCN. Une étude menée par Ikeda et coll. (2004) a permis de mettre en évidence la présence du gène *gseA* codant pour une sérine protéase spécifique à l'acide glutamique, GluSE, chez l'espèce *S. epidermidis*. Ce gène pourrait être utilisé pour l'identification de cette espèce par PCR.

L'utilisation de la méthode d'identification par PCR donne la possibilité intéressante de fournir aux cliniciens une identification des agents infectieux assez tôt pour influencer les décisions au sujet du diagnostic et du traitement initial de l'animal duquel le spécimen a été pris.

Une étude menée par Heikens et coll. (2005) montre que l'ordre dans lequel est donné les séquences des gènes de l'ARNr 16S de certaines espèces de *Staphylococcus* souffre d'un manque de haute qualité. En effet, l'ordre des séquences déposées dans GenBank serait inexactement assigné aux diverses espèces de staphylocoque. Ces auteurs trouvent que c'est ce qui rend l'identification de certaines espèces de SCN moins exacte.

## **Matériels et méthodes**

### **Échantillonnage**

Nous avons utilisé deux groupes d'échantillons de lait de vache. Un premier groupe composé d'échantillons de lait de vache provenant de la région de St-Hyacinthe (province de Québec) de fermes faisant partie de la clientèle de la clinique ambulatoire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Parmi ces échantillons, 39 furent reçus au Laboratoire de bactériologie clinique de la FMV et 356 échantillons avaient servi à un projet de recherche antérieur qui portait sur l'évaluation de l'efficacité d'un traitement antibiotique intra mammaire pré-vêlage de chlorhydrate de pirlimycine (Roy, 2004).

Un deuxième groupe composé d'échantillons de lait de vache provenant de fermes laitières de la Colombie Britannique. La majeure partie de ces échantillons provient de la ferme laitière de la «University of British Columbia». Cette ferme est affiliée au Centre de recherche en agriculture et agro-alimentaire du Canada basé à Agassiz (B.C.). Les échantillons provenaient de quartiers individuels de vaches en lactation.

### **Culture primaire**

Les échantillons de lait ont étéensemencés sur gélose Trypticase Soy Agar (TSA) (Difco, Détroit, MI, USA) supplémentée avec 5% de sang de mouton à l'aide d'un écouvillon stérile et épuisés à l'aide d'une anse de platine. Les géloses étaient ensuite incubées à 35°C pendant 18-24 h. Après incubation des boîtes gélosées, les colonies étaient classées selon leur nature morphologique (couleur, dimension, présence ou non d'hémolyse) et notées selon l'abondance de croissance (Tableau 3). Toutes les colonies en quantité supérieure ou égale à 1+ (5 colonies et plus dans le premier quadrant) étaient repiquées sur gélose TSA sang et incubées à 35°C pendant 18-24 h.

**Tableau 2.** Évaluation des colonies sur gélose au sang après 24 heures d'incubation

Colonies	Nombre de colonies	Évaluation
1 <sup>er</sup> Quadrant	Supérieur ou égale à 5	+
2 <sup>e</sup> Quadrant	Supérieur ou égale à 5	++
3 <sup>e</sup> Quadrant	Supérieur ou égale à 5	+++
4 <sup>e</sup> Quadrant	Supérieur ou égale à 5	++++

### Tests de sensibilité aux antibiotiques

Un total de 73 isolats ont été testés pour connaître leur degré de sensibilité vis à vis 8 antibiotiques. La méthode de diffusion en gélose effectuée selon les recommandations du NCCLS était employée (NCCLS, 2002). Les isolats furent ensemencés sur milieu gélosé TSA + 5% de sang de mouton et incubé à 35°C pendant 24 heures. L'inoculum était préparé en ajoutant une portion de cette culture pure de bactéries dans un tube contenant de la saline afin d'obtenir une concentration bactérienne équivalente à un standard Mc Farland de 0.5. Le milieu utilisé pour l'antibiogramme est le Mueller Hinton. Une fois la gélose ensemencée, les disques d'antibiotique étaient aussitôt placés sur chaque gélose et les plaques étaient incubées à 35°C pendant 18 à 20 heures. Les disques d'antibiotiques testés étaient les suivants: clindamycine 2 µg, érythromycine 15 µg, oxacilline 1 µg, enrofloxacin 5 µg, tétracycline 30 µg, pénicilline G 10 UI, combinaison pénicilline/novobiocine 10 UI/30 µg, triméthoprim/sulfaméthoxazole 1,25 µg/23,75 µg. La lecture des diamètres d'inhibition a permis l'interprétation en catégorie: sensible, intermédiaire et résistant selon les recommandations du NCCLS.

### Identification microbiologique des isolats

Les isolats à identifier étaient dans un premier temps soumis à l'examen d'un frottis après coloration de Gram (méthode modifiée par Reed). Les frottis étaient examinés au microscope à un grossissement de 1000X.

Les colonies correspondant à des coques à Gram positif étaient vérifiées pour leur capacité à produire l'enzyme catalase. Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques

car sauf pour *Staphylococcus aureus* ssp. *anaerobius* et *Staphylococcus saccharolyticus* toutes les autres espèces de staphylocoque produisent cet enzyme (Kloos et Schleifer 1976a; Schleifer, 1986). Le test consiste à prélever une portion de colonie pure à tester et à la déposer sur une lame pour ensuite y ajouter une goutte de la solution de peroxyde d'hydrogène à 3%. La production de bulles de gaz indique un test positif. Dans le cadre du projet actuel, seuls les coques à Gram positif catalase positive ont été identifiés.

Les isolats soupçonnés d'appartenir au genre *Staphylococcus* ont subi un test de coagulase. Ce test permet de distinguer deux groupes d'espèces de *Staphylococcus*. Les espèces à coagulase positive et celles à coagulase négative. Les tubes contenant 0,5 ml de plasma de lapin (Remel, Lenexa, KS, USA) sont inoculés avec une ansée de la culture pure de bactéries à tester. Le tube est mis en incubation à 35°C pendant 4 à 24 heures. La formation d'une masse gélatineuse au fond du tube est considérée comme un résultat positif.

Les isolats à identifier ont également été vérifiés pour leur capacité à produire une désoxyribonucléase capable de dépolymériser l'ADN incorporé dans le milieu de culture gélose DNase (Difco). Le test consiste à faire une strie de culture pure de bactéries sur le milieu de culture à l'aide d'un fil. On incube le milieuensemencé à une température de 35°C pendant 24 heures. L'apparition d'une zone transparente autour des colonies et ayant au moins 3 fois la taille de la strie inoculée est considérée comme un résultat positif. Une strie de *S. aureus* est faite sur le même milieu comme témoin positif.

L'identification biochimique des isolats était complétée à l'aide d'une galerie API 20 Staph (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) et son test complémentaire, la résistance à la lysostaphine effectué selon les recommandations du fabricant (Remel). Les SCN sont généralement sensibles à la lysostaphine. Le profil numérique obtenu était entré dans la base de données pour obtenir l'identification bactérienne.

### **Identification par chromatographie en phase gazeuse**

Le test comporte 3 étapes. L'extraction des acides gras à partir de cultures pures de bactérie, l'analyse des échantillons par l'appareil à chromatographie et l'obtention d'un résultat à partir d'un logiciel informatique.

Environ 40 mg de culture pure de bactérie cultivée sur une gélose TSA + 5% de sang de mouton sont prélevés et mis dans un tube en verre. On ajoute 1,0 mL du réactif N° 1 (15 g NaOH + 50 mL H<sub>2</sub>O + 50 mL de méthanol) dans le tube et on fait tourner à l'aide d'un vortex pendant 5-10 secondes. Les tubes sont alors mis dans le bain-marie à 100°C pendant 5 minutes. Ce temps écoulé, on les fait tourner une seconde fois à l'aide d'un vortex pendant 5-10 secondes et ils sont remis dans le bain-marie à 100°C pendant 25 min. Cette phase se termine par un refroidissement rapide effectué en plongeant le support avec les tubes dans de l'eau froide. Par la suite, on ajoute dans chaque tube, 2,0 mL du réactif N° 2 (230 mL méthanol + 270 mL HCl 6 N) et on les fait tourner à l'aide d'un vortex pendant 5-10 sec. Les tubes sont mis dans le bain-marie à 80°C pendant 10 minutes et sont plongés par la suite dans de l'eau froide.

Après refroidissement, on ajoute 1,25 mL du réactif N° 3 (100 mL d'hexane + 100 mL de méthyl-butyl éther) dans chaque tube. Les tubes sont bien fermés et soumis à un brassage pendant 10 minutes. Il y a séparation du liquide en deux phases. Le liquide se trouvant au fond du tube est aspiré et jeté, alors que le liquide surnageant est récupéré. On ajoute au liquide surnageant 3 mL du réactif N° 4 (1,2 g NaOH + 100 mL d'eau) et les tubes sont soumis de nouveau à un brassage pendant 5 minutes. On ajoute quelques gouttes d'une solution saturée de NaCl dans les tubes où le liquide surnageant n'est pas limpide. On prélève le liquide surnageant qu'on met dans des petits tubes pour analyser.

Tel que spécifié par le manufacturier, comme témoin positif on procède à l'extraction des acides gras de la souche de *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637. Un tube témoin négatif est préparé avec tous les réactifs mais sans les bactéries ce qui nous permettra de vérifier les cas de contamination du matériel utilisé. Un autre tube ne contenant que le liquide de calibration est examiné.

Les extraits contenant les acides gras sont mis dans des bouteilles qui sont scellées à l'aide de bouchons hermétiques. Les extraits étaient conservés à - 20°C jusqu'au moment d'être analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Sherlock version 3.00, MIDI Inc., Newark, DE, USA). Pour l'identification, les profils obtenus étaient comparés à ceux contenus dans la base de données du système.

### **Identification par séquençage de l'ARNr 16S**

Nous avons procédé à une identification génétique de 73 de nos isolats de SCN, 50 provenant de l'échantillonnage de St-Hyacinthe et 23 de celui de la Colombie Britannique. La sélection des isolats a été faite pour avoir une représentativité des différentes espèces rencontrées et pour tenir compte du nombre d'isolats obtenus dans chacune des deux régions.

### **Extraction de l'ADN bactérien**

Afin d'avoir accès au matériel génétique des bactéries, nous avons utilisé la méthode de lyse par choc thermique (Rossero et al., 1999). La procédure consistait à mettre 100  $\mu$ L d'eau stérile dans un tube et d'y ajouter une quantité suffisante de bactéries pour obtenir une turbidité.

Le mélange fut passé au vortex et bouillit pendant 30 minutes. Le mélange est centrifugé à 13 000 tours par minute pendant 3 minutes. Le liquide surnageant contenant les acides nucléiques est récupéré pour être ajouté au mélange de PCR.

### **Réaction d'amplification en chaîne par la polymérase**

Des tubes sont préparés par ajout de 5  $\mu$ L de d.N.T.P, 2,5  $\mu$ L de l'amorces sens (F) (pour séquence voir annexe), 2,5  $\mu$ L de l'amorces anti-sens (R) (pour séquence voir annexe), 0,5  $\mu$ L de l'enzyme Taq polymérase- 29, 5  $\mu$ L d'eau et 5  $\mu$ L de tampon 10 X (50 mM Tris HCl, 10mM  $MgCl_2$ , 100mM NaCl, pH 7.5). On obtient un volume total de 45  $\mu$ L auquel on ajoute dans chaque tube identifié 5  $\mu$ L de l'ADN d'un seul isolat.

Les tubes de PCR sont ensuite placés dans le thermocycleur (Touchgene gradient DNA thermal cyclor, Techne Krackeler Scientific, Albany, NY, USA). Pour l'amplification, nous avons adopté un programme bien précis (Tableau 4). L'amplification fut effectuée à 45 cycles et chaque cycle comportait une étape de dénaturation, d'hybridation et d'élongation.



**Tableau 3. Programme du thermocycleur**

Cycle (n=45)	Température en °C	Durée en Sec.
Dénaturation	95	30
Hybridation	55	30
Élongation	72	30

### Électrophorèse sur gel d'agarose

Un gel d'agarose 3% est préparé dans 100 mL de tampon TAE (Tris 24,2 g, EDTA 370 mg, acétate de sodium anhydre 8,2 g, pH 8.2). Le gel est placé dans la cuve à électrophorèse. On remplit la cuve avec le tampon TAE jusqu'à ce que le gel soit recouvert de quelques mm de tampon. On prélève 10 µL de chaque échantillon qu'on mélange à une goutte de bleu de bromophénol (solution de charge). Le mélange est placé dans les puits faits dans le gel d'agarose. La cuve est fermée et on branche les cordons de la cuve à l'alimentation. Un courant d'une tension de 100 V est appliqué pendant environ 1 heure de migration.

### Révélation de l'ADN sur gel

La visualisation des acides nucléiques se fait par coloration du gel au bromure d'éthidium avec visualisation à l'aide d'une lampe à UV courts (200-300nm). La comparaison visuelle de la fluorescence d'un échantillon avec celle d'une quantité d'ADN connue (marqueur de taille) permet d'estimer la quantité d'acides nucléiques déposée. La détermination de la taille d'un fragment se fait par rapport à la migration d'un marqueur approprié contenant des fragments de tailles connues.

### Purification de l'ADN

#### Principe

Le système Qiaquick (Mississauga, Ontario) combine la commodité d'une technologie de micro-colonne avec les propriétés spécifiques de liaison d'une membrane de silice. Les tampons

spécifiques livrés avec chaque trousse sont optimisés pour obtenir un bon rendement d'ADN et permettent d'éliminer les contaminants. L'ADN se fixe sur la membrane de silice en présence d'une forte concentration saline tandis que les contaminants passent au travers de la colonne et sont donc éliminés par les lavages alcooliques. L'ADN est ensuite élué par un tampon Tris. Les produits PCR compris entre 100 et 10,000 paires de bases seront purifiés tandis que seront éliminés les amorces, les nucléotides libres, l'ADN polymérase et les tampons.

### **Méthodologie**

L'amplification des échantillons à purifier a été réalisée sur un volume final de 50  $\mu$ L. Un volume de 10  $\mu$ L de produit PCR est contrôlé sur un gel d'agarose à 3%. Aux 40  $\mu$ L de produit de PCR restant on ajoute 200  $\mu$ L de tampon PB (contenant du guanidine-HCl-isopropanol (Qiagen, Mississauga, ON) (soit 5 volumes de PB pour un volume de produit PCR) et on mélange en tapotant le tube. Une colonne Qiaquick portant le numéro de l'échantillon est placée sur un tube collecteur propre de 2 mL. On dépose délicatement l'échantillon au sommet de la colonne et on centrifuge pendant 1 min à 13,000 tr/min. L'ADN est fixé sur la colonne. L'éluât est jeté et la colonne est replacée sur le même tube collecteur. On ajoute 700  $\mu$ L de tampon PE (fourni par le fabricant) au sommet de la colonne que l'on centrifuge pendant 1 min à 13,000 tr/min. On jette l'éluât et on replace la colonne sur le même tube collecteur. La colonne est centrifugée de nouveau pendant 1 min à 13,000 tr/min pour éliminer tout le tampon d'éluion résiduel : l'ADN se trouve lavé et fixé sur la colonne. On place la colonne Qiaquick sur un tube eppendorff de 1,5 mL propre et portant le nom de l'échantillon et on y ajoute 50  $\mu$ L de tampon EB (10Mm Tris-HCl, pH 8.5) au centre de la colonne pour éluer l'ADN. On centrifuge pendant 1 min à 13,000 tr/min. La colonne est jetée et la portion récoltée dans le tube eppendorff est apportée au séquençage. On peut augmenter le volume d'ADN purifié en ajoutant 30  $\mu$ L de tampon EB ou d'eau stérile au centre de la colonne. Attendre 1 min puis on centrifuge durant 1 min. à 13,000 tr/min.

### **Séquençage de l'ARN 16S**

Le séquençage fut effectué par la méthode de Sanger avec l'enzyme de BigDie terminator version 3.1 à l'aide d'un appareil ABI Prism 210 Genetic analyser (Applied Biosystems, Foster

City, CA, USA). Une homologie de 99-100% permet d'affirmer l'identification de la souche bactérienne (Drancourt, 1998).

Pour connaître la séquence des DNA, on fait synthétiser un brin de l'ADN par une enzyme spécifique. L'enzyme commence son travail à partir de l'extrémité 3' d'une sonde hybridée qui sert d'amorce. Elle ajoute des nucléotides complémentaires de ceux du brin d'ADN qu'elle copie. On fournit pour substrats des désoxynucléosides triphosphates normaux mélangés avec des didésoxynucléotides dont la fonction alcool secondaire en 3' est réduite ce qui empêche la synthèse de se poursuivre au delà. Les didésoxynucléotides incorporés en dernier sont marqués spécifiquement par des molécules fluorescentes (vert pour didésoxyA, bleu pour didésoxyC, jaune pour didésoxyG et rouge pour didésoxyT) (Housset et Raisonnier, 2005). On sépare ensuite les fragments synthétisés dans un champ électrique en fonction de leur longueur (les plus petits se déplacent plus rapidement). On lit ensuite les taches successives, identifiées par leur couleur, ce qui révèle la séquence des fragments synthétisés.

## Résultats

### Résultats des identifications à l'aide des tests classiques de diagnostic bactériologique et de l'API

Les résultats des tests de microscopie, catalase, coagulase et désoxyribonucléase nous ont permis d'obtenir 200 isolats de *Staphylococcus* spp. à partir de 395 échantillons de lait de vache recueillis dans la région de la Montérégie. Ces mêmes tests nous ont permis d'obtenir 100 autres isolats de *Staphylococcus* spp. à partir de 173 échantillons de lait issus des fermes de la Colombie-Britannique.

Les résultats des tests de l'API 20 Staph ont permis d'identifier à l'espèce nos isolats. En Montérégie, les espèces de SCN présentes sont, en ordre décroissant de fréquence: *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus*, *S. sciuri*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. auricularis*, *S. lugdinensis*, *S. urealyticus* et *S. schleiferi* (Tableau 5).

