

# Homogénéité intra-troupeau des souches de *Staphylococcus aureus* de mammites sub-cliniques pour la production de $\beta$ -lactamase et la résistance à la pénicilline

F. SERIEYS (1), M. GICQUEL-BRUNEAU (2)

(1) Filière Blanche, 12 quai Dugay Trouin, 35000 Rennes

(2) AFSSA LERMVD, Unité Pharmacocinétique-Pharmacodynamie, 35302 Fougères

**RESUME** - Des souches de *Staphylococcus aureus*, isolées de 89 quartiers atteints de mammites sub-cliniques provenant de 54 vaches dans 7 troupeaux, ont été soumises au test à la nitrocéfine sur disque dans le but d'étudier la variabilité intra-élevage de la production de  $\beta$ -lactamase. Les résultats étaient parfaitement homogènes dans 5 troupeaux sur 7 : dans 2 élevages, les 22 souches isolées de 14 vaches étaient toutes négatives tandis que dans 3 élevages, les 47 souches isolées de 25 vaches étaient toutes positives. Dans les 2 autres élevages, 70 % des souches étaient négatives. Par ailleurs, les résultats du test à la nitrocéfine étaient identiques que la lecture du test intervienne après 15 minutes ou après 1 heure d'incubation et une seule des 36 souches qui étaient négatives au test en l'absence d'induction préalable par la méthicilline, est devenue positive après induction. Des analyses complémentaires sur un sous-échantillon de 34 souches ont montré une excellente concordance entre les résultats du test à la nitrocéfine et les CMI de la pénicilline déterminée par la méthode de microdilution en milieu liquide. D'après ces résultats, le test à la nitrocéfine réalisé sur quelques souches de *S. aureus* par troupeau, lu après 15 minutes sans induction préalable par la méthicilline, apparaît comme un outil fiable, rapide et économique pour identifier les troupeaux dans lesquels la pénicilline G, très active également contre les streptocoques, est un antibiotique de choix pour le traitement des mammites sub-cliniques en lactation ou au tarissement.

## Within herd homogeneity of subclinical mastitis *Staphylococcus aureus* strains for $\beta$ -lactamase production and resistance to benzylpenicillin

F. SERIEYS (1), M. GICQUEL-BRUNEAU (2)

(1) Filière Blanche, 12 quai Dugay Trouin, 35000 Rennes

**SUMMARY** - *Staphylococcus aureus* isolates from 89 quarters affected by subclinical mastitis belonging to 54 cows in seven herds were tested for beta-lactamase production using the nitrocefin disk test in order to study its intra-herd variability.

The results were perfectly homogeneous within the five herds: in two of them, all 22 isolates from 14 cows were negative, whereas in 3 herds, all 47 isolates from 25 cows were positive. In the two other herds, the test was negative for 70% of the isolates.

The nitrocefin test results were the same after 15 and 60 minutes of incubation. Moreover, only one of the 36 isolates that were negative to the nitrocefin test without induction by methicillin became positive after induction. Further analysis performed on a sub-sample of 34 isolates showed an excellent correspondence between the results of the nitrocefin test results and the MICs of benzylpenicillin determined by the broth micro-dilution method.

So, the nitrocefin test performed on isolates from a few quarters in the herd, read at 15 minutes without induction by methicillin, appears as a reliable, rapid and cheap method in order to identify herds in which benzylpenicillin, also very active against streptococci, remains a drug of choice for the treatment of subclinical mastitis during lactation or at drying-off.

## INTRODUCTION

L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries responsables de mammites se heurte à deux difficultés majeures.

La première concerne la pertinence des valeurs critiques retenues pour interpréter les résultats d'antibiogramme en terme de souche sensible, intermédiaire ou résistante. Pour la plupart des molécules utilisées en médecine vétérinaire, ces valeurs sont issues d'études pharmacologiques menées chez l'homme pour des traitements appliqués par voie générale. Les limites de la transposition à la vache laitière pour des traitements appliqués le plus souvent par voie locale ont déjà été abondamment discutées (Guérin-Faublée et Vialard, 2003). Pour pallier cette difficulté, d'autres méthodes, notamment celles fondées sur la mise en évidence directe d'un gène ou d'une enzyme associée à la résistance, ont été proposées (Guérin-Faublée et Carret, 1999).

