

# Identification des mammites à l'aide de PathoProof Mammites PCR Assay

## Caractéristiques de PathoProof

- Le test permet d'identifier et de quantifier en même temps à l'aide de la méthode Real-time-PCR l'ADN bactérien de 11 différents agents pathogènes ou groupes d'agents pathogènes ainsi que le gène induisant une résistance à la pénicilline de type  $\beta$ -lactamase (*blaZ*) chez les staphylocoques.
- Etant donné que le test identifie l'ADN, les bactéries peuvent être vivantes ou mortes. C'est la raison pour laquelle les échantillons peuvent et devraient contenir un agent conservateur (Bronopol).
- Les échantillons peuvent avoir été prélevés de manière stérile ou non-stérile (échantillons prélevés sur un quartier, sur l'ensemble du pis ou dans le lait de mélange). Lors de l'interprétation des résultats, la possibilité d'une contamination doit être prise en compte.
- Le test ne dure que trois à quatre heures.
- La sensibilité du test est de 100 cfu/ml de lait (cfu = colony forming units = unités formant colonies).
- Agents pathogènes que le test permet d'identifier :
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Staphylocoques à coagulase négative (CNS, Staphylococcus sp.)*
  - *Streptococcus agalactiae*
  - *Streptococcus dysgalactiae*
  - *Streptococcus uberis*
  - *Escherichia coli*
  - *Corynebacterium bovis*
  - *Enterococcus faecalis, E. faecium*
  - *Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca*
  - *Serratia marcescens*
  - *Arcanobacterium pyogenes, Peptostreptococcus indolicus*
  - Gène induisant une résistance à la pénicilline de type  $\beta$ -lactamase (*blaZ*) (n'a de l'importance que pour les *Staph. aureus* et *Staph. sp.*)
- Ces agents pathogènes représentent plus de 95 % des cas de mammites cliniques et subcliniques (Makovec & Ruegg 2003 ; Pitkälä et al. 2004 ; Tenhagen et al. 2006 ; Koivula et al. 2007).

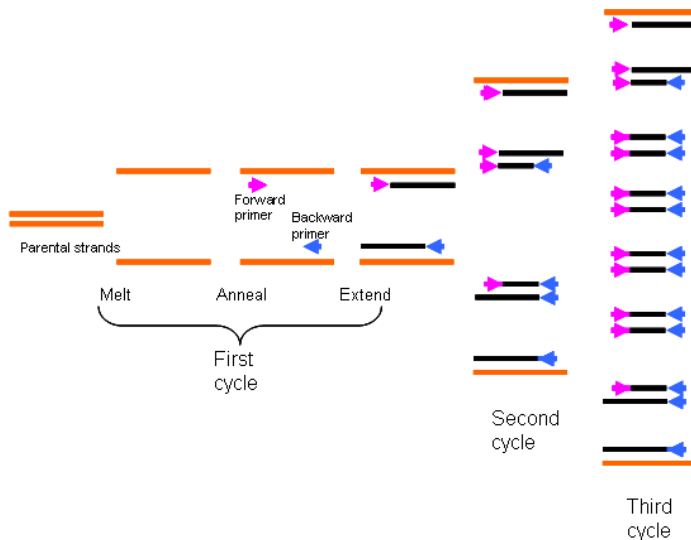
## Real-time-PCR

A l'aide de la méthode Real-time-PCR, on multiplie des séquences d'ADN spécifiques des germes et on mesure leur quantité.