Les espèces de SCN isolées à partir des échantillons de la Colombie-Britannique sont, en ordre décroissant: *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. hyicus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. equorum*, *S. auricularis*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* et *S. caprae* (Tableau 5).

Une étude comparative des résultats du test d'API Staph, réalisée sur les isolats de la Montérégie et de la Colombie-Britannique, a permis de constater l'absence de l'espèce *S. lentus* dans les échantillons de la Montérégie et l'absence des espèces, *S. lugdinensis*, *S. urealyticus*, *S. capitis* et *S. schleiferi* dans les échantillons de la Colombie-Britannique (Tableau 5).

**Tableau 4. Inventaire des 300 isolats identifiés par API en Montérégie (QC) et à Agassiz (BC)**

Espèces	Montérégie	Agassiz
	n=200 isolats	n=100 isolats
<i>S. chromogenes</i>	48	13
<i>S. xylosum</i>	36	20
<i>S. simulans</i>	30	8
<i>S. epidermidis</i>	20	14
<i>S. saprophyticus</i>	12	2
<i>S. hyicus</i>	9	8
<i>S. sciuri</i>	7	7
<i>S. caprae</i>	6	1
<i>S. cohnii</i>	6	5
<i>S. capitis</i>	5	-
<i>S. equorum</i>	5	5
<i>S. haemolyticus</i>	4	2
<i>S. warneri</i>	4	6
<i>S. hominis</i>	3	2
<i>S. auricularis</i>	2	4
<i>S. schleiferi</i>	1	-
<i>S. lugdinensis</i>	1	-
<i>S. urealyticus</i>	1	-
<i>S. lentus</i>	-	3

À partir des résultats des tests observés dans les galeries API 20 Staph, ainsi que des résultats des tests de la coagulase, de la désoxyribonucléase et de la résistance à la lysostaphine nous avons regroupé les isolats selon les patrons de réaction obtenus. Ceci nous a permis de constater qu'il existait des différences phénotypiques au sein de certaines espèces.

Une analyse des résultats des isolats de la Montérégie nous a permis de noter les caractéristiques suivantes.

À partir des 48 isolats de *S. chromogenes*, six groupes ont été formés basés sur les différences dans les tests d'utilisation du mannose, maltose, saccharose et mannitol. Le premier groupe est composé de 17 isolats. Ils sont positifs pour le mannose, maltose et saccharose mais négatifs au mannitol. Le deuxième groupe est composé de 21 Isolats. Ils sont positifs pour le mannose et saccharose mais négatifs pour le maltose et le mannitol. Le troisième groupe est composé de quatre isolats qui sont positifs pour le saccharose mais négatifs pour le maltose, mannose, et mannitol. Le quatrième groupe est mannose et maltose positif mais négatif au mannitol et au saccharose. Le cinquième groupe est mannose et mannitol négatif mais positif au maltose et au saccharose. Le sixième groupe est mannose, mannitol et saccharose positif mais maltose négatif.

Sur 36 isolats de *S. xylosus*, six groupes furent recensés. Un groupe de trois isolats sont positifs pour la phosphatase alcaline et le saccharose mais négatifs pour le VP et le raffinose et résistants à la lysostaphine. Un autre groupe de 12 isolats sont positifs pour la phosphatase alcaline, le saccharose et le VP et résistants à la lysostaphine. Un troisième groupe est sensible à la lysostaphine, saccharose positif mais négatif pour le VP, le raffinose et la phosphatase alcaline. Le quatrième groupe comporte six isolats. Ils sont résistants à la lysostaphine, saccharose positif mais sont négatifs pour le VP, le raffinose et la phosphatase alcaline. Le cinquième groupe est sensible à la lysostaphine, raffinose et saccharose positifs mais négatif pour le VP et la phosphatase alcaline. Le sixième groupe comprend 3 isolats qui sont résistants à la lysostaphine, positifs pour le saccharose et la phosphatase alcaline mais VP et raffinose négatifs.

Sur 30 isolats de *S. simulans*, sept groupes furent recensés. Le premier groupe est formé de cinq isolats positifs pour le mannitol, la phosphatase alcaline, le VP et l'urée. Le deuxième groupe de

cinq isolats est phosphatase alcaline négative et mannitol, VP et urée positifs. Le troisième groupe est formé de six isolats qui sont VP négatif. Le quatrième groupe est formé de cinq isolats qui sont négatifs pour le VP, le mannitol, l'urée et la phosphatase alcaline. Le cinquième groupe est formé de deux isolats positifs pour le mannitol et la phosphatase alcaline mais négatifs pour l'urée et le VP. Le sixième groupe est constitué de trois isolats qui sont négatifs pour l'urée mais positifs pour le mannitol, la phosphatase alcaline et le VP. Le septième groupe est positif pour l'urée et négatif pour le mannitol, la phosphatase alcaline et le VP.

Sur 20 isolats de *S. epidermidis*, six groupes furent recensés. Le premier groupe compte dix isolats. Ils sont positifs pour la phosphatase alcaline, le saccharose, l'ADH et l'urée. Le deuxième groupe de cinq isolats est positif au saccharose, à l'ADH, à la phosphatase alcaline mais négatif à l'urée. Le troisième groupe est formé de deux isolats qui sont positifs pour le saccharose, l'ADH, l'urée mais négatifs à la phosphatase alcaline. Le quatrième est positif à l'urée, au saccharose, à la phosphatase alcaline mais est négatif à l'ADH. Le cinquième est formé de deux isolats qui sont positives au saccharose, à l'ADH mais négatifs à la phosphatase alcaline et à l'urée. Le sixième groupe est positif au saccharose, à l'ADH, mais négatif à l'urée et à la phosphatase alcaline.

Sur 12 isolats de *S. saprophyticus*, cinq groupes furent dégagés. Le premier groupe est composé de trois isolats qui sont positifs au mannitol, résistants à la lysostaphine, négatifs au nitrate et à la phosphatase alcaline. Le deuxième est composé de quatre isolats, positifs au mannitol, sensibles à la lysostaphine mais négatifs au nitrate et à la phosphatase alcaline. Le troisième est composé de deux isolats qui sont négatifs au nitrate, au mannitol et à la phosphatase alcaline, mais sont sensibles à la lysostaphine. Le quatrième groupe est composé de deux isolats qui sont négatifs au nitrate, résistants à la lysostaphine, sensibles au mannitol et à la phosphatase alcaline. Le cinquième groupe est formé d'un isolat positif au mannitol, à la phosphatase alcaline et sensible à la lysostaphine mais négatif au nitrate.

Sur neuf isolats de *S. hyicus*, trois groupes furent dégagés. Le premier groupe est formé de quatre isolats qui sont phosphatase alcaline et urée positifs. Le deuxième est formé de trois isolats qui

sont négatifs pour la phosphatase alcaline et l'urée et les deux autres isolats sont positifs à l'urée mais négatifs à la phosphatase alcaline.

Sur sept isolats de *S. sciuri*, deux groupes furent recensés. Le premier groupe est composé de trois isolats qui sont positifs pour le lactose et la phosphatase alcaline, NAG positive mais qui sont négatifs pour le xylose et le saccharose. Le deuxième groupe formé de quatre isolats négatifs pour le lactose et la phosphatase alcaline (excepté une), deux sont positifs pour le NAG, 3 sont xylitol positif et les quatre sont saccharose positif.

Sur six isolats de *S. caprae*, cinq groupes sont observés. Deux isolats sont positifs pour le mannose et l'urée mais négatifs pour le maltose et le tréhalose. Un isolat est urée et tréhalose positifs mais mannose et maltose négatifs. Un autre est maltose positif mais mannose, urée et tréhalose négatifs. Un isolat est positif pour l'urée, le tréhalose et le maltose mais négatif pour le mannose.

Sur les six isolats de *S. cohnii*, deux sous-espèces sont identifiées: un isolat de *S. cohnii* sous espèce *cohnii* et cinq isolats de *S. cohnii* sous espèce *urealyticus*. Les cinq isolats de *S. cohnii* sous espèce *urealyticus* représentent quatre groupes. Un groupe formé de deux isolats est sensible à la lysostaphine, positif au mannitol, à l'urée et est négatif au xylitol, au nitrate et au NAG. Le deuxième groupe est positif au mannitol, à l'urée mais résistant à la lysostaphine. Le troisième est négatif au nitrate et au NAG mais positif à l'urée et au mannitol. Le quatrième est positif au xylitol, au nitrate, au NAG, au mannitol, à l'urée mais résistant à la lysostaphine.

Sur cinq isolats de *S. capitis*, nous avons cinq groupes différents. Une réponse négative, est observée avec un isolat au maltose, un autre au lactose, un à l'ADH, deux isolats sont négatifs pour la phosphatase alcaline, deux sont urée négative et deux sont sensibles à la lysostaphine.

Sur cinq isolats de *S. equorum*, cinq groupes différents sont observés. Un seul isolat est phosphatase alcaline négative, un autre est MDG négative, un autre est lactose négatif, deux sont mannose négatif et un est résistant à la lysostaphine. Sur quatre isolats de *S. haemolyticus*, deux sont positifs pour le mannitol et les nitrates et sensibles à la lysostaphine. Un est positif au



mannitol, au nitrate et sensible à la lysostaphine. L'autre est négatif au mannitol, au nitrate et résistant à la lysostaphine.

Sur quatre isolats de *S. warneri* trois groupes furent recensés. Le premier groupe est formé de deux isolats qui sont positifs pour le mannitol et le VP, mais négatifs pour le lactose, le nitrate et l'ADH. Le deuxième groupe comprend un isolat qui est positif pour le mannitol, le nitrate et le VP mais négatif pour le lactose et l'ADH. Le troisième groupe est positif pour le lactose et l'ADH mais négatif pour le mannitol, le VP et le nitrate.

Sur trois isolats de *S. hominis* il y a trois groupes. Un isolat s'est montré positif au mannose, lactose, mannitol, nitrate et urée et négatif au tréhalose, à l'ADH, à la phosphatase alcaline. La deuxième est positif au lactose, au tréhalose, à l'urée à la phosphatase alcaline mais négatif au mannose, mannitol, nitrate, ADH et sensible à la lysostaphine. La troisième est résistant à la lysostaphine, positif au mannose, tréhalose, nitrate, ADH mais négatif au lactose, mannitol et à l'urée.

Les deux isolats de *S. auricularis* donnaient des résultats différents. Un isolat est mannitol négatif et sensible à la lysostaphine et l'autre est mannitol positif mais résistant à la lysostaphine.

Pour les espèces isolées à partir des échantillons de la Colombie Britannique nous avons pu noter, tout comme pour les isolats de la Montérégie, des différences phénotypiques parmi les espèces rencontrées.

Sur les 20 isolats de *S. xylosus*, sept groupes sont recensés. Un groupe de 11 isolats est positif pour le nitrate et le xylose, sensible à la lysostaphine, mais VP négatif. Un autre groupe de six isolats est positif pour le nitrate et le xylose, résistant à la lysostaphine et VP négatif. Un isolat est xylose positif, sensible à la lysostaphine mais négatif pour le VP et le nitrate. Un isolat est positif pour le VP, sensible à la lysostaphine mais négatif pour le xylose et le nitrate. Un autre isolat est positif au VP, au xylose, au nitrate et sensible à la lysostaphine. Un isolat est positif au nitrate, négatif au VP, au xylose et résistant à la lysostaphine. Un est positif au nitrate et au xylose, sensible à la lysostaphine mais est VP négatif.

Sur les 14 isolats de *S. epidermidis*, quatre groupes sont recensés. Un premier groupe de neuf isolats est NAG négatif et sensible à la lysostaphine. Un deuxième groupe de deux isolats est NAG positif et résistant à la lysostaphine. Un troisième groupe de deux isolats est NAG négatif et résistant à la lysostaphine. Un quatrième groupe comprenant un seul isolat est NAG positif et sensible à la lysostaphine.

Sur 13 isolats de *S. chromogenes*, quatre groupes sont recensés. Le premier groupe constitué de quatre isolats est positif pour le maltose et le lactose mais négatif pour le NAG. Le deuxième groupe de cinq isolats est positif pour le maltose, le lactose et le NAG. Le troisième groupe est positif pour le lactose mais négatif au maltose et au NAG. Le quatrième groupe est positif pour le maltose mais négatif pour le lactose et le NAG.

Sur les huit isolats de *S. hyicus*, 3 groupes sont identifiés. Six isolats sont positifs pour l'urée et sensible à la lysostaphine. Un est urée négative et sensible à la lysostaphine et un autre est positif à l'urée et résistante à la lysostaphine.

Sur les huit isolats de *S. simulans*, six groupes sont recensés. Trois isolats formant un premier groupe sont positifs au nitrate, au VP, à l'urée, sensibles à la lysostaphine mais sont négatifs pour le mannose, le xylitol et l'ADH. Le deuxième groupe est formé d'un seul isolat. Il est positif au nitrate au VP, à l'ADH, à l'urée, sensible à la lysostaphine mais est négatif au mannose et au xylitol. Le troisième isolat est positif pour le nitrate, le VP, l'ADH et sensible à la lysostaphine mais négatif pour le mannose, le xylitol et l'urée. Le quatrième est positif pour le nitrate et l'ADH, sensible à la lysostaphine mais négatif pour le mannose, le xylitol, l'urée et le VP. Le cinquième est positif pour le mannose, le xylitol, le nitrate, l'ADH et l'urée et est sensible à la lysostaphine mais est négatif au VP. La sixième est positif pour le VP, l'ADH, l'urée mais négatif pour le mannose, le xylitol, le nitrate et résistant à la lysostaphine.

Sur cinq isolats de *S. sciuri* quatre sont recensés. Un premier groupe de deux isolats sont positifs pour le lactose, maltose, tréhalose, la phosphatase alcaline, le NAG et sont sensibles à la lysostaphine. Un isolat est positif au lactose, maltose, phosphatase alcaline, NAG, est sensible à la lysostaphine mais est tréhalose négatif. Un deuxième isolat est positif au lactose, maltose, tréhalose, phosphatase alcaline, NAG mais est résistant à la lysostaphine. Un dernier isolat est

positif au lactose, maltose, sensible à la lysostaphine mais est tréhalose, phosphatase alcaline et NAG négatif.

Sur six isolats de *S. warneri*, trois groupes sont recensés. Un premier groupe composé de deux isolats sont positifs pour le mannitol et l'urée. Ils sont sensibles à la lysostaphine mais sont négatifs pour le lactose et la phosphatase alcaline. Le deuxième groupe est composé de deux isolats qui sont positifs pour le lactose et l'urée, négatifs pour le mannitol et la phosphatase alcaline et sensibles à la lysostaphine. Et le troisième groupe est constitué de deux isolats qui sont négatifs au lactose, à l'urée, à la phosphatase alcaline, au mannitol mais sensibles à la lysostaphine.

Les deux isolats de *S. saprophyticus* étaient phénotypiquement différents. Un isolat est positif pour la phosphatase alcaline mais négatif aux tests: mannitol, nitrate, VP, NAG, et urée. Un deuxième isolat est positif à ces six tests.

Sur trois isolats de *S. lentus*, deux groupes sont dégagés. Deux isolats sont négatifs pour le saccharose et un isolat est positif.

Sur deux isolats de *S. hominis*, deux groupes sont recensés. Un isolat est négatif pour le lactose et le VP mais est résistant à la lysostaphine; l'autre isolat est positif pour le lactose et le VP et sensible à la lysostaphine.

#### **Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques effectués sur les isolats de SNC provenant de la Montérégie et d'Agassiz**

Les tests de sensibilité aux antibiotique de nos isolats furent réalisés en utilisant des disques de clindamycine 2 µg, d'érythromycine 15 µg, d'oxacilline 1 µg, d'enrofloxacin 5 µg, de tétracycline 30 µg, de pénicilline G 10 UI, de la combinaison pénicilline/novobiocine 10 UI/30 µg, ainsi que de la combinaison triméthoprime/sulfaméthoxazole 1,25 µg/23,75 µg. Les résultats sont comptabilisés en utilisant l'identification à l'espèce obtenue avec la galerie API.

Aucun des isolats de la Montérégie n'était résistant à l'enrofloxacin, ainsi qu'aux combinaisons pénicilline-novobiocine et triméthoprime/sulfaméthoxazole. Cependant, quelques cas isolés de résistance furent constatés. Pour la clindamycine, un isolat de *S. cohnii* s'est montré résistant; trois isolats de *S. xylosum*, un isolat de *S. equorum* et un de *S. epidermidis* étaient limites. Un isolat de *S. capitis*, un *S. chromogenes*, un *S. cohnii* et un *S. epidermidis* démontraient de la résistance à la tétracycline. Huit isolats étaient résistants à la pénicilline: trois *S. xylosum*, un *S. epidermidis*, deux *S. chromogenes*, un *S. capitis* et un *S. hyicus*. Deux isolats de *S. cohnii*, un de *S. saprophyticus*, un de *S. vitulinus* et un de *S. xylosum* se sont montrés résistants à l'érythromycine. Deux autres isolats de *S. xylosum* étaient de sensibilité intermédiaire envers l'oxacilline.

Parmi les isolats de la Colombie-Britannique aucun n'a démontré de résistance vis-à-vis l'enrofloxacin ainsi qu'envers la combinaison pénicilline/novobiocine. Un isolat de *S. chromogenes* s'est avéré résistant à la combinaison triméthoprime/sulfaméthoxazole. Un isolat de *S. epidermidis* et ainsi qu'un de *S. fleurettii* ont montré une sensibilité intermédiaire envers la clindamycine. Un isolat de *S. chromogenes*, un de *S. equorum*, un de *S. haemolyticus*, un de *S. fleurettii* et un de *S. simulans* étaient résistants à la tétracycline. Un isolat de *S. chromogenes*, un de *S. equorum* et un de *S. haemolyticus* étaient résistants à la pénicilline. Un isolat de *S. chromogenes* et un de *S. simulans* étaient résistants à l'érythromycine. Un isolat de *S. chromogenes* était résistant à l'oxacilline alors qu'un isolat de *S. haemolyticus* était de sensibilité intermédiaire.