La seconde difficulté, moins souvent abordée mais tout aussi décisive sur un plan pratique, concerne la généralisation à l'échelle du troupeau qu'il est légitime ou non de faire à partir des résultats obtenus sur quelques souches isolées d'un échantillon limité de quartiers. Cette question est

indépendante de la méthode d'évaluation de la sensibilité utilisée (antibiogramme, PCR, détection d'enzyme...). Elle ne dépend que de l'épidémiologie de l'espèce bactérienne considérée dans l'élevage considéré, à savoir le nombre de souches en présence et leur pouvoir de dissémination.

La question de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* à la pénicilline G est particulièrement intéressante pour 3 raisons :

- Environ une souche de *S. aureus* sur deux en France est résistante à la pénicilline G : il s'agit de la principale résistance rencontrée en pathologie mammaire (Guérin-Faublée et Brun, 1999).

- Les études de caractérisation génotypique des souches de *S. aureus* (empreintes génétiques) indiquent que, bien que plusieurs souches peuvent coexister dans l'élevage, une souche est prédominante (Lam *et al.*, 1996 ; Lipman *et al.*, 1996), ce qui plaide en faveur d'une possibilité de généralisation pour cette espèce bactérienne. Mais les résultats des études s'appuyant sur les empreintes génétiques dépendent largement du pouvoir discriminant de la technique utilisée et ont conduit à des conclusions quelquefois divergentes (Sommerhauser *et al.*, 2003). On

peut aussi se demander si la multiplicité et la mobilité des supports génétiques - chromosome, plasmide, transposon - de la résistance à la pénicilline G (Vesterholm-Nielsen *et al.*, 1999 ; Zschelk et Murray, 1993) n'introduit pas une variabilité particulière pour ce caractère.

- *S. aureus* est une cause majeure de mammites sub-cliniques avec les streptocoques. Ceux-ci restent très sensibles à la pénicilline G. Si la souche dominante de *S. aureus* dans un troupeau est également sensible à cet antibiotique, la pénicilline G est alors un antibiotique de choix pour le traitement des mammites sub-cliniques, que ce soit en lactation ou au tarissement.

En conséquence, l'étude avait un double objectif :

- évaluer la variabilité intra-élevage des souches de *S. aureus* pour la production de  $\beta$ -lactamase et la résistance à la pénicilline G,
- évaluer la fiabilité du test à la nitrocéfine et préciser ses modalités pratiques de réalisation.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. ELEVAGES, VACHES ET QUARTIERS INCLUS

Des analyses bactériologiques sur lait de quartiers ont été réalisées dans 15 élevages suspectés, sur la base d'un diagnostic bactériologique et épidémiologique préalable, d'une prévalence élevée d'infections à *S. aureus*. Les vaches et les quartiers prélevés ont été sélectionnés sur la base de comptages cellulaires individuels ( $> 300\,000$  cellules/ml) et de CMT ( $> +$ ) indiquant la présence de mammites sub-cliniques.

N'ont finalement été retenus que les 7 élevages dans lesquels au moins 5 quartiers appartenant à au moins 5 vaches différentes étaient infectés par *S. aureus*, soit un total de 89 quartiers appartenant à 54 vaches (tableau 1).

Les 89 souches correspondantes ont été soumises à un test de production de  $\beta$ -lactamase et, pour 34 d'entre elles appartenant à 3 élevages, la CMI de la pénicilline G a été déterminée.

### 1.2. TEST DE PRODUCTION DE $\beta$ -LACTAMASE

Le test à la nitrocéfine sur disque (disque Céfinase®) répondant aux exigences de la norme NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2003) a été choisi pour mettre en évidence la production de  $\beta$ -lactamase par *S. aureus*. La nitrocéfine (Glaxo Research) est une céphalosporine chromogène, substrat de la  $\beta$ -lactamase produite par *S. aureus*. Lorsque ce substrat est hydrolysé en présence de la  $\beta$ -lactamase, il change de couleur passant du

jaune pâle au rose. Un test positif prédit la résistance à la pénicilline G, l'ampicilline et l'amoxicilline.