Après l'extraction de l'ADN, le processus PCR commence par le premier cycle de multiplication (amplification) (cf. graphique ci-après) :

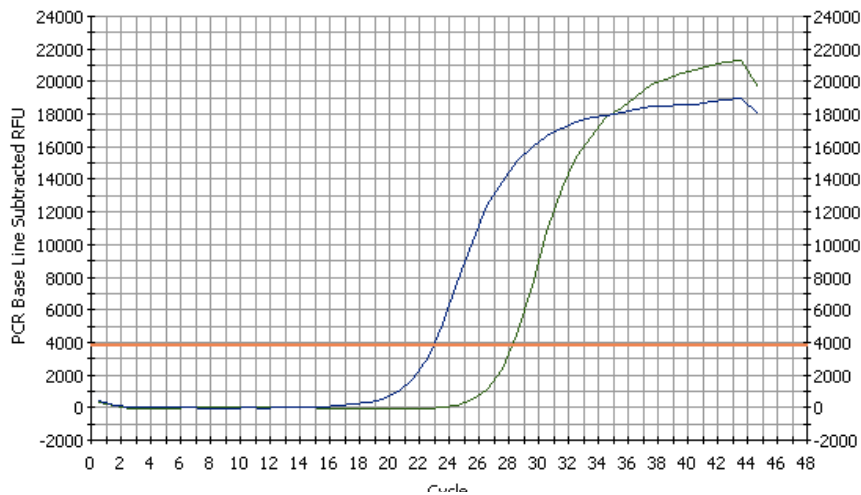
- Melt: La température est augmentée à environ 95°C, les brins de l'ADN bicaténaire sont séparés.
- Anneal: La température est abaissée. Les amorces spécifiques s'adhèrent aux séquences d'ADN des bactéries. C'est à ce moment que la polymérase commence à copier l'ADN.
- Extend: La température est légèrement augmentée afin que la polymérase travaille plus vite. A la fin du cycle, l'ADN a été doublé par rapport au début.
- Le cycle est maintenant répété jusqu'à 40 fois. Chaque fois, la séquence d'ADN est doublée. Après x cycles, on dispose de 2x fois la quantité d'ADN qu' au début:
  - Après 10 cycles : 210 ~ amplifié 1'000 fois

- Après 20 cycles : 220 ~ amplifié 1'000'000 fois
- Après 30 cycles : 230 ~ amplifié 1'000'000'000 fois



La méthode **PCR Real-time** ou **quantitative (qPCR)** présente le grand avantage que la quantité d'ADN est mesurée immédiatement pendant les cycles de multiplication (real time). Les molécules ajoutées adhèrent aux brins d'ADN et émettent un signal fluorescent. L'intensité du signal est en corrélation avec la quantité d'ADN disponible.

La variable-clé dans ce processus est la **valeur seuil (cycle threshold, ct-value)**, c'est-à-dire le cycle lors duquel une intensité définie du signal fluorescent est dépassée. Plus la valeur seuil est basse, moins il a fallu de cycles pour atteindre la quantité d'ADN pour émettre le signal, c'est-à-dire plus la quantité initiale d'ADN a été grande.



*Exemple : L'échantillon vert atteint la valeur seuil durant le 28e cycle, l'échantillon bleu l'atteint déjà durant le 23e cycle. Cela signifie qu'au départ, l'échantillon bleu contenait une quantité 32 (25) fois plus grande de la séquence d'ADN correspondante que l'échantillon vert (on admet une efficacité de 100 % lors de la multiplication).*

A l'aide de gammes de dilutions, qui partent d'un nombre connu de génomes pathogènes, on peut établir une courbe qui permet de définir, à partir des valeurs seuils, le nombre de génomes pathogènes.

## Exemple de résultats

| Numéro d'échantillon | Bactéries / groupes de bactéries   | Quantité            | Proportion | Ct                           | Cellules |
|----------------------|--|---------------------|------------|------------------------------|----------|
| No BDTA<br>Nom       | Enterococcus sp.<br>(including faecalis and faecium)<br><br>Beta-lactamase gene<br><br>Staph.sp. | +<br><br>+<br><br>+ | > 90 %     | 35.6<br><br>36.7<br><br>36.3 | 44       |
| No BDTA<br>Nom       | Staph. aureus  | ++                  |            | 28.4                         | 650      |