En résumé, 18 cas de résistance et huit cas de sensibilité intermédiaire sont recensés parmi les 50 isolats de la Montérégie testés. Pour les 23 isolats de la Colombie Britannique, 12 cas de résistance et trois cas de sensibilité intermédiaire sont recensés.

### **Résultats des identifications par chromatographie en phase gazeuse des isolats de la Montérégie et d'Agassiz**

Afin de comparer la fiabilité des identifications obtenues à l'aide du système API, nous avons procédé à l'identification par chromatographie en phase gazeuse des acides gras de la paroi

bactérienne. On peut retrouver dans le Tableau 6 la distribution des différentes espèces identifiées par cette méthode selon leur provenance géographique.

Pour l'analyse par chromatographie l'index de similarité maximal pouvant être obtenu est 0,999. Une identification avec un index supérieur à 0,800 est considérée comme bonne.

Si on prend de manière indépendante les résultats de l'identification par API et par chromatographie en phase gazeuse des 200 isolats provenant des échantillons de la Montérégie, on peut noter des différences dans les totaux des différentes espèces identifiées. Pour l'identification de *S. chromogenes*, il y a un écart de 2 isolats; *S. xylosus* 4 isolats; *S. simulans* 2 isolats; *S. epidermidis* 1 isolat; *S. cohnii* 6 isolats; *S. equorum* 10 isolats; *S. caprae* 6 isolats; *S. hyicus* 2 isolats; *S. warneri* 1 isolat; *S. sciuri* 2 isolats; *S. auricularis* 1 isolat; *S. haemolyticus* 1 isolat; *S. saprophyticus* 6 isolats; *S. capitis* 1 isolat; *S. vitulinus* 1 isolat; *S. arlettae* 1 isolat; *S. lugdinensis* 1 isolat; *S. schleiferi* 1 isolat; et *S. urealyticus* 1 isolat. Ceci donne en apparence 50 résultats sur 200 qui sont non similaires dans les deux tests.

Toutefois, lorsque l'on associe spécifiquement l'identification par API d'un isolat avec son identification par chromatographie en phase gazeuse on réalise que certaines identifications par API que l'on devrait considérer comme excellentes donnent des identifications toutes autres par chromatographie.

Dix isolats identifiés *S. xylosus* par API avaient une identité différente par chromatographie. Deux étaient identifiés respectivement à 47,2 et 97,3% et ces mêmes isolats étaient identifiés *S. cohnii* par chromatographie avec des index de similarité respectivement de 0.836 et 0.887. Un isolat identifié par API à 99,6% se trouvait identifié par chromatographie comme *S. saprophyticus* à 0.492; les 7 autres identifiés par API (99,6 à 99,9%) furent identifiés par chromatographie comme étant *S. equorum* avec un indice variant de 0.225 jusqu'à 0.773.

Six isolats sont identifiés *S. caprae* par API avec des pourcentages variant de 44,7 à 97,1%. Ces mêmes isolats sont identifiés par chromatographie, comme étant *S. simulans* (0.876), *S. hominis* (0.620 et 0.628), *S. capitis* (0.869 et 0.886) et *S. aureus* (0.195).

Deux isolats identifiés *S. chromogenes* par API (à 56,7 et 62,5%) étaient identifiés par chromatographie comme étant respectivement *S. saprophyticus* (0.299) et *S. arlettae* (0.048). Deux isolats sont identifiés *S. simulans* par API avec des pourcentages de 68,2 et 94,0%. Ces mêmes isolats sont identifiés par chromatographie comme étant respectivement *S. cohnii* (0.673) et *S. saprophyticus* (0.652).

Un isolat identifié *S. epidermidis* par API (37,1%) est identifié par chromatographie comme étant *S. cohnii* (0.419). Deux isolats furent identifiés *S. hyicus* par API (57,0 et 86,3%) et ces mêmes isolats furent identifiés par chromatographie comme étant *S. cohnii* (0.367 et 0.533). Deux isolats furent identifiés *S. sciuri* par API à 95,1% et 96,0% et furent identifiés respectivement *S. vitulinus* (0.847) et *S. cohnii* (0.860) par chromatographie. Par API, un isolat identifié *S. capitis* avec un pourcentage de 49,4% fut identifié par chromatographie comme étant *S. saprophyticus* (0.876). Des isolats qui sont identifiés *S. schleiferi* (36,7%), *S. urealyticus* (64,2%) et *S. lugdinensis* (24,4%) par API ont été identifiés comme étant, respectivement, *S. hominis* (0.662), *S. cohnii* (0.834) et *S. xylosus* (0.576) par chromatographie.

Des comparaisons entre les résultats obtenus par suite des tests de chromatographie et d'API sur les 100 isolats d'Agassiz ont montré également des différences. En prenant le critère de nombre d'identification de chaque espèce, les écarts constatés entre les deux méthodes d'identifications sont les suivants: pour *S. cohnii*, il y a un écart d'un isolat; *S. sciuri* 3 isolats; *S. haemolyticus* 1 isolat; *S. hominis* 1 isolat; *S. vitulinus* 2 isolats; *S. lentus* 2 isolats; *S. lugdinensis* 1 isolat et *S. caprae* 1 isolat. Ce qui donne 12 % de non similarité apparente entre les deux méthodes.

Plus spécifiquement, les différences obtenues entre les deux méthodes sont les suivantes. Un isolat identifié à 54,4% comme *S. caprae* par API a été identifié comme étant *S. xylosus* (0.440). Un isolat identifiée comme *S. epidermidis* (81,5%) a été identifié comme étant *S. cohnii* (0.270). Une identification par API en tant que *S. haemolyticus* (77,1%) donnait par chromatographie une identification de *S. saprophyticus* (0.010). Un isolat identifié comme étant *S. hominis* (51,6%) par API correspondait à une identification par chromatographie de *S. lugdinensis* (0.068).

Les deux isolats identifiés par API comme *S. lentus* (86,2% et 99%) ont donné lors de l'identification par chromatographie une identification correspondant à *Micrococcus luteus* (0.222 et 0.218). Les deux isolats de *S. saprophyticus* par API (40,8 et 44%) ont donné respectivement par chromatographie une identification de *S. warnenri* (0.015) et *S. epidermidis* (0.188). Finalement les trois isolats de *S. sciuri* par API (96,1, 45,2 et 57.0 %) correspondaient à des identifications par chromatographie de *S. vitulinus* (0.447), *S. caprae* (0.225) et *S. hominis* (0.504).

**Tableau 5. Répartition, selon les deux régions étudiées, des isolats de *Staphylococcus* coagulase-négative identifiées par chromatographie en phase gazeuse**

Espèces	Montérégie (n=200)	Agassiz (n=100)
<i>S. chromogenes</i>	46	13
<i>S. xylosum</i>	32	20
<i>S. simulans</i>	28	8
<i>S. epidermidis</i>	19	14
<i>S. saprophyticus</i>	18	2
<i>S. equorum</i>	15	5
<i>S. cohnii</i>	12	6
<i>S. hyicus</i>	7	8
<i>S. warneri</i>	5	9
<i>S. sciuri</i>	5	4
<i>S. capitis</i>	4	0
<i>S. haemolyticus</i>	3	1
<i>S. hominis</i>	3	1
<i>S. vitulinus</i>	1	2
<i>S. arlettae</i>	1	0
<i>S. auricularis</i>	1	4
<i>S. lentus</i>	0	2
<i>S. lugdinensis</i>	0	1



### Résultats du séquençage de l'ARNr 16S des isolats

Les résultats du séquençage de l'ARN16S des isolats de la Montérégie (Tableau 7) révèlent une bonne identification et caractérisation de nos isolats. Tous les isolats furent identifiés avec une similarité de 99 à 100% avec des souches de référence américaine (ATCC), allemande (DSM) ou européenne (SE, S, MAFF). Seuls 2 isolats de *S. simulans* ont été identifiés à 97% et un isolat de *S. equorum* a été identifié à 95% de similarité avec les souches de référence.

Les résultats du séquençage des isolats d'Agassiz (Tableau 8) montrent une identification avec des pourcentages de similarité de 99-100% aux souches de références ATCC, SE, DSM et MAFF. Cependant quelques souches furent identifiées avec de faibles pourcentages de similarité. Un isolat de *S. simulans* est identifié à 96% à la souche ATCC-27848T, un isolat de *S. cohnii* ssp. *urealyticum* est identifié à seulement 90% de similarité avec la souche PLC9 et un isolat de *S. hyicus* est identifié à 95% à la souche ATCC-11249T.

### Comparaison des identifications obtenues par API, chromatographie en phase gazeuse et séquençage

Les résultats d'identification obtenus par les trois méthodes étudiées ont été comparés pour 50 isolats de SCN provenant des échantillons de lait de la Montérégie et 23 isolats de SCN provenant des échantillons de lait d'Agassiz. Si l'identification par le séquençage de l'ARN 16S est utilisée comme méthode étalon, nous pouvons faire les observations suivantes.

Des résultats d'identification identiques par les trois méthodes ont été notés pour 35 des 73 isolats analysés (Tableau 9). Cette concordance entre les trois méthodes a été obtenue avec presque toutes les espèces identifiées au cours de ce projet. Pour les isolats de la Montérégie, 19 des 50 échantillons analysés avaient des identifications identiques alors que pour les isolats d'Agassiz le nombre d'identifications similaires était de 16/23. Des isolats appartenant à neuf des espèces identifiés au cours de cette étude sont retrouvés dans la liste des identifications similaires par les trois méthodes.

Parmi les isolats où il n'y avait pas de concordance entre les trois méthodes, on retrouvait un accord dans l'identification par le séquençage et l'API pour 13 des 73 isolats et tous ces isolats provenaient de la Montérégie (Tableau 10). Ces isolats appartenaient à cinq des espèces identifiées au cours du projet et ces espèces avaient au moins un isolat qui se retrouvait dans le groupe des isolats où il y avait concordance entre les trois méthodes. Un accord entre les résultats du séquençage et celui de l'identification par chromatographie en phase gazeuse était noté pour 13 des 73 isolats et encore une fois tous les isolats provenaient de la Montérégie (Tableau 11). Il est intéressant de noter qu'en deux occasions pour ces isolats l'identification à l'aide de l'API donnait un résultat de *S. aureus* alors que les isolats étaient coagulase négative. Pour ce groupe, un isolat chaque des espèces *S. hemolyticus* et *S. vitulinus* a été identifié par ces deux méthodes alors qu'aucun isolat avec une identification similaire par les trois méthodes n'avait été démontré. Pour quelques isolats nous avons obtenu une identification similaire par API et chromatographie alors que le séquençage indiquait une espèce différente (Tableau 12). Cette situation a été rencontrée à six occasions; deux fois avec un isolat de la Montérégie et quatre fois avec des isolats en provenance d'Agassiz. Finalement, en six occasions nous avons obtenu des identifications qui étaient différentes pour les trois méthodes utilisées (Tableau 13). Parmi ces identifications, deux espèces identifiées par séquençage n'ont pas été rencontrées dans les identifications par API ou par chromatographie. Il s'agit de *S. hominis* et *S. fleuretti*.

**Tableau 6. Répartitions des isolats de *Staphylococcus* coagulase-négative provenant de la Montérégie en fonction du résultat du séquençage de l'ARN 16S (n=50)**

Espèce	Nombre	%	Souches types
<i>S. chromogenes</i>	10	99-100	ATCC 43764T, MAFF 911474
<i>S. cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	8	99-100	MAFF 911487, ATCC 29974T, DSM 20261
<i>S. cohnii</i> ssp. <i>urealyticus</i>	2	99-100	DSM 6718, DSM 20261
<i>S. simulans</i>	6	99-100	ATCC 27848T, MAFF 910161
	2	97	ATCC 27841T, MAFF 910161, DSM20322
<i>S. epidermidis</i>	4	99-100	ATCC 146, MAFF 911486, AB 111112
	2	99-100	ATCC 12228, SAFR 016, GH 654
<i>S. equorum</i>	4	99-100	DSM 15097, SE 5, SE 6, SE 8, S 14
	1	95	SE 5, SE 6, SE 8, S 14
<i>S. xylosus</i>	5	99-100	MAFF-911482, ATCC-29971T
<i>S. saprophyticus</i> ssp. <i>bovis</i>	2	99-100	CCM 4410, MS 910, MSU 3510, ARK 9973, MS 510, DSM 20229
<i>S. hyicus</i>	1	99-100	ATCC 11249T, DSM 20459
<i>S. haemolyticus</i>	1	99-100	ATCC 29970T, DSM 20265
<i>S. sciuri</i>	1	99-100	DSM 20345T, S 7
<i>S. vitulinus</i>	1	99-100	ATCC 51145

**Tableau 7. Répartitions des isolats de *Staphylococcus* coagulase-négative provenant d'Agassiz en fonction du résultat du séquençage de l'ARN 16S (n=23)**

Espèce	Nombre	%	Souches types
<i>S. chromogenes</i>	5	99%	ATCC 43764T, MAFF 911474, DSM 20454
<i>S. equorum</i>	1	100%	DSM 15097, SE 5, SE 6, SE 8
	3	99%	DSM 15097, SE 5, SE 6
	2	100%	SE 5, SE 8
<i>S. simulans</i>	3	99%	ATCC 27848T (humain)
	1	96%	DSM 20723, ATCC 27848T
	1	98%	MAFF 910161
<i>S. cohnii</i> ssp. <i>urealyticum</i>	1	98%	ATCC 29974T, DSM 6718
	1	90%	PLC 9
<i>S. haemolyticus</i>	1	99%	ATCC 29970T, DSM 20265
	1	98%	ATCC 29970T, MAFF 911476
<i>S. epidermidis</i>	1	99%	SAFR 016, SAFR 018, MG 89
<i>S. hominis</i>	1	99%	DSM 20328
<i>S. hyicus</i>	1	95%	ATCC 11249T

**Tableau 8. Inventaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative provenant de la Montérégie et d'Agassiz ayant obtenus des résultats d'identification similaires par les trois méthodes étudiées (n=35)**

API	Chromatographie	Séquençage
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. hyicus</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. hyicus</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. xylosus</i>

**Tableau 9. Inventaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative provenant de la Montérégie et d'Agassiz ayant obtenus des résultats d'identification similaires par API 20 Staph et séquençage (n=12)**

API	Chromatographie	Séquençage
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. cohnii</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. xylosus</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. xylosus</i>

**Tableau 10. Inventaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative provenant de la Montérégie et d'Agassiz ayant obtenus des résultats d'identification similaires par chromatographie en phase gazeuse et par séquençage (n=13)**

API	Chromatographie	Séquençage
<i>S. caprae</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. capitis</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. sciuri</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. auricularis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. sciuri</i>	<i>S. vitulinus</i>	<i>S. vitulinus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. xylosus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. xylosus</i>

**Tableau 11. Inventaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative provenant de la Montérégie et d'Agassiz ayant obtenus des résultats d'identification similaires par API 20 Staph. et chromatographie en phase gazeuse (n=5)**

API	Chromatographie	Séquençage
<i>S. hyicus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. cohnii</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. hominis</i>



**Tableau 12. Inventaire des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative provenant de la Montérégie et d'Agassiz ayant obtenus des résultats d'identification divergents par les trois méthodes étudiées (n=6)**

API	Chromatographie	Séquençage
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. cohnii</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. sciuri</i>	<i>S. vitulinus</i>	<i>S. fleuretti</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>

## Discussion

La pathogénie de la mammité clinique et sub-clinique est un processus complexe qui implique plusieurs agents microbiens. La mammité est la maladie la plus fréquente et la plus coûteuse pour l'industrie laitière au Canada (Scholl et coll., 2004). La mammité bovine à staphylocoque a un caractère persistant (Chaffer et coll., 1999; Cucarella et coll., 2004). Cet aspect des infections à staphylocoque est dû à la capacité des souches de staphylocoque en général et des *Staphylococcus* coagulase négative (SCN), en particulier, de coloniser et d'adhérer aux cellules épithéliales de la glande mammaire (Raul, 2001). Selon une étude menée par Raul (2001), les staphylocoques adhèrent aux cellules épithéliales des glandes mammaires en induisant une endocytose. Une étude a montré la présence d'adhésine sur la paroi de certaines espèces de SCN qui ont des récepteurs sur les cellules épithéliales des glandes mammaires (Tormo et coll., 2004). Une étude mentionne la production d'un exopolysaccharide par certaines espèces de SCN (Ben Hassen et coll., 2003). Ce matériel forme une sorte de biofilm autour des bactéries qui le produisent. Ce biofilm protège les bactéries contre le système immunitaire de l'hôte et l'action des agents antimicrobiens (Ben Hassen et coll., 2003; Cerca et coll., 2005). Plusieurs études rapportent la présence de facteurs de virulence chez des espèces de SCN. Des gènes de virulence de surface cellulaire furent retrouvés chez des souches de *S. chromogenes* (Birgeron et coll., 1992). La PAI (adhésine intercellulaire polyssaccharidique) fut détectée chez *S. epidermidis* (Vuong et coll., 2004). Des adhésines intercellulaires codées par les gènes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* et *icaR*, sont impliquées dans la sécrétion des biofilms, et le GluSE est retrouvé chez des souches de *S. epidermidis* (Arciola, 2001; Fitzpatrick et coll., 2002; Heilmann et coll., 1996a; Tormo et coll., 2004). Une capsule est rapportée chez *S. xylosus* (Birgeron et coll., 1992); des métalloprotéases chez *S. hyicus* (Andresen, 2005) et *S. chromogenes*. De la toxine Delta-like, qui est cytotoxique, a été retrouvée chez *S. hyicus* (Sheifele et coll., 1987) et des exfoliatines sont également retrouvées chez des souches de *S. hyicus* (Ahren et Adresen, 2004). En plus des gènes de virulence, des facteurs de résistance aux antimicrobiens furent retrouvés chez des espèces de SCN (Marta Knausz et coll., 2004). La présence de gènes de virulence, de résistance aux antibiotiques, d'adhésines, la capacité des SCN à produire des toxines, des hémolysines et des biofilms, sont tous des facteurs qui témoignent de leur capacité à causer des infections et du caractère persistant des infections à staphylocoques.