A l'aide d'un ensemencement à anse, plusieurs colonies de chaque souche isolée ainsi que de 2 souches de contrôle positif (ATCC 29213) et négatif (ATCC 25923) ont été prélevées et étalées à la surface du disque Céfinase®, posé sur une boîte de Pétri vide. Les boîtes, contenant plusieurs disques, ont été incubées à 35°C pendant une heure pour accélérer la réaction. Deux lectures successives ont été réalisées après 15 et 60 minutes.

Toutes les souches ayant montré un résultat négatif au test ont été soumises à une induction par la méthicilline, pour augmenter leur production éventuelle de  $\beta$ -lactamase, avant d'être soumises une seconde fois au test à la nitrocéfine. Les bactéries ayant subi l'induction sont celles d'une zone frontière à moins de 5 mm de l'extérieur de la zone d'inhibition produite par un disque de méthicilline déposé au centre d'une gélose ensemencée en surface avec une suspension à  $10^6$  UFC (unité formant une colonie)/ml de la souche étudiée.

### 1.3. DETERMINATION DES CMI DE LA PENICILLINE

Les CMI de la pénicilline G pour 34 souches ont été déterminées par la méthode de microdilution en milieu liquide répondant aux exigences de la norme NCCLS.

La gamme des dilutions de l'antibiotique entre 0,015 et 16  $\mu$ g/ml et un témoin sans antibiotique ont été distribués dans les 8 rangées de chaque microplaque à raison de 100  $\mu$ l par cupule, puis les *inoculi* bactériens, préparés à  $5,10^5$  UFC/ml, ont été ajoutés à raison de 100  $\mu$ l et mélangés avec l'antibiotique par aspiration-refoulement.

Les microplaques ont été lues après 21 heures d'incubation à l'étuve à 35°C. Un contrôle qualité a été réalisé en introduisant la souche de référence de *S. aureus* ATCC 29213 dont la CMI obtenue pour la pénicilline doit être comprise entre 0,25 et 2  $\mu$ g/ml.

## 2. RESULTATS

### 2.1. VARIABILITE DES SOUCHES POUR LA PRODUCTION DE $\beta$ -LACTAMASE

Les résultats du test à la nitrocéfine étaient parfaitement homogènes dans 5 élevages : dans 2 d'entre eux, les 22 souches isolées de 14 vaches étaient toutes négatives tandis que dans 3 élevages, les 47 souches isolées de 25 vaches étaient toutes positives. Dans les 2 autres élevages, 70 % des souches étaient négatives (tableau 1).

Globalement, 60 % des souches étaient productrices de  $\beta$ -lactamase contre 40 % qui ne l'étaient pas.

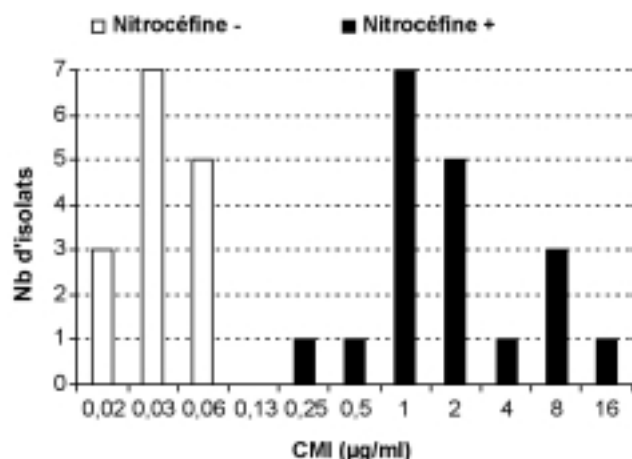
**Tableau 1** : test à la nitrocéfine de 89 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de 54 vaches provenant de 7 élevages.

| Origine des souches |             |           |              | Test à la nitrocéfine |                |
|---------------------|-------------|-----------|--------------|-----------------------|----------------|
| Elevage             | Département | nb vaches | nb quartiers | nb négatif (%)        | nb positif (%) |
| A                   | 15          | 9         | 15           | 15 (100 %)            | 0 (0 %)        |
| D                   | 56          | 5         | 7            | 7 (100 %)             | 0 (0 %)        |
| B                   | 80          | 6         | 10           | 0 (0 %)               | 10 (100 %)     |
| C                   | 63          | 5         | 9            | 0 (0 %)               | 9 (100 %)      |
| F                   | 56          | 14        | 28           | 0 (0 %)               | 28 (100 %)     |
| E                   | 56          | 7         | 10           | 7 (70 %)              | 3 (30 %)       |
| G                   | 53          | 8         | 10           | 7 (70 %)              | 3 (30 %)       |
| Total               |             | 54        | 89           | 36 (40 %)             | 53 (60 %)      |