- Quantité : à partir de la valeur seuil (ct), les résultats sont donnés de manière semi-quantitative : + (infection faible), ++ (infection moyenne), +++ (forte infection).
- Proportion : Le germe en question représente une part supérieure à 90 resp. 99 % de l'ensemble des germes identifiés dans l'échantillon.
- Ct : Cycle threshold / valeur seuil. La valeur seuil correspond au cycle PCR durant lequel le signal fluorescent dépasse une certaine intensité, c'est-à-dire durant lequel une certaine quantité d'ADN est atteinte. Plus la valeur seuil est basse, plus le nombre des génomes mis en évidence, c'est-à-dire la quantité des agents pathogènes en question dans l'échantillon, est élevée. Il existe un rapport linéaire entre les génomes des bactéries et les unités formant colonies. Ce rapport dépend du nombre de copies du génome par agent pathogène, du taux d'extraction d'ADN et de l'efficacité de l'amplification. C'est la raison pour laquelle une conversion générale n'est pas possible.
- Cellules : Le nombre de cellules somatiques contenues dans les échantillons du contrôle laitier est déterminé.

## Interprétation

- Les agents pathogènes ne proviennent pas forcément du pis, ils peuvent provenir du canal du trayon ou, dans le cas d'échantillons non-stériles, de l'environnement.
- Pour l'interprétation des résultats, il faut tenir compte de tous les facteurs (raison de l'examen, cellules somatiques, symptômes cliniques, antécédents de la vache, situation au sein du troupeau).

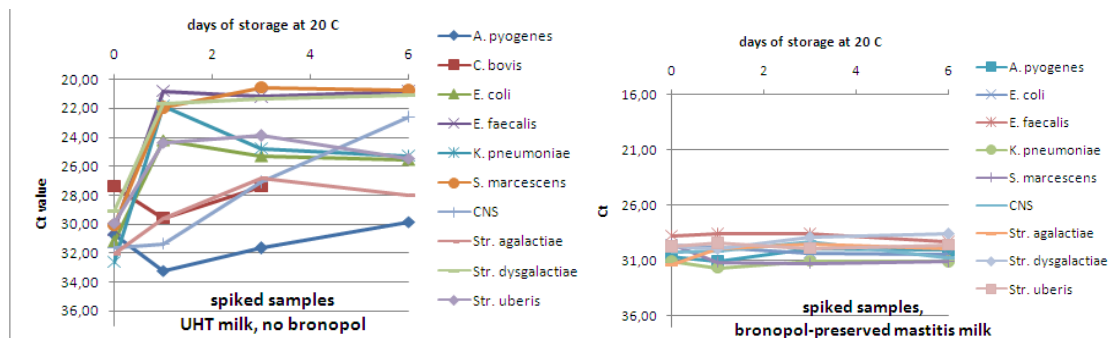
## Echantillons du contrôle laitier, autres échantillons prélevés de manière non aseptique

- Les germes identifiés peuvent provenir du pis, du canal du trayon, mais aussi de la peau du trayon, de salissures ou des faisceaux trayeurs. Si les trayons ont été suffisamment nettoyés, des entérocoques et d'autres agents pathogènes environnementaux peuvent pénétrer dans l'échantillon.
- Néanmoins et dans la plupart des cas, il est tout de même possible de se prononcer sur des échantillons contaminés. Souvent, un agent pathogène prédomine (part supérieure à 90 % dans l'échantillon). Dans ces cas, il faut porter une attention particulière au problème et à tous les autres facteurs.
- Les échantillons fortement pollués fournissent des indices importants concernant l'hygiène de traite, notamment le nettoyage des trayons, et donc le risque général de contamination par des agents pathogènes environnementaux!

- La probabilité que l'échantillon d'une vache soit contaminé par du lait de la vache précédente à cause des faisceaux trayeurs est très faible. L'effet de dilution est trop grand pour avoir une influence sur les résultats. (étude faite par CANWest).
- Les échantillons de lait de mélange se prêtent avant tout à la surveillance, ceci par exemple après un assainissement. En cas de résultats positifs, des échantillons d'animaux individuels doivent être analysés lors d'une deuxième étape.