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'identifier et de caractériser les espèces de SCN provenant du lait de vache. Le but visé est de mettre au point une méthode d'identification rapide et simple des espèces de SCN.

Pour atteindre cet objectif, nous avons tout d'abord effectué un échantillonnage dans deux régions différentes et cela, dans le but de faire une comparaison des différentes espèces isolées dans ces deux régions. L'identification des isolats de *Staphylococcus* spp. par la microscopie, les tests de catalase, de coagulase, de désoxyribonucléase, de résistance à la lysostaphine, l'API 20 Staph, la chromatographie en phase gazeuse et le séquençage de l'ARNr 16S fut faite.

Les résultats d'identification obtenus à l'aide des galeries API 20 Staph indiquent que ce sont sensiblement les mêmes espèces qui sont isolées dans les deux régions, à savoir *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus*, *S. sciuri*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. auricularis* et *S. hominis*. Toutefois, les espèces, *S. lugdinensis*, *S. urealyticus*, et *S. schleiferi* ne furent identifiées seulement qu'en Montérégie et *S. lentus* qui ne fut isolée seulement qu'en Colombie Britannique. Mais à notre connaissance, la présence des espèces *S. lugdinensis*, *S. urealyticus* et *S. lentus* dans le lait de vache n'est pas signalée dans la littérature (Berghash et coll., 1983; Chaffer et coll., 1999; dos Santos Nascimento et coll., 2005; Giannechini et coll., 2002; Rajala-Schultz et coll., 2004; Smith et Hogan, 2001; Soltys et Quinn, 1999; Younis et coll., 2003; Zhang et Maddox, 2000)

L'analyse des résultats des tests, de coagulase, de désoxyribonucléase, de résistance à la lysostaphine et de l'API 20 Staph, a permis de réaliser l'ampleur de la diversité phénotypique de SCN. L'identification des isolats de la Montérégie a donné 20 résultats de *S. epidermidis*, répartis en cinq groupes, avec des variations dans les résultats des tests de la phosphatase alcaline, de l'urée et de l'ADH. Selon la littérature, seulement 6 à 15% des souches de *S. epidermidis* sont négatives pour la phosphatase alcaline (Murray et coll., 2003) et des souches de *S. epidermidis* urée négative ne sont pas rapportées. Toutes les souches de *S. epidermidis* isolées des échantillons d'Agassiz sont positives pour la phosphatase alcaline.

Parmi les isolats de la Montérégie aussi bien que ceux d'Agassiz identifiés *S. chromogenes*, plusieurs groupes ont été retrouvés principalement sur la base de variations dans les résultats des

tests d'acidification des sucres. Ceci est similaire à ce qui est rapporté dans la littérature (Murray et coll., 2003).

Parmi les isolats de la Montérégie identifiés comme étant *S. xylosus*, sept se sont avérés résistants à la lysostaphine et parmi eux, six sont nitrate et xylose positives mais VP négatif et un isolat est positif au nitrate, négatif au VP et au xylose. Les 20 isolats de *S. xylosus* d'Agassiz, sont tous sensibles à la lysostaphine. Selon une étude menée en 2003 (Murray et coll.) toutes les souches de *S. xylosus* sont positives pour le xylose. Les souches de *S. xylosus* sont sensibles à la lysostaphine d'après une étude de Kloos et Shleifer (1975).

Les huit isolats de *S. hyicus* de la Montérégie sont positifs pour la phosphatase alcaline tandis que sur les neuf isolats d'Agassiz, un est négatif pour la phosphatase alcaline. Les résultats des tests d'urée sont variables selon les isolats et cela est conforme aux données de la littérature (Euzeby, 1999).

Cinq des 30 isolats de *S. simulans* provenant de la Montérégie sont positifs au mannitol, à la phosphatase alcaline, au VP et à l'urée. Sur les huit isolats d'Agassiz, cinq sont positifs au VP. Selon une étude menée en 1975 (Kloos et Shleifer) les souches de *S. simulans* donnent une réaction négative à faiblement positive au test VP.

Parmi les sept isolats de la Montérégie identifiés *S. sciuri*, quatre sont positifs pour le NAG, mais un seul isolat parmi ceux d'Agassiz est positif à ce même test. Dans la littérature seulement une souche de *S. sciuri* est positive au test NAG (Euzeby, 1999).

Les six isolats de *S. warneri* de la Montérégie sont sensibles à la lysostaphine. Sur quatre isolats d'Agassiz, un est positif au nitrate et au VP. Selon la littérature (Euzeby, 1999; Kloos et Shleifer, 1975), les souches de *S. warneri* sont résistantes à la lysostaphine, urée et VP positifs, phosphatase alcaline négative, mannitol variable et nitrate faiblement négatif.

Les deux isolats de *S. hominis* de la Montérégie se sont démarqués par des caractéristiques différentes. Un isolat s'est avéré négatif pour le lactose et le VP mais est résistant à la lysostaphine et l'autre isolat est positif pour le lactose et le VP, et sensible à la lysostaphine. Pour les trois isolats d'Agassiz, un isolat s'est montrée positif pour le mannose, lactose, mannitol, nitrate et urée et négatif au tréhalose, à l'ADH et à la phosphatase alcaline. Le

deuxième est positif au lactose, au tréhalose, à l'urée et à la phosphatase alcaline, mais négatif au mannose, mannitol et nitrate. Selon des études menées en 1983 (Aldridge et coll.; Christensen et coll.) *S. hominis* est phosphatase alcaline négative, ce qui le différencie de *S. epidermidis*.

Les isolats de *S. equorum* sont très diversifiés selon les résultats obtenus. Un seul isolat est négatif pour la phosphatase alcaline, un autre est négatif pour le MDG, un autre est négatif pour le lactose, deux sont négatifs pour le mannose et un est résistant à la lysostaphine. Selon la littérature (Murray et coll., 2003), les souches de *S. equorum* sont positives pour la phosphatase alcaline et l'urée, mannose positif et lactose variable.

Tous les isolats de *S. saprophyticus* provenant des deux régions sont négatifs pour le test de nitrate et positifs au mannitol sauf un isolat de la Montérégie. Ceci est cohérent avec les résultats des mêmes tests décrits par Murray et coll. (2003).

Sur quatre isolats de *S. haemolyticus*, trois sont positifs pour le mannitol et les nitrates et sensibles à la lysostaphine. L'autre est négatif au mannitol, au nitrate et résistant à la lysostaphine. Selon Kloos et Shleifer (1975) les souches de *S. haemolyticus* sont résistantes à la lysostaphine.

Ces résultats montrent dans plusieurs cas, une similitude des résultats obtenus avec les données de la littérature. Toutefois, dans plusieurs cas il y avait des divergences avec les données de la littérature. Compte tenu du fait que la présente étude a été faite en utilisant uniquement des isolats d'origine bovine provenant du lait, il est possible que la base de données API ne soit pas parfaitement adaptée aux espèces rencontrées et à leur diversité.

### **Comparaison des résultats des tests d'API, de chromatographie et du séquençage**

Sur les 50 isolats analysés par ces trois méthodes, nous remarquons que 21 identifications effectuées par API ont donné la même identification qu'au séquençage.

Seulement 11 des 50 isolats testés par chromatographie ont eu une identification similaire au séquençage.

En faisant une analyse des mêmes résultats obtenus de l'API et de la chromatographie, nous nous rendons compte que 22 tests sur 50 sont similaires.

Cependant, il est à noter que l'identification donnée par séquençage était similaire dans plusieurs cas aux résultats donnés en deuxième position sur les fiches de résultats de la chromatographie avec un très faible indice d'identification. Ce constat peut s'expliquer en partie par le fait que la base de données ne contient pas ou peu de profils des acides gras des isolats de SCN d'origine animale, ce qui pourrait diminuer le pouvoir d'identification de la chromatographie. Il peut être expliqué aussi par la très grande ressemblance entre le profil des acides gras des différentes espèces de *Staphylococcus* rapporté dans la littérature (Kotilainen et coll., 1991).

En faisant une analyse des résultats du séquençage, nous remarquons que certaines identifications étaient faites à des pourcentages considérés comme non fiables. C'était le cas de 2 souches de *S. simulans* qui ont été identifiées à 97% et une souche de *S. equorum* qui a été identifiée à 95% de similarité avec des souches de référence. Selon la littérature seulement les identifications à 99-100% sont considérées comme de bonne identification en biologie moléculaire (Drancourt, 1998). Cette constatation nous montre que même la méthode de séquençage a ses limites.

Les résultats de notre recherche ont permis de mettre en évidence la présence d'un grand nombre d'espèces de SCN dans des échantillons de lait de vache. L'identification de bon nombre d'espèces de SCN telles que *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. haemolyticus* et *S. sciuri*, à partir de nos échantillons de lait de vache, nous amène à penser que ces bactéries peuvent représenter une menace pour l'industrie laitière. Les SCN furent longtemps considérées comme des bactéries opportunistes (Devriese et De Keyser, 1980; Boddie et coll., 1987) Toutefois, elles méritent beaucoup plus d'attention car le potentiel pathogène de ces bactéries et leur implication dans des cas de mammite clinique et sub-clinique chez la vache sont évoqués (Berghash et coll., 1983; Rajala-Schultz et coll., 2004; Tormo et coll., 2005; Honkanen-Buzalski et coll., 1994; Chaffer et coll., 1999).

### Analyse des résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques

Le patron de sensibilité de 73 isolats (50 provenaient de la Montérégie et 23 de la Colombie Britannique) de SCN fût déterminé par la méthode de diffusion sur gélose (Bauer et coll., 1966). Tous les isolats furent testés pour leur sensibilité à la combinaison triméthoprim/sulfaméthoxazole, la clindamycine, l'enrofloxacin, la pénicilline, la combinaison pénicilline/novobiocine, la tétracycline, l'érythromycine et l'oxacilline.

Certains de nos isolats ont présenté de la résistance envers les antibiotiques testés. Ce fut notamment le cas pour la clindamycine à laquelle trois isolats de *S. xylosus*, un de *S. equorum* et un de *S. epidermidis*; étaient résistants. Pour la pénicilline une résistance a été notée pour trois isolats de *S. xylosus*, un de *S. epidermidis*, deux de *S. chromogenes*, un de *S. capitis* et un de *S. hyicus*. Dans le cas de l'oxacilline six isolats étaient de résistance intermédiaire Il s'agit d'un isolat de *S. chromogenes*, deux *S. cohnii*, un *S. epidermidis*, un *S. hyicus* un *S. simulans*.

Une étude de sensibilité aux antibiotiques utilisant également la méthode de diffusion en gélose a été menée par Costa et coll. (1997) sur 394 isolats de *Staphylococcus*, dont 268 *Staphylococcus* coagulase-positif et 126 SCN provenant de vaches atteintes de mammite. Les résultats obtenus démontrent que 83% des SNC montraient une résistance à la pénicilline et 20% à la vancomycine. Ben Hassen (2003) quant à lui montre un pourcentage de résistance des isolats de *S. haemolyticus* à la pénicilline de 22,6% et une résistance à la tétracycline chez 20,8% des isolats de *S. epidermidis*. Les résultats obtenus par Dupont (2000) montrent une sensibilité à la novobiocine pour *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. lugdinensis* et *S. schleiferi*. De la résistance envers ce même antibiotique a été observée chez *S. cohnii*, et *S. saprophyticus* (Dupont, 2000) de même que *S. equorum*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. arlettae* (Hajek et coll. 1996). Des cas de résistance au triméthoprim sont rapportés pour *S. epidermidis* porteur du gène *ica* (Silva et coll., 2002).

Les différentes études sur la sensibilité d'isolats de staphylocoques mentionnées ci-dessus se sont déroulées dans différents pays. La fréquence d'utilisation des antibiotiques dans les fermes diffère d'un pays à un autre et d'une région à une autre. L'administration abusive d'antibiotiques, le non respect de la posologie ou une administration prolongée sont des facteurs

pouvant engendrer l'augmentation de la résistance aux antibiotiques dans une région bien déterminée.



## Conclusion

Les trois méthodes d'identification utilisées soit, l'API 20 Staph combiné à des tests conventionnels, la chromatographie en phase gazeuse et le séquençage de l'ARN ribosomal 16S, nous ont permis de faire une identification à l'espèce des isolats de SCN que nous avons récoltés.

L'identification à l'espèce avec un faible pourcentage par API 20 Staph pour certains de nos isolats peut s'expliquer par les variations dans les résultats des tests au sein d'une même espèce.

En ce qui concerne l'identification par la chromatographie en phase gazeuse, un certain nombre d'isolats semblent avoir été identifiés correctement. Toutefois, les entrées dans la base de données pour permettre les identifications ne reconnaissent peut-être pas la diversité des profils des souches d'origine bovine ce qui pourrait expliquer les faibles valeurs des indices de similarité.

L'identification par séquençage de l'ARN ribosomal 16S devrait probablement être considéré comme la méthode d'identification de référence dans le présent projet compte tenu du fait que ces gènes sont peu soumis aux variations. Toutefois, à cause des coûts associés à cette méthode elle est peu pratique à utiliser sur une base régulière. La chromatographie en phase gazeuse pourrait s'avérer un compromis acceptable pour l'identification des SNC suite à la création d'une base de données utilisant des isolats bovins identifiés au préalable par des méthodes génétiques.

## Bibliographie

Abel, K., DeSchmertzing, H., Peterson J. I. 1962. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. Feasibility of utilizing gas chromatography. Research Division, Mel. Par, Inc., Falls Church, Virginia. 1039-1044.

Agriculture et Agroalimentaire Canada. 2001. L'industrie laitière Canadienne. Ontario, Canada.

Ahren, P., Andresen, L. O. 2004. Cloning and sequence analysis of genes encoding *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin types A, B, C, and D. J. Bacteriol. 186:1833-1837.

Aldridge, K. E., Stratton, C. W., Patterson, L. S., Evans, M. E., Hodges, R. L. 1983. Comparison of the Staph-Ident system with a conventional method for species identification of urine and blood isolates of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 17:516-520.

Almeida, R. A., Oliver, S. P. 2001. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. Microbial Pathogenesis. 31:205-212.

Andresen, L. O. 1998. Differentiation and distribution of three types of exfoliative toxin produced by *Staphylococcus hyicus* from pigs with exudative epidermitis. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 4:301-310.

Andresen, L. O., Ahrens, P., Daugaard, L., Bille-Hansen, V. 2005. Exudative epidermitis in pigs caused by toxigenic *Staphylococcus chromogenes*. Vet. Microbiol. 105:291-300

Announ, N., Mattei, J. P., Jaoua, S., Fenollar, F., Sati, H., Chagnaud, C., Roudier, J., Guis, S. 2004. Multifocal discitis caused by *Staphylococcus warneri*. Joint Bone Spine 71: 408-411.



- Ben Hassen, S., Messadi Ben, L., Hassen, A. 2003. Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite. Ann. Méd. Vét.147:41-47.
- Berghash, S. R., Davidson, J. N., Armstrong, J. C., Dunny, G. M. 1983. Effects of antibiotic treatment of nonlactating dairy cows on antibiotic resistance patterns of bovine mastitis pathogens. Antimicrob. Agents Chemother. 24:771-776
- Birgersson, A., Jonsson, P., Holmberg, O. 1992. Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders. Vet. Microbiol. 31:181-189.
- Bisognano, C. 2001. Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de *Staphylococcus aureus*: étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires. Faculté des Sciences. Université de Genève. Thèses.
- Boddie, R. L., Nickerson, S. C., Owens, W. E., Watts, J. L. 1987. Udder microflora in non-lactating heifers. Agri-Practice 8:22-25.
- Cerca, N., Martins, S., Cerca, F., Jefferson, K. K., Pier, G. B., Oliveira, R., Azeredo, J. 2005. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. J. Antimicrob Chemother. 56:331-336.
- Chaffer, M, Leitner, G., Winkler, M, Glickman, A., Krifucks, O, Ezra, E, Saran, A. 1999. Coagulase-negative staphylococci and mammary gland infections in cows Zentral. Veterinar. Med. (B) 46:707-712.

Christensen, G. D., Parisi, J. T., Bisno, A. L., Simpson, W. A., Beachey, E. H. 1983.

Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 18:258-269.

Commission canadienne du lait et Agences provinciales de commercialisation du lait. Compilé par: Section laitière, AAC. Dernière révision: 9/1/2005.

Cucarella, C., Tormo, M. A., Ubeda, C., Trotonda, M. P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J. R. 2004. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immunol.* 72: 2177–2185.

Cunha, M. de L. R., S., Sinzato, Y. K., Silveira, L. V. A. 2004. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem. Inst. Oswaldo* 99: 855-860.

Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S., Wood, Jr., W. B. 1968. In *Microbiology*. HMD, Harper and Row, New York. pp. 728-740

DCEM1. 2002 – 2003. Bactériologie. Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. Service de Bactériologie.

Denamiel, G., Lorente, P., Carabella, M., Rebuelto, M., Gentilini, E. 2005. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Vet. Med. (B)* 52:1439-0450.

Devriese, L. A., De Keyser, H. 1980. Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. *J. Dairy Res.* 47:155-158.

Devriese, L. A., Baele, M., Vaneechoutte, M., Martel, A., Haesebrouck, K. 2002. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramammary infections of dairy cows. *Vet. Microbiol.* 87: 175-182.