## 2.2. CONCORDANCE ENTRE LES RESULTATS DU TEST A LA NITROCEFINE ET LES CMIS DE LA PENICILLINE G

Les CMIs de la pénicilline G sur le sous-échantillon de 34 souches suivaient une répartition bimodale. Les 15 souches qui étaient négatives au test à la nitrocéfine présentaient les CMIs les plus faibles, de moins de 0,015 jusqu'à 0,06 µg/ml, tandis que les CMIs des 19 souches positives au test allaient de 0,25 à 16 µg/ml (figure 1).

**Figure 1 :** CMIs de la pénicilline G vis-à-vis de 34 souches de *S. aureus* positives ou négatives au test à la nitrocéfine.



## 2.3. INFLUENCE DU DELAI DE LECTURE ET DE L'INDUCTION PAR LA METHICILLINE SUR LE RESULTAT DU TEST A LA NITROCEFINE

La lecture du test après 15 minutes ou après 1 heure d'incubation à l'étuve à 35°C a donné des résultats strictement identiques.

Seule 1 souche sur les 36, qui étaient négatives au test à la nitrocéfine sans induction préalable par la méthicilline, est devenue positive après induction. Cette souche provenait de l'élevage C dont les 8 autres souches testées avaient donné un résultat positif sans induction préalable à la méthicilline. Elle présentait une CMI de 0,25 µg/ml, la plus basse des CMIs observées pour les souches classées comme résistantes (figure 1).

## 3. DISCUSSION

Bien que l'échantillon des élevages considérés dans cette étude ne puisse prétendre à la représentativité, la proportion de souches de *S. aureus* productrices de  $\beta$ -lactamase (60 %) n'est pas très éloignée des valeurs généralement rapportées en France (Guérin-Fauble et Brun, 1999).

L'homogénéité des souches de *S. aureus* pour la production de  $\beta$ -lactamase qui a été observée dans 5 troupeaux sur 7 (71 %) est cohérente avec les résultats des études épidémiologiques suggérant que les infections mammaires à *S. aureus* dans un élevage donné sont dues à un nombre

limité de souches (Lam *et al.*, 1996 ; Lipman *et al.*, 1996). Cette proportion élevée d'élevages homogènes rend possible une généralisation à l'échelle du troupeau des résultats obtenus sur un petit nombre de quartiers. Ainsi, le calcul des probabilités fait apparaître que le risque d'erreur est minime, inférieur à 3 %, si l'on conclut que l'ensemble des infections à *S. aureus* d'un troupeau est sensible ou résistant à la pénicilline sur la base de 4 résultats identiques sur 4 souches provenant de vaches différentes.

La concordance observée entre les résultats du test à la nitrocéfine et les CMIs de la pénicilline G confirme que la production de  $\beta$ -lactamase est la cause essentielle de la résistance à la pénicilline des staphylocoques dorés responsables de mammites sub-cliniques, alors que les souches méthi-R, résistantes à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines du fait de la synthèse d'une nouvelle cible et fréquemment en cause dans les infections nosocomiales, sont très rarement impliquées dans les infections mammaires bovines (Guérin-Fauble et Brun, 1999).

La très bonne aptitude du test à la nitrocéfine à discriminer les souches porteuses ou non du gène de résistance *blaZ* (Haveri *et al.*, 2005) donne une supériorité intrinsèque à ce test comparativement à la méthode de la CMI et *a fortiori* de l'antibiogramme pour prédire la sensibilité ou la résistance de *S. aureus* à la pénicilline.