## Echantillons conservés au moyen du Bronopol et échantillons non conservés

Le grand avantage des échantillons conservés est que, contrairement aux échantillons non conservés, les agents pathogènes ne se multiplient plus guère entre l'échantillonnage et l'analyse (voir graphiques). Par contre, lors de l'interprétation d'échantillons non conservés, il faut tenir compte d'une éventuelle multiplication ultérieure. Les quantités des agents pathogènes (valeurs ct) ne peuvent alors pas être comparées directement à celles d'échantillons conservés. Pour une meilleure comparabilité, il faut donc, dans la mesure du possible, travailler avec des échantillons conservés.



*Croissance de différents germes dans du lait non conservé et du lait conservé au moyen du Bronopol (source : Finnzymes)*

## Echantillons du pis – échantillons d'un quartier

- Dans le cas d'échantillons du pis, il y a lieu de tenir compte du fait que les agents pathogènes du quartier malade sont dilués avec le lait des quartiers sains (quatre fois et plus, car il y a souvent moins de lait dans le quartier malade). En cas de lait dilué quatre fois, la différence est d'au moins deux cycles PCR.
- Les échantillons prélevés dans les premiers jets de la traite, dans la traite totale et dans le lait d'égouttage ne sont pas directement comparables quant à la quantité d'agents pathogènes, ceci en raison de leur répartition dans le pis.

## Intensité d'infection / agents pathogènes différents

- S'il s'agit d'agents pathogènes contagieux (Staph. aureus, Str. agalactiae), il faut réagir déjà en cas d'infection faible. Les agents pathogènes identifiés proviennent du pis et guère de l'environnement (salissures).
- En cas d'agents pathogènes environnementaux, l'interprétation, surtout des échantillons prélevés de manière non aseptique, est plus exigeante. Il est impératif de tenir compte de tous les autres facteurs (cellules somatiques, symptômes cliniques, faits antécédents de la vache, situation au sein du troupeau).
- En cas de doute, il vaut la peine de travailler avec un échantillon prélevé de manière aseptique sur un quartier.
- Une infection faible par des staphylocoques à coagulase négative ne nécessite pas de mesures immédiates si la vache est saine et si le nombre de cellules somatiques est bas.

- En cas d'infection faible par *C. bovis*, il n'est pas nécessaire non plus d'agir immédiatement. Cependant, il existe différentes études qui expliquent une infection par *C. bovis* par un trempage insuffisant des trayons ou un effet insuffisant du trempage.

## Littérature concernant l'identification des mammites à l'aide de la méthode Real-time-PCR et concernant les agents pathogènes provocants des mammites en général

### Description et validation de PathoProof :

**Koskinen, M.T., J. Holopainen, S. Pyorala, P. Bredbacka, A. Pitkala, H. W. Barkema, R. Bexiga, J. Roberson, L. Solverod, R. Piccinini, D. Kelton, H. Lehmusto, S. Niskala and L. Salmikivi. 2009. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 92:952–959**

- 100 % de sensibilité et de spécificité pour les agents pathogènes du pis, 99 % pour les échantillons provenant de l'homme et d'animaux domestiques. Les agents pathogènes provenaient de divers pays.
- Sensibilité % = (nombre d'échantillons véritablement positifs / (nombre d'échantillons véritablement positifs + nombre d'échantillons faussement positifs)) x 100
- Spécificité % = (nombre d'échantillons véritablement négatifs / (nombre d'échantillons véritablement négatifs + nombre d'échantillons faussement positifs)) x 100

**Taponen S., L. Salmikivi, H. Simojoki, M. T. Koskinen and S. Pyorala. 2009. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J. Dairy Sci.* 92: 2610-2617.**

- Description détaillée de la méthode, y compris la série de dilutions pour l'établissement de la courbe standard
- Utilisation d'échantillons de vaches souffrant d'une mammité (symptômes cliniques et mammité avec activité NAGase confirmée) qui n'ont pas montré de croissance en culture.
- Parmi 79 échantillons, 32 sont positifs pour 1 agent pathogène, 2 échantillons pour 2 (11 *Staph. sp.*, 10 *Str. uberis*, 2 *Str. dysgalactiae*, 6 *C. bovis*, 3 *Staph. aureus*, 1 *E. coli*, 1 *Enterococcae*, 1 *Arcanabacter pyogenes*)
- Les échantillons positifs contiennent 103 à 107 copies du génome / ml de la bactérie en question.
- Ils en concluent que tous les agents pathogènes habituels provocant des mammites peuvent croître en culture, même s'ils sont présents en quantité importante.