Diarra, M. S., Petitclerc, D., Lacasse, P. 2002. Effect of lactoferrin in combination with penicillin on the morphology and the physiology of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. J. Dairy Sci. 85:1141-1149

dos Santos Nascimento, J., Fagundes, P. C., de Paiva Brito, M. A.V., Netto dos Santos, K. R., do Carmo de Freire Bastos, M. 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. Vet. Microbiol. 106:61-71.

Drancourt, M. 1998. Outils moléculaires d'identification en bactériologie. Méd. Mal. Infect. 28S: 380-382.

Drancourt, M., Raoult, D. 2002. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. J. Clin. Microbiol. 40:1333-1338.

Dupont, H. 2000. Infection à staphylocoques. Conférences d'actualisation. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, et SFAR. p. 447-463.

Durham, D. R., Kloos, W. E. 1978. Comparative study of the total cellular fatty acids of *Staphylococcus* species of human origin. Int. J. Syst. Bacteriol. 28:223-228.

Euzéby, J. P. 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. Int. J. Syst. Bacteriol., 47:590-592. (<http://www.bacterio.cict.fr/or>)

Euzéby, J. P. 1999. Caractères bactériologiques des espèces du genre *Staphylococcus*, sensibles à la novobiocine, coagulase négative (ou pouvant être coagulase négative), oxydase négative et isolées des animaux. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. Dernière mise à jour le 20 février 2004. (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdicto/ss/tstaphfelis.html>)

Euzéby, J. P. Sep. 2004. Étymologie des noms des taxons cités dans Dictionnaire de Bactériologie vétérinaire. (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/etymologies.html>)

Fitzpatrick, F, Humphreys, H., Smyth, E., Kennedy, C., O'Gara, J. P. 2002. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. J. Hosp. Inf. 52:212-218.

Fleurette, J., Bes, M., Brun, Y., Freney, J., Forey, F., Coulet, M., Reverdy, M., E., Etienne, J. 1989. Clinical isolates of *Staphylococcus lugdinensis* and *Staphylococcus schleiferi*: bacteriological characteristics and susceptibility to antimicrobial agents. Res. Microbiol. 140:107-118.

Fluit, A. D. C., Visser, M. R., Schmitz, F. 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance, J. Clin. Microbiol. Rev. 14:836-871

Freney, J., Kloos, W. E., Hajek, V., Webster, J. A., Bes, M., Brun, Y., Vernozy-Rozand, C. 1999. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:489-502.

Freney, J., Parlett, J. H., Goodfellow, M., Manchester, L., Meugnier, H., Fleurette, J. 1991. Fatty acid, polar lipid and isoprenoid quinone composition of *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. In The Staphylococci. Edited by J. Jeljaszewicz & P. Ciborowski. Zentbl Bakteriol Suppl 21:88-89.

Galdbart, J. O., Allignet, J., Tung, H. S., Ryden, C., Solh, E. I. N. 2000. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. J. Infect. Dis. 182:351-355.

Gatermann, S., Meyer, H. G. 1994. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin binds fibronectin. Infect. Immunol. 29:4556-4563.

Gemmell, C. G., Dawson, J. E. 1982. November identification of coagulase-negative staphylococci with the API Staph system. J. Clin. Microbiol. 16:874-877.

Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I., Moreno Lopez, J. 2002. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. Acta Vet. Scand. 43:221-30.

Giger, O., Charilaou, C. C., Cundy, K. R. 1984. January comparison of the API Staph-Ident and DMS Staph-Trac systems with conventional methods used for the identification of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 19:68-72.

Golodetz, C. L. 1985. Prognosis of cows with coliform mastitis. Vet. Ann. 25:78-83.

Hajek, V., Meugnier, H., Bes, M., Brun, Y., Fiedler, F., Chmela, Z., Lasne, Y., Fleurette, J., Freney, J. 1996. *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* subsp. nov, isolated from bovine nostrils. Int. J. Syst. Bacteriol. 46:792-796.

Hariharan, H., Donachie, W., Macaldowie, C., Keefe, G. 2004. Bacteriology and somatic cell counts in milk samples from ewes on a Scottish farm. Can. J. Vet. Res. 68:188-192.

Hebert, G. A., Hancock, G. A. 1985. Synergistic hemolysis exhibited by species of Staphylococci. J. Clin. Microbiol. 22:409-415.

Heikens, E., Fleer, A., Paauw, A., Florijn, A., Fluit A., C., 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative Staphylococci. J. Clin. Microbiol. 43:2286-2290.



- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., Gotz, F. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20:1083-1091.
- Hernández, J. L., Calvo, J., Sota, R., Agüero, J., Garcia-Palomo, J. D., Farinas, M. C. 2001. Clinical and microbiological characteristics of 28 patients with *Staphylococcus schleiferi* infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20:153-158.
- Honkanen-Buzalski, T., Myllys, V., Pyorala, S. 1994. Bovine clinical mastitis due to coagulase-negative staphylococci and their susceptibility to antimicrobials. *Zentral. Veterinar. Med. (B)* 41:344-350.
- Ikeda, Y., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S., Ishibashi, K., Kikuchi, K. 2004. PCR based identification of *Staphylococcus epidermidis* targeting *gseA* encoding the glutamic-acid-specific protease. *Can. J. Microbiol.* 50:493-498.
- Jean Pierre, H., Darbas, H., Jean Roussenq, A., Boyer, G. 1989. Pathogenicity in two cases of *Staphylococcus schleiferi*, a recently described species. *J. Clin. Bacteriol.* 27:2110-2111.
- Karadzhev, I., Mekhandzhiiska, L., Gerganova, E. 1981. Coagulase negative staphylococci isolated from the milk of cows with subclinical mastitis *Vet. Med. Nauki.* 18:51-54.
- Kawano, J., Shimizu, A., Saito H. Y., Yagi, M., Saito, T., Okamoto, R. 1996. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2072-2077
- Kilpper, R., Buhl, H., Schleifer, K. H. 1980. Nucleic acid homology studies between *Peptococcus saccharolyticus* and various anaerobic and facultative anaerobic Gram positive cocci. *FEMS Microbiol. Lett.* 8:205-210.

Kloos, W. E. 1986. Ecology of human skin. In Mårdh, P. A., Schleifer, K. H. (ed). Coagulase negative Staphylococci. Almqvist and Wiksell international, Stockholm, Sweden. pp. 37-50.

Kloos, W. E., Ballard, D. N., George, C. G., Webster, J. A., Hubner, R. J., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Fiedler, F., Schubert, K. 1998. Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov. comb. nov., *Macrococcus bovicus* sp. nov. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:859-877.

Kloos, W. E., Bannerman, T. L. 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin. Microbiol. Rev. 7:117-140.

Kloos, W., Schleifer, K. H. 1975. Simplified scheme for identification of human Staphylococcus species. J. Clin. Microbiol. 1:82-88.

Kloos, W. E., Schleifer, K. H. 1986. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18AL (Nom. Cons. Opin. 17 Jud. Com. 1958, 153). In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, The Williams & Wilkins Co., Baltimore. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (ed.). pp.1013-1035.

Kloos, W. E., Wolfshohl, J. F. 1982. Identification of *Staphylococcus* species with the API STAPH-Ident system. J. Clin. Microbiol. 18:509-516.

Kloos, W. E., Wolfshohl, J. F. 1991. *Staphylococcus cohnii* subspecies: *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* subsp. nov. and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:284-289.

Kloos, W. E., Schleifer, K. H., Smith, R. F. 1976. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. Int. J. Syst. Bacteriol. 26 : 22-37.

Knausz, M., Ghidan, A., Grossato, A., Rozgonyi, F. 2005. Rapid detection of methicillin resistance in teicoplanin-resistant coagulase-negative staphylococci by a penicillin-binding protein 2' latex agglutination method. *J. Microbiol. Meth.* 60: 413-416.

Kotilainen, P., Huovinen, P., Eerola, E. 1991. Application of gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acids for species identification and typing of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 29:315-322.

Kutilla, T., Suojala, L., Lehtolainen, T., Saloniemi, H., Kaartinen, L., Tähti, M., Seppälä, K., Pyörälä, S. 2004. Anti-infectants: The efficacy of bovine lactoferrin in the treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 27: 197- 202

Lohuis, J. A. C., M., Schukken, Y. H., Verheijden, J. M. H., Brand, A., Van Miert, A. 1990. Effect of severity of systole signs during the acute phase of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis on milk production losses. *J. Dairy Sci.* 73:333-341.

Ludwig, W., Schleifer, K. H., Fox, G. E., Seewaldt, E., Stackebrandt, E. 1981. A phylogenetic analysis of Staphylococci, *Peptococcus saccharolyticus* and *Mocrococcus mucilaginosus*. *J. Gen. Microbiol.* 125:357-366.

Ludwig, W., Seewaldt, E., Kilpper-Bälz, R., Schleifer, K. H., Magrum, R., Woese, C. R., Fox, G. F., Stackebrandt, E. 1985. The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Gen. Microbiol.* 131:543-551.

Marisk, F. J., Brake, S. 1982. Species identification and susceptibility to 17 antibiotics of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 15:640-645.

Marshall, S. A., Wilke, W. W., Pfaller, M. A., Jones, R. N. 1998. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence,

antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 30:205-214.

Milne, M. H., Biggs, A. M., Barrett, D. C., Young, F. J., Doherty, S., Innocent, G. T., Fitzpatrick, J. L. 2005. Treatment of persistent intramammary infections with *Streptococcus uberis* in dairy cows. *Vet. Rec.* 157:245-250.

Minnikin, D. E., Patel, P. V., Alshamaony, L., Goodfellow, M. 1977. Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27:104-117.

Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Tenover, R. C., Tenover, R. H., Bannerman, T. L. 2003. *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci That Grow Aerobically*. In *Manual of Clinical Microbiology*. 8th (ed). ASM Press, Washington DC, USA. pp. 384-404.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2001. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M 100-S10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

National Mastitis Council. 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison, WI. p. 222

O'Donnel, A. G., Nahaie, M. R., Goodfellow, M., Minnikin, D. E., Hajek, V. 1985. Numerical analysis of fatty acid profiles in the identification of staphylococci. *J. Gen. Microbiol.* 131:2023-2033.

Oren, I., Merzbach, D. 1990. Clinical and epidemiological significance of species identification of coagulase-negative staphylococci in a microbiological laboratory. *Isr. J. Med. Sci.* 26:125-128.

Otto, M. 2004. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci.* 9:841-846.

- Owen, W. E., Ray, C. H., Watts, J. L. Yancey, R. J. 1997. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 80:313–317.
- Perrin-Couilloud, I., Martel, J. L., Brouillet, P., Fedida, M. 1991. Identification et sensibilité aux antibiotiques des diverses espèces de staphylocoques associées à des mammites bovines inapparentes et subcliniques. *Rev. Méd. Vét.* 142:39-47.
- Piccolomini, R., Catamo, G., Picciani C., D'Antonio D. 1994. Evaluation of Staph system 18-R for identification of staphylococcal clinical isolates to the species level. *J. Clin. Microbiol.* 32:649-653.
- Pribram, E. 1929. A contribution to the classification of microorganisms. *J. Bact.* 18:361-394.
- Pyörälä, S., Kaartinen, L., Käck, H., Rainio, V. 1994a. Efficacy of two therapy regimens for treatment of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *J. Dairy Sci.* 77:453–461.
- Pyörälä, S., Manner, L., Kesti, E., Sandholm, M. 1994b. Local tissue damage in cows after intramuscular injections of eight antimicrobial agents. *Acta Vet. Scand.* 35:107-110.
- Rajala-Schultz, P. J., Smith, K. L., Hogan, J. S., and Love, B. C. 2004. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet. Microbiol.* 102:33-42.
- Rather, P. N., Davis, A. P., Wilkinson, B. J. 1986. Slime production by bovine milk *Staphylococcus aureus* and identification of coagulase negative staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.* 23:858-862.

Rossero, A., Koffi, n'G, Pilet, M., F., Jugiau, F., Federighi, M., Magras, C. 1999. Évaluation du portage gastrique en *Campylobacter* sp. des porcs charcutiers à l'abattoir. Journées Rech. Porcine en France, 31:391-394.

Roy, J. A., Jorgensen, J. H. 1982. Use of Mueller-Hinton agar to determine novobiocin susceptibility of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 16:1155-1156.

Roy, J. P. 2004. Évaluation de l'efficacité d'un traitement antibiotique intra- mammaire pré vèlage de chlorhydrate de pirimycine chez les taures laitières primipares. Mémoire de maîtrise. Université de Montréal.

Scheifele, D. W., Bjornson, G. L., Dyer, R. A., Dimmick, J. E. 1987. Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. Infect. Immun. 55:2268-2273.

Schleifer, K. H., Kroppenstedt, R. M. 1990. Chemical and molecular classification of staphylococci. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 69:9S-24S.

Scholl, D., Baillargeon, J., Tomita, G., Messier, S., Barkema, H., Lacasse, P. 2004. La recherche en réseau pour diminuer l'impact de la mammite et produire un lait de qualité. Symposium sur les bovins laitiers. 21 octobre 2004 Saint-Hyacinthe.

Seifert, H., Kaltheuner, M., Perdreau-Remington, F. 1995. *Micrococcus luteus* endocarditis: case report and review of literature. Zentbl. Bakteriologie. 282:431-435.

Sewell, C. M., Clarridge, J. E., Young, E. J., Guthrie, R. K. 1982. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 16:236-239.

Sincoweay, H., Miyagawa, E., Kume, T. 1981. Cellular fatty acid composition in staphylococci isolated from bovine milk. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)*. 21:14-20.

Skow, A., Mangold, K. A., Tajuddin, M., Huntington, A., Fritz, B., Richard, B. Thomson, Jr., Kaul, K. L. 2005 Species-level identification of staphylococcal isolates by real-time PCR and melt curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* 43:2876–2880.

Smith, K. L., Hogan, J.S., 2001. The world of mastitis. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Mastitis and Milk Quality*, Vancouver, BC, Canada, pp. 1–12

Soltys, J., Quinn, M. T. 1999. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infect. Immun.* 67:6293–6302.

Songlin, Z., Maddox, C. W. 2000. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infect. Immun.* 68:1102–1108.

Statistique Canada, CCL (Commission canadienne du lait). 2005. Population et ventes de lait effectuées par les laiteries. Ventes de dernière utilisation déclarées par les usines.

Stoakes, L., John, M. A., Lannigan, R., Schieven, B. C., Ramos, M., Harley, D. and Hussain, Z. 1994. Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 32:1908-1910.

Tormo, A. M., Knecht, E., Gotz, F., Lasa, I., Penades, J. R. 2005. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiol.* 151:2465–2475.

Vuong, C., Kidder, J. B., Jacobson, E. R., Otto, M., Proctor, R. A., Somerville, G. A. 2005. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress. *J. Bacteriol.* 187:2967-2973.

Vuong, C., Voyich, J. M., Fischer, E. R., Braughton, K. R., Whitney, A. R., DeLeo, F. R., and Otto, M. 2004. Polysaccharide intercellular adhesion (PAI) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* 6:269-275.

Watts, J. L., Owens, W. E. 1987. Synergistic hemolysis associated with coagulase negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. *J. Clin. Microbiol.* 25:2037-2039.

Weinstein, M. P., Mirrett, S., Van Pelt, L., McKinnon, M., Zimmer, B., L., Kloos, W., Reller, L. B. 1998. Clinical importance of identifying coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of MicroScan Rapid and Dried Overnight Gram-Positive panels versus a conventional reference method. *J. Clin. Microbiol.* 36:2089-2092.

Welch, D. F. 1991. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:422-438.

Wieser, M., Busse, H. J. 2000. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1087-1093.

Younis, A., Krifucks, O., Heller, E. D., Samra, Z., Glickman, A., Saran, A., Leitner, G. 2003. *Staphylococcus aureus* exosecretions and bovine mastitis. *J. Vet. Med.* 50:1-7.