La très faible proportion de souches inductibles par la méthicilline (1 souche sur 36) pourrait être une caractéristique des élevages français. En effet, cette proportion varie de 0 à plus de 40 % selon les pays (De Oliveira *et al.*, 2000) et pourrait être liée au niveau d'utilisation des pénicillines M dans les troupeaux. Sur un plan pratique, cette situation permet d'envisager la suppression de l'étape d'induction pour une utilisation de terrain. Même si la souche inductible avait été faussement classée comme non-productrice de  $\beta$ -lactamase en l'absence d'induction préalable, les résultats positifs observés avec les 8 autres souches testées dans la même élevage, auraient de toute façon conduit en pratique à écarter l'utilisation de la pénicilline G pour traiter les infections à staphylocoques dans ce troupeau. Par contre, la suppression de cette étape d'induction entraîne un gain important en temps et en coût d'analyse.

Si l'on ajoute que la lecture du test peut être réalisée après 15 minutes au lieu d'1 heure grâce à l'incubation à 35 °C, le test à la nitrocéfine sans induction préalable par la méthicilline permet de donner une réponse de résistance ou de sensibilité de *S. aureus* à la pénicilline presque immédiatement après son isolement primaire, soit 18 à 24 heures avant les résultats d'un antibiogramme et avec une bien meilleure fiabilité. Le coût est également beaucoup plus réduit puisqu'un disque Céfinase®, vaut environ 1 €.

De nouvelles investigations sont en cours pour préciser l'interprétation du test à la nitrocéfine réalisé sur des souches issues du lait de tank.

## CONCLUSION

Les souches de *Staphylococcus aureus* responsables de mammites sub-cliniques dans un troupeau sont le plus souvent homogènes pour la production de  $\beta$ -lactamase et la résistance à la pénicilline G. Ainsi, la réalisation du test à la nitrocéfine sur quelques souches isolées à partir d'un petit nombre de quartiers dans le troupeau apparaît comme une méthode recommandable pour déterminer si la pénicilline G, dont on connaît par ailleurs l'efficacité vis-à-vis des streptocoques, est un antibiotique de choix dans l'élevage pour le traitement en lactation ou au tarissement des mammites sub-cliniques. Ce test, appliqué sans induction préalable par la méthicilline et lu après 15 minutes d'incubation, apporte une réponse plus fiable, plus rapide et moins onéreuse que l'antibiogramme.

Nous remercions particulièrement :

- Olivier Salat (DMV, 15), Marc Ennuyer (DMV, 80), Jacqueline Bastien (DMV, 63), Marylise Le Guénic (DMV, EDE 56), Loïc Fulbert (GDS 53) et Philippe Roussel (Institut de l'Élevage) pour leur concours dans la sélection des élevages et la réalisation des prélèvements ;
- Marcel Bonnier (LDA 35) et Bernard Poutrel (INRA, Nouzilly) pour la réalisation des analyses bactériologiques ;
- le Laboratoire Boehringer-Ingelheim Vétérinaire et Laurent Goby (DMV, Responsable technique) pour leur soutien financier et logistique.

De Oliveira A.P., Watts J.L., Salmon S.A., Aarestrup F.M., 2000. *J. Dairy Sci.*, 83, 855-862.

Guérin-Fauble V., Brun Y., 1999. *Rev. Méd. Vét.*, 150, 299-312.

Guérin-Fauble V., Carret G., 1999. Journées Nationales GTV-INRA, Nantes, 26-28 mai 1999, 5-13.

Guérin-Fauble V., Vialard J., 2003. Journées Nationales GTV, Nantes, 14-16 mai 2003, 303-314.

Haveri M., Suominen S., Rantala L., Honkanen-Buzalski T., Pyörälä S., 2005. *Vet. Microbiol.* 106: 97-102

Lam T.L.G.M., Lipman L.J.A., Schukken Y.H., Gaastra W., Brand A., 1996. *Am. J. Vet. Res.*, 57, 39-42.

Lipman L., De Nijs A., Lam T., Rost A., Van Dijk L., Schukken Y.H., Gaastra W., 1996. *Vet. Microbiol.*, 48, 51-55.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003. NCCLS document M7-A6, Sixth Edition. Wayne, Pa, USA.

Sommerhauser J., Kloppert B., Wolter W., Zschok M., Sobiraj A., Failing K., 2003. *Vet. Microbiol.*, 96, 91-102.

Vesterholm-Nielsen M., Olhom-Larsen M., Emerdahl-Olsen J., Moller- Aarestrup F., 1999. *Acta Vet. Scand.*, 40, 279-286.

Zschelk K.K., Murray B.E., 1993. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, 1966-1970.