**CANWEST DHI und Finnzymes. 2009. Validation of the PathoProof Mastitis PCR Assay for staphylococcus aureus. Detection from bronopol-preserved milk recording samples.**

#### **Confidential.**

- Des échantillons prélevés de manière aseptique ont été analysés à l'aide de cultures conventionnelles et de PathoProof, les échantillons du contrôle laitier des mêmes animaux (conservés au moyen du Bronopol) avec PathoProof.
- Tous les échantillons positifs en culture ont été confirmés par les deux échantillons PCR.
- Echantillons positifs supplémentaires détectés avec PCR, confirmés en partie lors d'une 2e mise en culture.
- Analyse de la problématique de la propagation par les faisceaux trayeurs : saisie de l'ordre de la traite. Analyse de la différence des ct (nombre de cycles PCR). Différence de 3.3 cycles signifie : 10% de propagation par le lait, ce qui n'est guère possible. Exception faite d'un cas douteux, la propagation est exclue, mais cette vache a montré des symptômes clairs de mammité.

**Pitkala, A., L. Salmikivi, P. Bredbacka, A.-L. Myllyniemi and M. T. Koskinen. 2007. Comparison of tests for detection of  $\beta$ -lactamaseproducing staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2031–2033.**

- Comparaison de 6 tests enzymatiques et de PathoProof pour détecter les staph. produisant de la b-lactamase, 175 isolats de *S. aureus*, *S. intermedius* et différents CNS.
- PathoProof et trois autres tests n'ont pas produit de résultats faussement positifs.
- PathoProof est le seul test à ne pas avoir produit de résultats faussement négatifs.

**<http://diagnostics.finnzymes.fi/pathoproof>**

### PCR en général

- <http://en.wikipedia.org/wiki/QPCR>
- [http://www.primerdesign.co.uk/\\_new\\_to\\_real-time\\_PCR\\_Beginner's\\_guide](http://www.primerdesign.co.uk/_new_to_real-time_PCR_Beginner's_guide)
- <http://www.realtimemicro.dk/principle.html>
- <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>

### Autres tests basés sur la PCR

**Graber, H. U., M. G. Casey, J. Naskova, A. Steiner, and W. Schaeren. 2007. Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk. *J. Dairy Sci.* 90:4661–4669**

- Description détaillée de la méthode développée
- Explications concernant la quantification ainsi que les proportions du nombre de bactéries (staphylococcal cell equivalent/ml) par rapport aux unités formant colonies (cfu/ml)
- DNA recovery rate: env. 70 jusqu'à plus de 90 %
- Sensibilité du diagnostique :  $1.15 \times 10^3$  cfu/ml de lait
- Sensibilité: 50.7, resp. à 507 fois plus sensible que la bactériologie (pour les échantillons de 100 resp. 10  $\mu$ l)

**Graber, H. U., E. Studer, W. Schaeren, J. Naskova, H. Pfaeffli, T. Kaufmann, M. Kirchhofer and A. Steiner. 2008. A longitudinal field study to evaluate the diagnostic properties of a quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay to detect *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Dairy Sci.* 91:1893–1902**

- Excrétion cyclique de *Staph. aureus*, sinusöide (pendant 6.5 jours croissante, pendant 6.5 jours décroissante)
- Il y a des vaches dont l'excrétion augmente sans redescendre : défaillance du système immunitaire.
- En cas d'excrétion faible, il y a souvent eu des résultats faussement négatifs pour les échantillons sur plaques (surtout parce que dans les analyses de routine, on utilise seulement 10  $\mu$ l de lait), pas de problème avec PCR, tous identifiés.
- Rapport log(SCE/ml) : log(cfu/ml) env. 200:1.