## Annexe 1

### ALIGNEMENT DES SÉQUENCES LES SÉQUENCES DES SOUCHES DE LA MONTÉRÉGIE

#### Alignement des souches de *S. simulans*

27 - 27F AATAGCAACC TTCGAGAGCC AACTCCTCT TGGTAATTAA TGACATAACT CGCACGAACT TTGCAAATTC  
ACTGAAATGA CGATCTATCG CTGTTTCTC TTTGATAGAC GCGGCGCGCT GATACGGTCC CATGTACGCT GATCAACTAG  
ATCGGCCCT CAGCCCTCAA CTGTACCTAT ACTCATGATT CTAGCGCTCC

38 - 27F GGGGGTG CTATCATGCA GTCGAGCGA- CAGACGAGGA GCTTGCTCCT CTGACGTTAA C-GGCGGACG GG-TGAGTAA  
CACGTGGG-- -TAACCTACC TATA----AG ACTGGGATAA

39 - 27F --G CTATCATGCA GTCGAGCGA- CAGACGAGGA GCTTGCTCCT CTGACGTTAG C-GGCGGACG GG-TGAGTAA  
CACGTGGG-- -TAACCTACC TATA----AG ACTGGGATAA

40 - 27F --GGCGGTG CTATCATGCA GTCGAGCGA- CAGACGAGGA GCTTGCTCCT CTGACGTTAG C-GGCGGACG GG-  
TGAGTAA CACGTGGG-- -TAACCTACC TATA----AG ACTGGGATAA

41 - 27F -G CTATCATGCA GTCGAGCGA- CAGACGAGGA GCTTGCTCCT CTGACGTTAG C-GGCGGACG GG-TGAGTAA  
CACGTGGG-- -TAACCTACC TATA----AG ACTGGGATAA

14- 27F -GA CGTCAGCGA- CAGACGAGGA GCTTGCTCCT CTGACGTTAG C-GGCGGACG GG-TGAGTAA TACGTGGG-- -  
TAACCTACC TATA----AG ACTGGGATAA

16 - 27 --GGCACAGA GCTTG-TCCT CTGACGTTAG C-GGCGGACG GG-TGAGTAA CACGTGGG-- -TAACCTACC TATA----AG  
ACTGGGATAA

29 - 27F --AACAGGC GCTTGCTCCT CTG-CGTTAG C-GGCGGACG GG-TGAGTAA CACGTGGG-- -TAACCTACC TATA----AG  
ACTGGGATAA

30 - 27F -T CCCGTGGG-- -TACCACCTC TATA----- -CTGGGATAA

27 - 27F CCACCCATC TCCCCATGA GAAGTCGTAA TGATAGGTAT GATTACCATA GCCTTCTGCG TATCGTTGTC  
ATGCGCAACA TTATGTCTTG TCACCACTTG CGTAGGTACT CAGAGAATAT ATCTGATGTC TGAACGCTAA CAGGTGAGCG  
AAACCACTAG CTCGGAGCCG CTGATCTTTT TTTGTCCGGA GCTGAACCTC

38 - 27F CTCCGGGAAA TCGGGGCTAA TACCGG-ATA AACTATGAT AACCAGCA--- ----TGGTTT CTCTGTGTGA AAGACGGTTT  
TGC-TGTCAT TTACAGATGG ACCCACCTCG CGTATTAGCT ACTTGGAAT GTATCC--GC TTCCCCCAGG CCAA----- ---  
CGATACA TAGCCTAC-T ATGAATATGG TGATCAG--C

39 - 27F CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGG-ATA ACAC-ATGA- AACCAGCA--- ----TGGTTT CATGATG--A AAGACGGTTT  
TGC-TGTCAC TTATAGATGG ACCCGC--GG CGTATTAGCT AGTTGGTAAG GTAACG--GC TTACCAAGG- -CAA----- ---CGATACG  
TAGCCGAC-- -CTGAGAGGG TGATCGG--C

40 - 27F CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGG-ATA ACAC-ATGA- AACCAGCA--- ----TGGTTT CATGATG--A AAGACGGTTT  
TGC-TGTCAC TTATAGATGG ACCCGC--GG CGTATTAGCT AGTTGGTAAG GTAACG--GC TTACCATCG- -CAA----- ---CGATACA  
TTACCCATAC CTCAAGAGGG TGATCGG--C

41 - 27F CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGG-ATA ACAC-ATGA- AACCAGCA--- ----TGGTTT CATGATG--A AAGACGGTTT  
TGC-TGTCAC TTATAGATGG ACCCGC--GG CGTATTAGCT AGTTGGTAAG GTAACG--GC TTACCAAGG- -CAA----- ---CGATACG  
TAGCCGAC-- -CTGAGAGGG TGATCGG--C

14- 27F CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGG-ATA ACAC-ATGA- AACCGCA--- ----TGGTTT CATGATG--A AAGACGGTTT  
TGC-TGTAC TTATAGATGG ACCCGC--GG CGTATTAGCT AGTTGGTAAG GTAACG--GC TTACCAAGG- -CAA----- ---CGATACG  
TAGCCGAC-- -CTGAGAGGG TGATCGG--C

16 - 27 CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGG-ATA ACAC-ATGA- AACCGCA--- ----TGGTTT CATGATG--A AAGACGGTTT  
TGC-TGTAC TTATAGATGG ACCCGC--GG CGTATTAGCT AGTTGGTAAG GTAACG--GC TTACCAAGG- -CAA----- ---CGATACG  
TAGCCGAC-- -CTGAGAGGG TGATCGG--C

29 - 27F CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGG-ATA ANAC-ATGA- AACCGCA--- ----TGGTTT CATGATG--A AAGACGGTTT  
TGC-TGTAC TTATAGATGG ACCCGC--GG CGTATTAGCT AGTTGGTAAG GTAACG--GC TTACCAAGG- -CAA----- ---CCATACC  
TACCCGAC-- -CTGAGAGGG TGATCGG--C

30 - 27F CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGG-ATA ACAC-ATGA- AACCGCA--- ----TGGTTT CATGATG--A AAGACGGTTT  
TGC-TGTAC TTATAGATGG ACCCGC--GG CGTATTAGCT AGTTGGTAAG GTAACG--GC TTACCAAGG- -CAA----- ---CGATACG  
TAGCCGAC-- -CTGAGAGGG TGATCGG--C

27 - 27F TTCAAATCA CCGCCACGG GTCAGGCGTA ACACGGAGGC ACCTTCCCC TTATTGATCT TCTGATACAT  
CAGATTCATA TATATGAGCT TCATAAGATA

### Alignement des souches de *S. cohnii*

35 - 27F GCTATCATGC AGTC-AGCGA CAGATAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TGCCGGATAA CATTAGAAC CGCATGGTTC

B8 GCTATCT--C AGTCAGCGA CTGATAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC  
TACCTATAAG ACTGGGATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TACCGGATAA TATTTGAAC CGCATGGTTC

B11 48 - 27 GCNANCATGC AGTCAGCGA CAGATAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TGCCGGATAA CATTAGAAC CGCATGGTTC

D1 #20 - 27 ----- ---CANGCNA CN-ATAGGG- CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC  
TACCTATAAG ACTGGAATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TGCCGGATAA CATTAGAAC CGCATGGTTC

C11 #18 - 2 ----- ----CNNCNA CN-ATAGGG- CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC  
TACCTATAAG ACTGGAATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TGCCGGATAA CATTAGAAC CGCATGGTTC

D2 #21 - 27 -----C CGTCNCGGA CAGATAGGA- CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TGCCGGATAA CATTAGAAC CGCATGGTTC

19 - 27F ----- -----GA ACNNTAGGN- CTTGCTCCTT TG-CGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC  
TACCTATAAG ACTGGAATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TGCCGGATAA CATTAGAAC CGCATGGTTC

C10 #17 - 2 -----GA NGTC-NGCGA CAGATAGGA- CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TGCCGGATAA CATTAGAAC CGCATGGTTC

35 - 27F TAAAGTGAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC  
GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGTAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGAAC TACTGACGGT CCAGACTCCT

B8 GATAGTGAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA  
GGCGACGATA CGTAGCCGAC CTG-AGAGGG TGATCGGCCA CACTGGAAC TACTGACGGT CCAGACTCCT

B11 48 - 27 TAAAGTGAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC  
GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTG-AGAGGG TGATCGGCCA CACTGGAAC TACTGACGGT CCAGACTCCT

D1 20 - 27 TAAAGTGAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC  
GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTG-AGAGGG TGATCGGCCA CACTGGAAC TACTGACGGT CCAGACTCCT

**C11 18 - 2** TAAAGTGAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC  
GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTG-AGAGGG TGATCGGCCA CACTGGAAC T GAGACACGGT CCAGACTCCT

**D2 21 - 27** TAAAGTGAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC  
GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTG-AGAGGG TGATCGGCCA CACTGGAAC T GAGACACGGT CCAGACTCCT

**19 - 27F** TAAAGTGAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC  
GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTG-AGAGGG TGATCGGCCA CACTGGAAC T GAGACACGGT CCAGACTCCT

**C10 17 - 2** TAAAGTGAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC  
GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTG-AGAGGG TGATCGGCCA CACTGGAAC T GAGACACGGT CCAGACTCCT

**35 - 27F** ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGGCGAAA GCCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGATG  
AAGGTCTTCG GATCGTAAAA CTCTGTTATT AGGGAA-GAA CAAATGTGTA AGTAACTATG CAC-GTCTTG ACGGTACCTA

**B8** ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGGCGAAA GCCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGATG  
AAGGTCTTCG GATCGTAAAA CTCTGTTATT AGGGAA-GAA CATACTGTGTA AGTAACTATG CAC-GTCTTG ACGGTACNTA

**B11 48 - 27** ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGGCGAAA GCCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGATG  
AAGGTCTTCG GATCGTAAAA CTCTGTTATT AGGGAA-GAA CAAATGTGTA AGTAACTATG CAC-GTCTTG ACGGTACCTA

**D1 20 - 27** ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGGCGAAA GCCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGATG  
AAGGTCTTCG GATCGTAAAA CTCTGTTATT AGGGAA-GAA CAAATGTGTA AGTAACTATG CAC-GTCTTG ACGGTACCTA

**C11 18 - 2** ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGGCGAAA GCCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGATG  
AAGGTCTTCG GATCGTAAAA CTCTGTTATT AGGGAA-GAA CAAATGTGTA AGTAACTATG CAC-GTCTTG ACGGTACCTA

**D2 21 - 27** ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGGCGAAA GCCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGATG  
AAGGTCTTCG GATCGTAAAA CTCTGTTATT AGGGNAAGAA CAAATGTGTA AGTAACTATG CACCNTCTTG ACCGTACCTA

**19 - 27F** ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGGCGAAA GCCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGATG  
AAGGTCTTCG GATCGTAAAA CTCTGTTATT AGGGAA-GAA CAAATGTGTA AGTAACTATG CAC-GTCTTG ACGGTACCTA

**C10 17 - 2** ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGGCGAAA GCCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGATG  
AAGGTCTTCG GATCGTAAAA CTCTGTTATT AGGGAA-GAA CAAATGTGTA AGTAACTATG CAC-GTCTTG ACGGTACCTA

**35 - 27F** ATCAG-AAAG CCACGGC-TA ACTACGTGCC AGCCGCCCGC GGGTAATTCA AACCACG--- -

**B8** ATCAG-AAAG CCACGGC-TA ACTACGTGCC AGNNCCCCCN GGGTGATACA A-

**B11 48 - 27** ATCAG-AAAG CCACGGC-TA ACTACGTGCC AGCCGCCCGC GG-TAATNCA AA -

**D1 #20 - 27** ATCAG-AAAG CCACGGC-TA ACTACGTGCC AGCCCCNNC GG-NGGTNCA A-- -

**C11 18 - 2** ATCAG-AAAG CCACGGC-TA ACTACGTGCC AGCCCCCGCC GG-TGATNCA A-- -

**D2 21 - 27** ATCANCAAAN CCACGGNCTA ACTNCTTGCC ANCCCCCAC GAGTG

**19 - 27F** ATCAG-AAAG C----- -

**C10 17 - 2** ATCAG-AAAG CCACGGC-TA ACTACGTGCC AGCCGCCCGC CGGT----- -

Alignement des souches de *S. xylosus*

**43 - 27F** GCTATCATGC AGTCGAGCGA CGGATAGGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGGATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TACCGGATAA CATTTAGAAC CGCATGGTTC  
TAAAGTGAAG GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT

**44 - 27F** GCTATCATGC AGTC-AGCGA CAGATAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGGATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TACCGGATAA CATTTGGAAC CGCATGGTTC  
TAAAGTGAAG GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT

**46 - 27F** GCTATCATGC AGTCGAGCGA CGGATAGGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGGATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TACCGGATAA CATTTAGAAC CGCATGGTTC  
TAAAGTGAAG GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT

**1 - 27F** GCTATCATGC AGTCGAGCGA CGGATAGGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGGATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TACCGGATAA CATTTAGAAC CGCATGGTTC  
TAAAGTGAAG GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT

**B7 2 - 27** GCTATCATGC AGTCGAGCGA CGGATAGGAG CTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGGATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TACCGGATAA CATTTAGAAC CGCATGGTTC  
TAAAGTGAAG GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT

**43 - 27F** TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCGACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC  
ACTGGAAGT AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAAG CCTGACGGAG  
CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTA AAAAC TCTGTTATTA

**44 - 27F** TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC  
ACTGGAAGT AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAAG CCTGACGGAG  
CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTA AAAAC TCTGTTATTA

**46 - 27F** TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCGACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC  
ACTGGAAGT AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAAG CCTGACGGAG  
CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTA AAAAC TCTGTTATTA

**1 - 27F** TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCGACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC  
ACTGGAAGT AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAAG CCTGACGGAG  
CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTA AAAAC TCTGTTATTA

**B7 2 - 27** TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCGACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC  
ACTGGAAGT AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAAG CCTGACGGAG  
CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTA AAAAC TCTGTTATTA

**43 - 27F** GGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC  
GTGCCAGCCG CCCC-CGGT AATACAAAAC CG----

**44 - 27F** GGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC  
GTGCCAGCCG CCCG-CGGT AATACAAAAA CGCCCG

**46 - 27F** GGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC  
GTGCCAGCCG CCCG-CGGT AATACAAAATA TCCC--

**1 - 27F** GGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC  
GTGCCAGCCC CCCCCGGGT AATACAAAAC CG----

**B7 2 - 27** GGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC  
GTGCCAGCCC CCCC-CGGT AATCAAACC G----

Alignement des souches de *S. vitulinus*

11 - 27F GCGCTGCAGA GCTTGCCTT TCGTTAGCG GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGTAACCT ACCTATAAGA  
CTGGAATAAC TCCGGGAAAC CGGGGCTAAT GCCGGATAAC ATATCGAACC GCATGGTTCG ATAGTAAAAG ACGGTNTTGC  
TGCACTTAT AGATGGACCC GCGCCGTATT AGCTAGTTGG TGAGGTAACG

11 - 27F GCTCACCAAG GCGACGATAC GTAGCCGACC TGAGAGGGTG ATCGGCCACA CTGGAAGTGA GACACGGTCC  
AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTCCGCAAT GGGCGAAAGC CTGACGGAGC AACGCCGCGT GAGTGATGAA  
GGTCTTCGGA TCGTAAAGCT CTGTTGTTAG GGAAGAACAA ATGTGTAAGT

11 - 27F AACTGTGCAC ATCTTGACGG TACCTAACCA GAAAGCCACG GCTAACTACG TGCCAGCNCC CNCCGGGTGA  
TACAAANNNN NN

Alignement des souches de *S. equorum*

42 - 27F42 -----GCT ATCATGCA-G TCGAGCGA-C GGATA-GGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTTCCGGAAA CCGGAGCTAA TGCCGATAA C-ATTTGGAA CCGCATGGTT  
CTAAA-GTAA AAGATGG-TT TTGCTATCAC TTATAGATGG

B10 47 - 2 -----GCT ATCATGCAAG TCGAGCGA-C GGATA-GGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG  
TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTTCCGGAAA CCGGAGCTAA TGCCGATAA C-ATTTGGAA  
CCGCATGGTT CTAAA-GTAA AAGATGG-TT TTGCTATCAC TTATAGATGG

36 - 27F\* -----GCA ATCCTGCA-G TCGAGCGA-C GGATA-GGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTTCCGGAAA CCGGAGCTAA TGCCGATAA C-ATTTGGAA CCGCATGGTT  
CTAAA-GTAA AAGATGG-TT TTGCTATCAC TTATAGATGG

50 - 27F -----GATG TC-ACCGA-C GG-TA-GGT- CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTTCCGGAAA CCGGAGCTAA TGCCGATAA C-ATTTGGAA CCGCATGGTT  
CTAAA-GTAA AAGATGG-TT TTGCTATCAC TTATAGATGG

37 - 27F GCGGGTGCT ATCATGCA-G TCGAGCGAAC GGATAAGGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG  
TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTTCCGGAAA CCGGAGCTAA TGCCGATAA CCATTTGGAA  
CCGCATGGTT CTAAATGTAA AAGATGGTT TTGCTACCAC TTATAGATGG

42 - 27F42 ACCCGCGCCG TATTAGCTAG TTGTAAGGT AACGGCTTAC CAAGGCAACG ATACGTAGCC GACCTGAGAG  
GGTGATCGGC CACTGGA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGC-AGTAG GG---AATCT TCCGCAATGG  
ACGAAAGTCT GACGGAGCAA CGCC-GCGTG AGTGATGAAG GTTTTCCG-A

B10 47 - 2 ACCCGCGCCG TATTAGCTAG TTGTAAGGT AACGGCTTAC CAAGGCAACG ATACGTAGCC GACCTGAGAG  
GGTGATCGGC CACTGGA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGC-AGTAG GG---AATCT TCCGCAATGG  
ACGAAAGTCT GACGGAGCAA CGCC-GCGTG AGTGATGAAG GTTTTCCG-A

36 - 27F\* ACCCGCGCCG TATTAGCTAG TTGTAAGGT AACGGCTTAC CAAGGCAACG ATACGTAGCC GACCTGAGAG  
GGTGATCGGC CACTGGA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGC-AGTAG GG---AATCT TCCGCAATGG  
ACGAAAGTCT GACGGAGCAA CGCC-GCGTG AGTGATGAAG GTTTTCCG-A

50 - 27F ACCCGCGCCG TATTAGCTAG TTGTAAGGT AACGGCTTAC CAAGGCAACG ATACGTAGCC GACCTGAGAG  
GGTGATCGGC CACTGGA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCCAGTAG GGG---AATCT TCCGCAATGG  
ACGAAAGTCT GACGGACCAA CGCCCGGTG AGTGATGAAG GTTTTCCGAA

37 - 27F ACCCGCGCCT TCTTATCC-- ----TAATTT GACCACCGTT CCCGGCGTTG AGTCAAGGGC ACTCCTCTAC CTTACC--C  
CACTCCA- CTATGACTGC TACCTGCTAT TCTCGTTGTT CTGCTATCAC CCCACGATAC AATACCATAT ATCATAGACT  
GCCTATATTT CGCC--CTCA TCTTACCTGA TTTGTCCG--

42 - 27F42 TCGTAAACT CTGTTATTAG GGAAGAACAA ATGTG---TA AGTAACTGTG CACATCTTGA --CGGTACCT --  
AATCAGAA A-GCCA-CGG CT-AACT-AC GTG--CCAGC CGCCGGCCCG T-AATACAAA ACCCCCTG-- ---

B10 47 - 2 TCGTAAACT CTGTTATTAG GGAAGAACAA ATGTG---TA AGTAACTGTG CACATCTTGA --CGGTACCT --  
AATCAGAA A-GCCA-CGG CT-AACT-AC GTG--CCAGC CGCCGGCCGG TGAATACAAA AGGCCCG--- ---