### Fréquence des différents agents pathogènes

Lors de la mise en valeur des échantillons des exploitations pilotes choisies au hasard par Suisselab, il a été frappant de constater que les fréquences des quartiers/animaux positifs sont beaucoup plus élevées par rapport aux procédures de dépistage (screening) étrangères (sur tous les animaux d'un troupeau). Cela s'explique toutefois par les méthodes appliquées : Pour les procédures de dépistage utilisées jusqu'à présent, c'est toujours la méthode de mise en culture qui a été appliquée. Comme Taponen et.al. l'ont montré, il y a un nombre conséquent d'échantillons qui ne montrent pas de croissance bien qu'ils contiennent des quantités considérables d'agents pathogènes. Il est aussi difficile de faire des comparaisons parce que lors des analyses, les valeurs seuils pour un résultat positif ont été fixées à des niveaux différents (pour *Staph. aureus* souvent à 100 cfu/ml de lait, pour les agents pathogènes environnementaux à 400 – 1'000 cfu/ml). L'échantillonnage non-stérile dans les exploitations pilotes a également une influence sur la présence de certains agents pathogènes dans les échantillons. Dans deux exploitations dont de nombreux échantillons étaient contaminés par des entérocoques, on n'a plus identifié d'entérocoques lors d'un deuxième échantillonnage, cette fois-ci stérile. Il faut en tenir compte lors de l'interprétation.

**Pitkala, A., M. Haveri, S. Pyorala, V. Mylly, and T. Honkanen-Buzalski. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001 – :Prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87:2433–2441.**

- Screening du troupeau

- Limite pour les échantillons positifs : 500 cfu/ml. Echantillon contaminé si > 2 agents pathogènes.
- En 2001, 33.5 % des échantillons prélevés sur des quartiers étaient positifs. En 1995 : 21 %
- 50 % des échantillons positifs sont des Staph. sp., 10 % des Staph. aureus, 34 % de C. bovis,
- Résistance à la pénicilline : 52.1 % et 32 % pour Staph. aureus et CNS.

**Osteras, O., L. Solverod, and O. Reksen. 2006. Milk culture results in a large Norwegian Survey - effects of season, parity, days in milk, resistance and clustering. J. Dairy Sci. 89:1010.**

- Screening du troupeau
- Limites pour les échantillons positifs : Staph. aureus : > 100 cfu/ml, autres agents pathogènes majeurs > 400 cfu/ml, agents pathogènes mineurs (si pures) > 4000 cfu/ml
- 76 % de quartiers négatifs
- 22 % de vaches avec au moins 1 quartier contaminé par Staph. aureus
- Effet saisonnier pour CNS et Str. dysgalactiae (élevé en avril- mai, c'est-à-dire en fin de saison à l'étable), Staph. aureus et Str. uberis (élevé en juin- juillet)
- Résistance à la pénicilline G : 11 % de Staph. aureus, 36 % de CNS, 0 % de Str. dysgalactiae, 11 % de Str. uberis.

**Tenhagen, B.-A., G. Koster, J. Wallmann, and W. Heuwieser. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J. Dairy Sci. 89:2542–2551.**

- Screening du troupeau
- 9.1 % de CNS, 7.3 % de C. bovis, 5.7 % de Staph. aureus par quartier
- Dans 30 % des troupeaux, on a toujours trouvé des Str. agalactiae (0.7 % des quartiers)
- Diverses informations sur les résistances

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

- Echantillons de quartiers montrant des symptômes d'une mammite clinique
- 43 % de cultures négatives, 10.3 % de Staph. aureus, 8.4 % d'E. coli, 7.3 % de Str. uberis, 5.1 % de CNS, 4.3 % de Klebsiella, 4.0 % de Str. dysgalactiae, 8.6 % contaminés
- La fréquence des agents pathogènes dépend du système de stabulation et de la région.

**Lago A., S. Godden, R. Bey, K. Leslie, P. Ruegg and R. Dingwell. 2007. Prevalence and etiology of subclinical intramammary infections in fresh cows. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.**

- CAN et USA: 11 troupeaux, env. 1'000 vaches analysées après le vêlage, sans mammite clinique, sans traitement préalable
- 72 % des vaches avec au moins 1 quartier positif
- 37 % des quartiers contaminés (Ø 2 par vache)
- 51 % des quartiers contaminés par des Staph. sp., 21 % par strep. environnementaux, 16 % par Bacillus spp, 8 % par coliformes, 2 % par Staph. aureus, 2 % autres

**Importance et comportement des staphylocoques à coagulase négative (CNS) comme agents provoquant des mammites**

**Taponen S., Pyorala S.. 2007. How important is coagulase-negative Staph as a cause of mastitis? . National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.**

- Bon aperçu du sujet, beaucoup de littérature
- Dans le passé, les Staph. sp. / CNS étaient considérés comme des agents pathogènes mineurs
- Beaucoup de nouvelles études montrent des parts élevées de Staph. sp. dans les cas de mammites (dans des troupeaux bien gérés qui réalisent des performances élevées)
- Les génisses sont souvent contaminées très tôt.
- Mammites souvent subcliniques ou légères avec augmentation modérée des SCC

- Traitement uniquement en cas de symptômes cliniques
- Peu de connaissances des types, ces derniers ont des caractéristiques différentes (adhésion, biofilm). Identification possible uniquement de façon limitée, besoin de recherche
- Résistance à la pénicilline souvent constatée (plus souvent que chez les Staph. aureus)

**Taponen, S., J. Koort, J. Bjorkroth, H. Saloniemi, and S. Pyorala. 2007. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified length polymorphism-based analysis. J. Dairy Sci. 90:3301-3307.**

- Troupeau d'essai, 82 vaches, échantillons avant/après le vêlage, ensuite chaque mois
- CNS analysés avec API staph ID et AFLP, cellules
- Infection persistante si au moins 3 échantillons consécutifs sont positifs
- 63 infections détectées, dont 29 persistantes, 34 passagères
- Le plus souvent : Staph chromogènes et simulans
- 72 % de concordance entre les deux tests, plus de 20 % des types n'ont pas pu être identifiés correctement par API.
- Nombre de cellules somatiques des quartiers contaminés env. 10 x plus élevé que celui des quartiers sains
- On n'a guère de connaissances sur la virulence des types de CNS (pourquoi des mammites cliniques seulement dans une partie des cas?).

**Timms L.L., L.H. Schultz. 1987. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. J. Dairy Sci. 70: 2648-2657.**

- Déjà en 1983, il y avait énormément d'infections par CNS.
- Restent durant la lactation.
- Nombre de cellules légèrement accru dans le pis, sensiblement accru dans le quartier
- Production laitière plus faible

**Nickerson, S.C., Ownes W.E., Boddie R.L. 1995. Mastitis in dairy heifers: Initial studies on prevalence and control. J. Dairy Sci. 78: 1607 – 1618**

**Myllys, V. 1995. Staphylococci in heifer mastitis before and after parturition. J. Dairy Res. 62:51.**

## Autres agents pathogènes

**Sears, P.M., D. J. Wilson, R. N. Gonzales, D. D. Hancock. 1991. Microbiological results from milk samples obtained from the diagnosis of bovine intramammary infections. J. Dairy Sci. 74, 4183-4188.**

- Les échantillons prélevés après la traite sont moins contaminés que ceux prélevés dans les premiers jets.
- Contamination par des CNS et streptocoques (autres que *Str. agalactiae*) du canal du trayon
- Il est recommandé de faire d'autres analyses.