36 - 27F\* TCGTAAACT CTGTTATTAG GGAAGAACAA ATGTG---TA AGTAACTGTG CACATCTTGA --CGGTACCT --  
AATCAGAA A-GCCA-CGG CT-AACT-AC GTG--CCAGC CGCCG--CGG T-AATACAAG GAGACC---- ---

50 - 27F TCCTAAACT CTGTTACTAG GGAAATACAA AATCGCGCTA TGACTCTGTG CCCATCTTAG GCCGGTGACT  
TTAATTA AAA ACGCCGGCCG CTAACTCGC GTGGCCTATC TCCCCACCA TGATCTCCAC GCTTCCCCTT CTC

37 - 27F -CCCAGGCCT TCCTCAGTAT CTC-----  
-----

### Alignement des souches de *S. chromogenes*

7 - 27F ----- GCTATCTGCA GTCGAGCGAC TGACGAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC  
GGCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAAT-A ACTCC-GGGA AACCAGGGCT AATGCC--GG  
ATAACAT-AT CGAACCG-CA

C1 8 - 27 -----GA CGTCAGCGAC TG-CGAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC  
GGCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAAT-A ACTCC-GGGA AACCAGGGCT AATGCC--GG  
ATAACAT-AT CGAACCG-CA

9 - 27F ----- --CACGGAC TG-CA--GAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC  
GGCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAAT-A ACTCC-GGGA AACCAGGGCT AATGCC--GG  
ATAACAT-AT CGAACCG-CA

10 - 27F ----- -G-CA--GAC CTTGCTCCTT TG-CGTT-C GGCGGACGGG  
TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAAT-A ACTCC-GGGA AACCAGGGCT AATGCC--GG ATAACAT-AT  
CGAACCG-CA

11 - 27F -----GCGC TG-CA--GAG CTTG-TCCTT TG-CGTTAGC GGCGGACGGG  
TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAAT-A ACTCC-GGGA AACCAGGGCT AATGCC--GG ATAACAT-AT  
CGAACCG-CA

12 - 27F -----GA TGTGGCGAC TG-CGAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC  
GGCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAAT-A ACTCC-GGGA AACCAGGGCT AATGCC--GG  
ATAACAT-AT CGAACCG-CA

13 - 27F ----- --AAGCGAC TG-CA--GAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC  
GGCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAAT-A ACTCC-GGGA AACCAGGGCT AATGCC--GG  
ATAACAT-AT CGAACCG-CA

15 - 27F AGAGAGGGGG AATAGGGCAG CAGGTCCCAT CTCTGGTCT TTTCTTTCCA CTTTCCAAG TCGAGCGAAC  
TGACGAGGAG CTTGCTCCTT TGATGTTAGC GGCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGTATCA  
ACTCCCAGGGA AACCAGGGCT ATTGCTATGT ATAACATGAT CGAATTGTCA

7 - 27F TGGTT-CGAT AGTGAAAGAC ----GGTCT TGCTGTCACT TATAGATGGA CCCGCGCCGT ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA  
ACGGCTCACC AAGGCAACGA TACGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC AACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC  
TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA

C1 8 - 27 TGGTT-CGAT AGTGAAAGAC ----GGTCT TGCTGTCACT TATAGATGGA CCCGCGCCGT ATTAGCTAGT  
TGGTGAGGTA ACGGCTCACC AAGGCAACGA TACGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC AACTGGAAC TGAGACACGG  
TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA

9 - 27F TGGTT-CGAT AGTGAAAGAC ----GGTCT TGCTGTCACT TATAGATGGA CCCGCGCCGT ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA  
ACGGCTCACC AAGGCAACGA TACGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC AACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC  
TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA

10 - 27F TGGTT-CGAT AGTGAAAGAC ----GGTCT TGCTGTCACT TATAGATGGA CCCGCGCCGT ATTAGCTAGT  
TGTTGAGGTA ACGGCTCACC AAGGCAACGA TACGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC AACTGGAAAC TGAGACACGG  
TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA

11 - 27F TGGTT-CGAT AGTGAAAGAC ----GGTCT TGCTGTCACT TATAGATGGA CCCGCGCCGT ATTAGCTAGT  
TGTTGAGGTA ACGGCTCACC AAGGCGACGA TACGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC AACTGGAAAC TGAGACACGG  
TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA

12 - 27F TGGTT-CGAT AGTGAAAGAC ----GGTCT TGCTGTCACT TATAGATGGA CCCGCGCCGT ATTAGCTAGT  
TGTTGAGGTA ACGGCTCACC AAGGCAACGA TACGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC AACTGGAAAC TGAGACACGG  
TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA

13 - 27F TGGTT-CGAT AGTGAAAGAC ----GGTCT TGCTGTCACT TATAGATGGA CCCGCGCCGT ATTAGCTAGT  
TGTTGAGGTA ACGGCTCACC AAGGCAACGA TACGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC AACTGGAAAC TGAGACACGG  
TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA

15 - 27F TGATTTTCGAT CTTTGAATAC ATTGAGGTGT TGCTGTC-CT CTCAGTTTAA TGGCTCCCGC GGGCGCGAAT T--  
TAGCTTA GTTG--GATG AAGGATATCG TGCCTCATTA ATGGCCAAAC GGGTTCCGTT AGA-TGGACC TCGAAGAGGG A--  
GGACTCC GTCCC---T ACCCATGGTG A---CTCGGG TACGAATGAA

7 - 27F AGCCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCG-TAA AGCTCTGTTG TTAGGGAAGA  
ACAAATGTGT AAGTAACTGT GCACATCTTG ACGGTACCTA ACCAGAAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CCCCCCCC-  
GGGGAATACA AAACCCCG

C1 8 - 27 AGCCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCG-TAA AGCTCTGTTG TTAGGGAAGA  
ACAAATGTGT AAGTAACTGT GCACATCTTG ACGGTACCTA ACCAGAAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CCCCCCCC  
GGGGGATACA AAACCCCG

9 - 27F AGCCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCG-TAA AGCTCTGTTG TTAGGGAAGA  
ACAAATGTGT AAGTAACTGT GCACATCTTG ACGGTACCTA ACCAGAAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CCCCCGCC-- GG-  
TGATAACA AAACCCCG

10 - 27F AGCCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCG-TAA AGCTCTGTTG TTAGGGAAGA  
ACAAATGTGT AAGTAACTGT GCACATCTTG ACGGTACCTA ACCAGAAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CCCCCCCC--  
GGGTGATACA AAGCGCA-

11 - 27F AGCCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCG-TAA AGCTCTGTTG TTAGGGAAGA  
ACAAATGTGT AAGTAACTGT GCACATCTTG ACGGTACCTA ACCAGAAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CCCCCCCC--  
GGGTGATACA AAATCTCG

12 - 27F AGCCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCG-TAA AGCTCTGTTG TTAGGGAAGA  
ACAAATGTGT AAGTAACTGT GCACATCTTG ACGGTACCTA ACCAGAAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CCCCCCCC--  
CGGTGATTCA ACCCC---

13 - 27F AGCCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCG-TAA AGCTCTGTTG TTAGGGAAGA  
ACAAATGTGT AAGTAACTGT GCACATCTTG ACGGTACCTA ACCAGAAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CCCCCCCC--  
CGGGGGTACA AAACCCCA

15 - 27F CATCAAGGGA ACTATTACCG GATTAGCGCT TCAGAGCTTA GGAGAAATAC ATCTCGACC CGAGGGCCTA  
AGAAGCTAGG GACGTGGTAC GTGCATCTCG CCATCGATAA CCTGTATTG- -----

### Alignement des souches de *S. saprophyticus*

32 - 27F GCTATCATGC AGTCGAGCGA CAGATAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GGCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGGATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TACCGGATAA CATTGGAAC CGCATGGTTT  
TAAAGTGAAG GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT

31 - 27F -----G AGTC-AGCGA CA-ATAGGC- CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GGCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC  
TACCTATAAG ACTGGGATAA CTTCCGGAAA CCGGAGCTAA TACCGGATAA CATTGGAAAC CGCATGGTTC TAAAGTGAAA  
GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC CGCGCCGTAT

32 - 27F TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCGACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC  
ACTGGAACCTG AGACACGGTC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAAG CCTGACGGAG  
CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTAAAAC TCTGTTATTA

31 - 27F TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC  
ACTGGAACCTG AGACACGGTC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAAG CCTGACGGAG  
CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTAAAAC TCTGTTATTA

32 - 27F GGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CGTCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC  
GTGCCAGCCG CCCGCGGTAA TTCAAA-AGC TG--

31 - 27F GGAAGAACA AANGTGTGTAAG TAACTGTGCA CGTCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC  
GTGCCAGCCG CCCGCGGTAA TACAGGCCGC CGGC

### Alignement des souches de *S. sciuri*

33 - 27F GTGACGTGCT ATCATGCAGT CGAGCGACAG ATGAGAAGCT TGCTTCTCTG ATGTTAGCGG CGGACGGGTG  
AGTAACACGT GGGTAACCTA CCTATAAGAC TGGGATAACT CCGGGAAACC GGGGCTAATA CCGGATAATA TTTGAACCG  
CATGGTTCAA TAGTAAAAGA CGGTTTCGGC TGTCATTAT AGATGGACCC

33 - 27F GCGCCGATT AGCTAGTTGG TAAGGTAACG GCTTACCAAG GCGACGATAC GTAGCCGACC TGAGAGGGTG  
ATCGGCCACA CTGGAACCTA GACACGGTCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTCCGCAAT GGGCGAAAGC  
CTGACGGAGC AACGCCCGT GAGTGATGAA GGTCTTCGGA TCGTAAAAC

33 - 27F CTGTTGTTAG GGAAGAACA ATTTGTTAGT AACTGAACA GTCTTGACGG TACCTAACCA GAAAGCCACG  
GCTAACTACG TGCCAGCCGC CCGCGGTAAT ACAAACAAT CA

### Alignement des souches de *S. haemolyticus*

3 - 27F GCTATCTCAG TCGAGCGACT GATAGGAGCT TGCTCCTTTG ACGTTAGCGG CGGACGGGTG AGTAACACGT  
GGGTAACCTA CCTATAAGAC TGGGATAACT TCGGGAAACC GGAGCTAATA CCGGATAATA TTTCGAACCG CATGGTTCCA  
TAGTAAAAGA TGGTTTTGCT ATCACTTATA GATGGACCCG CGCCGTATTA

3 - 27F GCTAGTTGGT AAGGTAACGG CTTACCAAGG CGACGATACG TAGCCGACCT GAGAGGGTGA TCGGCCACAC  
TGGAACCTGAG ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTAGGGAATC TTCCGCAATG GGCAGAAAGCC TGACGGAGCA  
ACGCCGCGTG AGTGATGAAG GTCTTCGGAT CGTAAAACCT TGTTATTAGG

#3 - 27F GAAGAACATA CGTGTAAGTA ACTGTGCACG TCTTGACGGT ACCTAATCAG AAAGCCACGG CTAACCTACGT  
GCCAGCCCCC CCGGGTGAT ACAAACC GC

### Alignement des souches de *S. epidermidis*

4 - 27F GCTATCATGC AGTCGAGCGA CAGACGAGGA GCTTGCTCCT CTGACGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA  
CGTGGATAAC CTACCTATAA GACTGGGATA ACTTCGGGAA ACCGGAGCTA ATACCGGATA ACATGTTGAA CCGCATGGTT  
CAACAGTGAA AGACGGTCTT GCTGTCATT ATAGATGGAT CCGCGCCGCA



5 - 27F GCTATCATGC AGTCGAGCGA CAGACGAGGA GCTTGCTCCT CTGACGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA  
CGTGGATAAC CTACCTATAA GACTGGGATA ACTTCGGGAA ACCGGAGCTA ATACCGGATA ACATGTTGAA CCGCATGGTT  
CAACAGTGAA AGACGGTCTT GCTGTCACTT ATAGATGGAT CCGCGCCGCA

6 - 27F GCTATC-TGC AGTCGAGCGA CAGACGAGGA GCTTGCTCCT CTGACGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA  
CGTGGATAAC CTACCTATAA GACTGGGATA ACTTCGGGAA ACCGGAGCTA ATACCGGATA ACATGTTGAA CCGCATGGTT  
CAACAGTGAA AGACGGTCTT GCTGTCACTT ATAGATGGAT CCGCGCCGCA

22 - 27 -----GA CGTC-AGCGA CC-ACGAGGA GCTTGCTCCT CTGACGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA CGTGGATAAC  
CTACCTATAA GACTGGGATA ACTTCGGGAA ACCGGAGCTA ATACCGGATA ATATATTGAA CCGCATGGTT CAATAGTGAA  
AGACGGTTTT GCTGTCACTT ATAGATGGAT CCGCGCCGCA

23 - 27 -----GA CGTC-AGCGA CT-GCGAGGA GCTTGCTCCT TTGACGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA CGTGGGTAAC  
CTACCTATAA GACTGGAATA ACTCCGGGAA ACCGGGGCTA ATGCCGGATA ACATATCGAA CCGCATGGTT CGATAGTGAA  
AGACGGTCTT GCTGTCACTT ATAGATGGAC CCGCGCCGTA

25 - 27F -----GA CGTC-AGCGA CC-AC-AGGA GCTTGCTCCT CTGACGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA CGTGGATAAC  
CTACCTATAA GACTGGGATA ACTTCGGGAA ACCGGAGCTA ATACCGGATA ACATGTTGAA CCGCATGGTT CAACAGTGAA  
AGACGGTCTT GCTGTCACTT ATAGATGGAT CCGCGCCGCA

26 - 27F -----GA CGTC-AGCGA CA-ACGAGGA GCTTGCTCCT CTGACGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA CGTGGATAAC  
CTACCTATAA GACTGGGATA ACTTCGGGAA ACCGGAGCTA ATACCGGATA ATATATTGAA CCGCATGGTT CAATAGTGAA  
AGACGGTTTT GCTGTCACTT ATAGATGGAT CCGCGCCGCA

4 - 27F TTAGCTAGTT GGTAAGGTAA CGGCTTACCA AGGCAACGAT GCGTAGCCGA CCTGAG-AGG GTGATCGGCC  
ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA AGCCTGACGG  
AGCAACGCCG CGTGAGTGAA GAAGGTCTTC GGATCGTAAA ACTCTGTTAT

5 - 27F TTAGCTAGTT GGTAAGGTAA CGGCTTACCA AGGCAACGAT GCGTAGCCGA CCTGAG-AGG GTGATCGGCC  
ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA AGCCTGACGG  
AGCAACGCCG CGTGAGTGAA GAAGGTCTTC GGATCGTAAA ACTCTGTTAT

6 - 27F TTAGCTAGTT GGTAAGGTAA CGGCTTACCA AGGCAACGAT GCGTAGCCGA CCTGAG-AGG GTGATCGGCC  
ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA AGCCTGACGG  
AGCAACGCCG CGTGAGTGAA GAAGGTCTTC GGATCGTAAA ACTCTGTTAT

22 - 27 TTAGCTAGTT GGTAAGGTAA CGGCTTACCA AGGCAACGAT GCGTAGCCGA CCTGAG-AGG GTGATCGGCC  
ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA AGCCTGACGG  
AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCGTAAA ACTCTGTTAT

23 - 27 TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA CGGCTACCA AGGCAACGAT ACGTAGCCGA CCTGAG-AGG GTGATCGGCC  
ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA AGCCTGACGG  
AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCGTAAA GCTCTGTTAT

25 - 27F TTAGCTAGTT GGTAAGGTAA CGGCTTACCA AGGCAACGAT GCGTAGCCGA CCTGAG-AGG GTGATCGGCC  
ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA AGCCTGACGG  
AGCAACGCCG CGTGAGTGAA GAAGGTCTTC GGATCGTAAA ACTCTGTTAT

26 - 27F TTAGCTAGTT GGTAAGGTAA CGGCTTACCA AGGCAACGAT GCGTAGCCGA CCTGAGGAGG GTGATCGGCC  
ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA AGCCTGACGG  
ACCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCGTAAA ACTCTGTTAT

4 - 27F TAGGG-AAGA ACAAATGTGT AAGTAACTAT GCACGTCTTG ACGGTACCTA ATC-AGAAAG CC-ACGGCTA ACTACGTG-  
C CA-CCCCCC CCGGGGATA CAAACCG--

5 - 27F TAGGG-AAGA ACAAATGTGT AAGTAACTAT GCACGTCTTG ACGGTACCTA ATC-AGAAAG CC-ACGGCTA ACTACGTG-  
C CAGCCCCCC CCGGGTAATA CAAACCC-

6 - 27F TAGGG-AAGA ACAAATGTGT AAGTAACTAT GCACGTCTTG ACGGTACCTA ATC-AGAAAG CC-ACGGCTA ACTACGTG-  
C CAGCCCCCC CCGGGTAATA CAAACCC-

22 - 27 TAGGG-AAGA ACAAATGTGT AAGTAACTAT GCACGTCTTG ACGGTA-----

23 - 27 TAGGG-AAGA ACAAATGTGT AAGTAACTGT GCACATCTTG ACGGTACCTA ACC-AGAAAG CC-ACGGCTA ACTACGTG-C CAGCCGCCCC CCGGGGGG-TA CAA-----

25 - 27F TAGGG-AAGA ACAAATGTGT AAGTAACTAT GCACGTCTTG ACGGTACCTA ATCCAGAAAG CCCACGGCTA ACTACCTGGC CACCCGCCCC CCGGGGGGTA CAAACAGC-

26 - 27F TAGGGGAAGA ACAAATGTGT AAGTAACTAT GCACGTCTTG ACGGTACCTA ATC-AGAAAG CC-ACGGCTA ACTACGTG-C CA-CCCGCCG GCGGGGGATA CAAGGACGC

## LES SÉQUENCES DES SOUCHES D'AGASSIZ

### Alignement des souches de *S. equorum*

**B5M24** - -----GTGC TA-CATGCA- GTCGAGCGAC GGATAAGGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TGCCGATAA CATTGGAAC CGCATGGTTC TAAAGTAAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC

**B8M19** - -TGGG-GTGC TA-C-TGCA- GTCGAGCGAC GGATAAGGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TGCCGATAA CATTGGAAC CGCATGGTTC TAAAGTAAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC

**B12M15** - ----- ----- ----GC-AC GG-TA-GGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TGCCGATAA CATTGGAAC CGCATGGTTC TAAAGTAAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC

**C1 M8** - -----GC -A-CATGCA- GTCGAGCGAC GGATA-GGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TGCCGATAA CATTGGAAC CGCATGGTTC TAAAGTAAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC -

**D3 M17** - -----GC -A-CATGCA- GTCGAGCGAC GGATAAGGAG CTTGCTCCTT TGAAGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TGCCGATAA CATTGGAAC CGCATGGTTC TAAAGTAAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC -

**B5M24** - CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGAAGT AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGACGAAAAG TCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGTTTTCCG ATCGTAAAAAC -

**B8M19** - CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGAAGT AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGACGAAAAG TCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGTTTTCCG ATCGTAAAAAC -

**B12M15** - CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGAAGT AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGACGAAAAG TCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGTTTTCCG ATCGTAAAAAC -

**C1 M8** - CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGAAGT AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGACGAAAAG TCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGTTTTCCG ATCGTAAAAAC

**D3 M17** - CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGAAGT AGACACGGTC CAGACTCCTA CCGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGACGAAAAG TCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGTTTTCCG ATCGTAAAAAC -

**B5M24** - TCTGTTATTA GGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCAGCCCC ----- .....

**B8M19** - TCTGTTATTA GGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCACCCC CC----- .....

**B12M15** - TCTGTTATTA GGGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC  
GGCTAACTAC GTGCCAGCCG CCGGCGGGTA ATACAA..... ..