**Morin D., C. Mallard, L. Fox, J. Roberson, L. Timms, R. Erskine, W. Hurley, P. Constable. 2001. Environmental Streptococcal Mastitis – Findings of a Multi-State Study. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.**

- 7 troupeaux surveillés pendant 1 an, échantillons de lait mensuels ainsi que lors du tarissement, après le vêlage et en cas de mammite clinique
- Des résultats provisoires ont seulement été présentés.
- Agents pathogènes les plus fréquents : CNS, ensuite streptocoques environnementaux. Les CNS ont toutefois provoqué moins de mammites cliniques que les streptocoques environnementaux : 8 % resp. 23 % des infections étaient cliniques)
- Beaucoup de contaminations par des streptocoques environnementaux interviennent dans la période du tarissement : les animaux positifs détectés lors du tarissement sont souvent guéris, mais il y a beaucoup de nouvelles infections jusqu'au vêlage.

**Watts, J.L., D.E. Lowery, J.F. Teel, S. Rossbach. 2000. Identification of *Corynebacterium bovis* and other *Coryneforms* isolated from bovine mammary glands. J. Dairy Sci. 83: 2373-2379.**

- L'identification de *C. bovis* à l'aide de la méthode de mise en culture cause beaucoup de travail.
- Au moment de l'étude, la méthode PCR demandait des investissements trop importants pour l'identification précise des *Coryneformes*, mais elle est exacte.

**Zadoks R., Y. Schukken. 2003. *Streptococcus uberis*: Environmental or contagious pathogen? National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.**

- Agents pathogènes environnementaux ou transmission de vache en vache ?
- Souches différentes chez les vaches : plutôt environnement
- *Str. uberis* détectés dans la litière et dans le fumier.
- Indice : moment de la contamination : période de tarissement / génisses ou pendant la lactation ?
- Même souche chez toutes les vaches : indice concernant la transmission, mais év. aussi contamination à la même source.
- Transmission de vache en vache : traite, lait dans les logettes, mouches
- Il peut être risqué de le considérer seulement comme un agent pathogène environnemental ; toujours tenir compte de la transmission de vache à vache lors d'un assainissement.

**Hogan J.S. and Smith K.L. 2003. Environmental Streptococcal Mastitis: Facts, fables and fallacies. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.**

- Streptocoques environnementaux : contamination la plus fréquente durant la période de tarissement
- Souvent des infections de courte durée : guérison spontanée ou traitement par des antibiotiques.
- L'étude montre qu'environ la moitié des infections interviennent sans symptômes cliniques.
- Origine : litière (souvent dans la paille), avant tout *Str. uberis*.
- USA : troupeaux avec des problèmes de mammites non contagieuses : souvent litière profonde, pas trop propre
- Traite : Il est important que les trayons soient propres et secs, év. prétrempage.
- *C. bovis* : pas d'effet protecteur. Il y a même des études qui, en cas de forte contamination par *C. bovis*, montrent souvent *Str. uberis* comme second agent pathogène.

**Quality Milk Production Services. 2005. *Serratia species and Mastitis – QMPS fact sheet.***

***Cornell University, College of Veterinary Medicine and New York State Department of Agriculture and Markets.***

Les *Serratia* sp. se trouvent dans le sol, dans les plantes, dans le fourrage et dans l'eau et peuvent être des agents pathogènes fortuits de mammites.

- *Serratia* a aussi été isolée dans la litière et dans les salles de traite.
- En partie, un lien a pu être établi entre les mammites provoquées par *Serratia* et la croissance de l'agent pathogène dans la litière ou dans les gobelets de trempage des trayons (avec des composés quaternaires d'ammonium). La source n'a pas toujours pu être mise en évidence.
- On suppose qu'une mauvaise hygiène et des bouts de trayons contaminés sont des facteurs de risque.
- Mammites subcliniques et cliniques possibles. Souvent, il n'y a que des symptômes cliniques faibles, tels que des flocons et la couleur altérée du lait.
- Il y a souvent une infection chronique avec des symptômes cliniques sporadiques.
- Il y a souvent des résistances aux antibiotiques, raison pour laquelle les traitements ne montrent guère de succès.
- Prévention : vaches propres, environnement propre et bonne hygiène de traite.