**C1 M8** - TCTGTTATTA GGGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC  
GGCTAACTAC GTGCCAGCCG CC-----..... .. **C1 M8** -

**D3 M17** - TCTGTTATTA GGGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAATC AGAAAGCCAC  
GGCTAACTAC GTGCCAGCCG CCG-----..... ..

### Alignement des souches de *S. cohnii urealyticus*

**B6M78** - -GTGCTA-CT GCAGTCGAGC GACAGATAAG GAGCTTGCTC CTTTGACGTT AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA  
CACGTGGGTA ACCTACCTAT AAGACTGGGA ATAACCTCCG GGGAAACCGG GGCTAATGCC GGATAACATT TAGAACCCGA  
TGGTTCTAAA GTGAAAGATG GTTTTGCTAT CACTTATAGA TGGACCCGCG

**B6M78** - CCGTATTAGC TAGTTGGTAA GGTAACGGCT TACCAAGGCA ACGATACGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC  
GGCCACACTG GAACTGAGAC ACGGTCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGG CGAAAGCCTG  
ACGGAGCAAC GCCCGGTGAG TGATGAAGGT CTTCGGATCG TAAACTCTG

**B6M78** - TTANTAGGGA AGACAAATGT GTAAGTAACT GTGCACGTCT TGACGGTCCT AATCANAAAG CCACGGCTAN  
TACGTGCACC CCC

### Alignement des souches de *S. chromogenes*

**B9M25** - ---GGNGTGC TANCATGCAA GTCGAGCGAC TGACGAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG  
TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TGCCGGATAA CATATCGAAC  
CGCATGGTTC GATAGTGAAA GACGGTCTTG CTGTCACTTA TAGATGGACC

**C5 M7** - --GGACGTGC TAANCATGCA GTCGAGCGAC TGACGAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG  
TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TGCCGGATAA CATATCGAAC  
CGCATGGTTC GATAGTGAAA GACGGTCTTG CTGTCACTTA TAGATGGACC

**C9 M2** - ----- -----NC GTN-AGCGAC TG-CGAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAACAC  
GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TGCCGGATAA CATATCGAAC CGCATGGTTC  
GATAGTGAAA GACGGTCTTG CTGTCACTTA TAGATGGACC

**C12 M67** NTGCGCGTGC TATCATGCC GTCGAGCGAC TGACGAGGAG CTTGCTCCTT TGACGTTAGC GCGGACGGG  
TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGAATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TGCCGGATAA CATATCGAAC  
CGCATGGTTC GATAGTGAAA GACGGTCTTG CTGTCACTTA TAGATGGACC

**B9M25** - CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT  
GATCGGCCAC ACTGGAACCTG AGACACGGTC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAG  
CCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGTCTTCGG ATCGTAAAGC

**C5 M7** - CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT  
GATCGGCCAC ACTGGAACCTG AGACACGGTC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAG  
CCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGTCTTCGG ATCGTAAAGC

**C9 M2** - CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT  
GATCGGCCAC ACTGGAACCTG AGACACGGTC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAG  
CCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGTCTTCGG ATCGTAAAGC

**C12 M67** CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTACCAA GGCAACGATA CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT  
GATCGGCCAC ACTGGAACCTG AGACACGGTC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAG  
CCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGTCTTCGG ATCGTAAAGC

**B9M25** - TCTGTTGTTA GGGGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAACC AGAAAGCCAC  
GGCTAACTAC GTGCCACCCC CNNGGGGTAA TTA AAAANNN NNN

**C5 M7** - TCTGTTGTTA GGGGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAACC AGAAAGCCAC  
GGCTAACTAC GTGCCAGCCG CCNGCGGTAA TNCAANNNNN G--

**C9 M2** - TCTGTTGTTA GGGGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAACC AGAAAGCCAC  
GGCTAACTAC GTGCCAGCCG CCGGCGGTAA TACAAANNGC ---

**C12 M67** TCTGTTGTTA GGGGAAGAACA AATGTGTAAG TAACTGTGCA CATCTTGACG GTACCTAACC AGAAAGCCAC  
GGCTAACTAC GTGCCAGCCG CCG-CGGTAA TNCAANNNG ---

### Alignement des souches de *S. simulans*

**B10M60** - -GTGCTA-CT GCA-GTCGAG CGACAGACGA GGAGCTTGCT CCTCTGACGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA  
ACACGTGGGT AACCTACCTA TAAGACTGGG ATA ACTCCGG GAAACCGGGG CTAATACCGG ATAACACATG AAACCGCATG  
GTTTCATGAT GAAAGACGGT TTTGCTGTCA CTTATAGATG GACCCGCGGC

**C3 M35** - -----TCT GCA-GTCGAG CGACAGACGA GGAGCTTGCT CCTCTGACGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA  
ACACGTGGGT AACCTACCTA TAAGACTGGG ATA ACTCCGG GAAACCGGGG CTAATACCGG ATAACACATG AAACCGCATG  
GTTTCATGAT GAAAGACGGT TTTGCTGTCA CTTATAGATG GACCCGCGGC

**C6 M33** - GTGC-A-CAT GCA-GTCGAG CGACAGACGA GGAGCTTGCT CCTCTGACGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA  
ACACGTGGGT AACCTACCTA TAAGACTGGG ATA ACTCCGG GAAACCGGGG CTAATACCGG ATAACACATG AAACCGCATG  
GTTTCATGAT GAAAGACGGT TTTGCTGTCA CTTATAGATG GACCCGCGGC

**C11 M30** --GC-A-CAT GCA-GTCGAG CGACAGACGA GGAGCTTGCT CCTCTGACGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA  
ACACGTGGGT AACCTACCTA TAAGACTGGG ATA ACTCCGG GAAACCGGGG CTAATACCGG ATAACACATG AAACCGCATG  
GTTTCATGAT GAAAGACGGT TTTGCTGTCA CTTATAGATG GACCCGCGGC

**D4 M31** - --GC-A-CAT GCACGTGAG CGACAGACGA GGAGCTTGCT CCTCTGACGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA  
ACACGTGGGT AACCTACCTA TAAGACTGGG ATA ACTCCGG GAAACCGGGG CTAATACCGG ATAACACATG AAACCGCATG  
GTTTCATGAT GAAAGACGGT TTTGCTGTCA CTTATAGATG GACCCGCGGC

**B10M60** - GTATTAGCTA GTTGGTAAGG TAACGGCTTA CCAAGGCAAC GATACGTAGC CGACCTGAGA GGGTGATCGG  
CCACACTGGA ACTGAGACAC GGTCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGGCG AAAGCCTGAC  
GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTCT TCGGATCGTA AA ACTCTGTT

**C3 M35** - GTATTAGCTA GTTGGTAAGG TAACGGCTTA CCAAGGCAAC GATACGTAGC CGACCTGAGA GGGTGATCGG  
CCACACTGGA ACTGAGACAC GGTCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGGCG AAAGCCTGAC  
GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTCT TCGGATCGTA AA ACTCTGTT

**C6 M33** - GTATTAGCTA GTTGGTAAGG TAACGGCTTA CCAAGGCAAC GATACGTAGC CGACCTGAGA GGGTGATCGG  
CCACACTGGA ACTGAGACAC GGTCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGGCG AAAGCCTGAC  
GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTCT TCGGATCGTA AA ACTCTGTT

**C11 M30** GTATTAGCTA GTTGGTAAGG TAACGGCTTA CCAAGGCAAC GATACGTAGC CGACCTGAGA GGGTGATCGG  
CCACACTGGA ACTGAGACAC GGTCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGGCG AAAGCCTGAC  
GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTCT TCGGATCGTA AA ACTCTGTT

**D4 M31** - GTATTAGCTA GTTGGTAAGG TAACGGCTTA CCAAGGCAAC GATACGTAGC CGACCTGAGA GGGTGATCGG  
CCACACTGGA ACTGAGACAC GGTCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGGCG AAAGCCTGAC  
GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTCT TCGGATCGTA AA ACTCTGTT

**B10M60** - ATTAGGGAA- GAACAAGGAT GTAAGTAACT GTGCATCCCT TGACGGTACC TAATCAGAAA GCCACGGCTA A-  
CTACGTGC CAGCCGCCCN NNCGGGTAAAT ACAAANNNNN ---

**C3 M35** - ATTAGGGAA- GAACAAGGNT GTAAGTAACT ATGCANCCCT TGACGGTACC TAATCAGAAA GCCACGGCTA A-  
CTACGTGC CAGCCGCCCN NC--GGTAAT NCAANNNNN N--

**C6 M33** - ATTANGGNA NAACAAGGGT GTAATTA CT ATGCNNCCCT TGGNGGTACC TAATCNAAAA GCCCCGGTTA AANNANTTGC CCCCCCCCN NG--GGNA AAAAAAAAAAN NNG

**C11 M30** ATTAGGGAA- GAACAAGGNT GTAAGTAACT ATGCANCCCT TGACGGTACC TAATCAGAAA GCCACGGCTA A-CTACGTGC CAGCCGCC-G GC--GGTAAT NCAANNNNNG ---

**D4 M31** - ATTAGGGAA- GAACAAGGGT GTAAGTAACT ATGCACCCT TGACGGTACC TAATCAGAAA GCCACGGCTA A-CTACGTGC CAGCCGCC-N GC--GGTAAT NCAANNNNN ---

### Alignement des souches de *S. haemolyticus*

**C2 M52** - GC-A-CATGC --GTCGAGCG ACAGACAAGG AGCTTGCTCC TTTGACGTTA GCGGCGGACG GGTGAGTAAAC ACGTGGGTAA CCTACCTATA AGACTGGGAT AACTTCGGGA AACC GGAGCT AATACCGGAT AATATTTTGA ACCGCATGGT TCGATAGTGA AAGATGGTTT TGCTATCACT TATAGATGGA CCCGCGCCGT

**C10 M32** -C-A-CATG- AAGTCGAGCG ACAGA-A-GG AGCTTGCTCC TTTGACGTTA GCGGCGGACG GGTGAGTAAAC ACGTGGGTAA CCTACCTATA AGACTGGGAT AACTTCGGGA AACC GGAGCT AATACCGGAT AATATTTTGA ACCGCATGGT TCGATAGTGA AAGATGGTTT TGCTATCACT TATAGATGGA CCCGCGCCGT

**C2 M52** - ATTAGCTAGT TGGTAAGGTA ACNGCTTACC AAGGCGACGA TACGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA AGCCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCGTAAA ACTCTGTTAT

**C10 M32** ATTAGCTAGT TGGTAAGGTA ACAGCTTACC AAGGCGACGA TACGTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA AGCCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTCTTC GGATCGTAAA ACTCTGTTAT

**C2 M52** - TAGGGAAGAA CATACTGTGA AGTAACTGTG CACGTCTTGA CGGTACCTAA TCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC CGCCNGNCGG TTAATNCAAA NNNNN

**C10 M32** TAGGGAAGAA CATACTGTGA AGTAACTGTG CACGTCTTGA CGGTACCTAA TCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC CGCCGCGNG- -TAATACANN NNA--

### Alignement des souches de *S. hominis*

**B11M9** - GGGNGTGCTA NCTGCAGTCG AGCGACAGAC GAGGAGCTTG CTCCTTTGAC GTTAGCGGCG GACGGGTGAG TAACACGTGG GTAACCTACC TATAAGACTG GGATAACTTC GGGAAACCGG AGCTAATACC GGATAATATT TCGAACC GCA TGGTTCGATA GTGAAAGATG GCTCTGCTAT CACTTATAGA TGGACCTGCG

**B11M9** - CCGTATTAGC TAGTTGGTAA GGTAACGGCT TACCAAGGCA ACGATACGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG GAACTGAGAC ACGGTCCAGA CTCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGG CGAAAGCCTG ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGT CTTCGGATCG TAAACTCTG

**B11M9** - TTATTAGGGA AGAACAACG TGTAAGTAACT TGTGCACGTC TTAGCGGTAC CTAATCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CANCCGCCNC CGGTAANACA ANNN

### La souche de *S. fleurettii*

**C8 M53** - NTGTCAACGA CAGATGAGAG CTTGCTTCTC TGATGTTAGC GCGGACGGG TGAGTAAACGN GTGGGTAACC TACCTATAAG ACTGGGATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCTGATAA TATTTTGAAC CGCATGGTTC GATAGTAAAA GCGGCTTCG GCTGTCACTT ATAGATGGAC CCGCGCCGTA TTAGCTAGTT

**C8 M53** - GGTAAGGTAA TGGCTTACCA AGGCGACGAT ACGTAGCCGA CCTGGAGAGG GTGATCGGCC ACACTGGAAC  
TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGGCGAA AGCCTGACGG ANCAACGCCG  
CGTGAGTGAT GAAGGTTTTT GGATCGTAAA ACTCTGTTGT TAGGGAAGAA

**C8 M53** - CAAATTTGTT AGTAACTGAA CAAGTCTTGA CGGTACCTAA CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC  
CGCCGCGGTA AGACAANCNC NNC

### *Alignement des souches de S. epidermidis*

**D1 M54** - CTGCCGTCNA GCGACAGACG AGGAGCTTGC TCCTCTGACG TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGA  
TAACCTACCT ATAAGACTGG GATAACTTCG GGAAACCGGA GCTAATACCG GATAATATAT TGAACCGCAT GGTTCAATAG  
TGAAAGACGG TTTTGCTGTC ACTTATAGAT GGATCCGCGC CGCATTAGCT

**D1 M54** - AGTTGGTAAG GTAACGGCTT ACCAAGGCAA CGATGCGTAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG  
AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGAATCTTC CGCAATGGGC GAAAGCCTGA CGGAGCAACG  
CCGCGTGAGT GATGAAGGTC TTCGGATCGT AAAACTCTGT TATTAGGGAA

**D1 M54** - GAACAAATGT GTAAGTAACT ATGCACGTCT TGACGGTACC TAATCAGAAA GCCACGGCTA ACTACGTGCC  
AGCCGCCGCG GTAATNCAAN ACNCNNC

**ANNEXE 2****Réactifs pour coloration de Gram**

## a- Le crystal violet ou (Violet de gentiane)

Crystal violet, 2.5 gr.

Eau distillée, 1,000 ml

## b- solution de bicarbonate de sodium

Bicarbonate de sodium, 12.5 gr.

Eau distillée, 1,000 ml

## c- Solution d'iode

Iode, 20 gr.

Hydroxyde de sodium (solution 1 M), 100 ml.

Eau distillée, 900 ml

## d – Alcool + acétone

Alcool éthylique 95%, 750 ml

Acétone, 250 ml

## e- Solution de Fuchsine

Solution de fuchsine saturée dans l'alcool, 10 ml

Eau distillée, 90 ml

**Réactifs utilisés pour la réaction d'amplification en chaîne par la polymérase:**

ADN extrait à partir de culture pure de bactéries.

Taq polymérase

Les DN.TP.: d.A.T.P., d.T.T.P, d.G.T.P., d.C.T.P.

Amorce en aval (Forward) 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

Amorce en amont (Reverse) 519R: 5'- GWATTACCGCGGCKGCTG -3'

Le tampon 10X

L'eau

**Tampons utilisés:**

Tampon TBE (Tris borate EDTA) pH 8,3 (Pour 1000 mL d'eau distillée)

Tris.HCl (tris hydroxyméthyl aminométhane) 90 mmol.L<sup>-1</sup> : 10,89 g

Acide borique 90 mmol.L<sup>-1</sup> : 5,56 g

EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup> : 0,74 g (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétra-acétique)

Tampon TAE (Tris EDTA) pH 7,6

Pour 100 mL d'eau distillée :

Tris.HCl (tris hydroxyméthyl aminométhane) 1 mol.L<sup>-1</sup> : 12,1 g

EDTA (sel disodique d'acide éthylène diamine tétra acétique) 0,1 mol.L<sup>-1</sup> : 3,72 g

Colorant de charge pH 8

Pour 10 mL d'eau distillée :

Bleu de bromophénol 3 mmol.L<sup>-1</sup> : 0,2 g

Saccharose 1,5 mol.L<sup>-1</sup> : 5,1 g

Tris. HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup> : 0,01 g



