

République Algérienne Démocratique  
et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et la Recherche Scientifique  
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
المدرسة الوطنية العليا للطب



## THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences  
En Sciences Vétérinaires

### Thème :

**Caractérisation de *Staphylococcus aureus* isolé  
de mammites et impact sur les personnes à  
risque**

Présentée par : **Dr AKKOU Madjid**

### Membres du jury :

M <sup>r</sup> KHELAF D.	Professeur	<b>Président</b>	ENSV-Alger
M <sup>me</sup> RAMDANI-BOUGUESSA N.	Professeur	Directrice	CHU-Mustapha Bacha -Alger
M <sup>r</sup> LAURENT F	Professeur	Co-directeur	CNR- <i>Staph</i> -Lyon, France
M <sup>me</sup> AIT-LOUDHIA K	Professeur	Examinatrice	ENSV-Alger
M <sup>r</sup> MENOUEUR N.	Maître de conférences A	Examineur	ISV-Blida1
M <sup>r</sup> AMROUCHE T	Maître de conférences A	Examineur	UMM-Tizi Ouzou
M <sup>r</sup> KAIDI R	Professeur	Membre invité	ISV-Blida1

Année universitaire : 2016/2017

# Remerciements

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à “ Dieu le Tout Puissant », pour m’ avoir donné la volonté, la santé et la patience afin de réaliser et achever ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse **Professeur RAMDANI-BOUGUESSA Nadja**, d’ avoir dirigé méticuleusement ce travail, de m’ avoir fait confiance, encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Trouvez dans ce travail tout mon respect et l’ expression de ma profonde gratitude.

Au **Professeur LAURENT Frédéric**, mon co-directeur de thèse. Je suis touché de l’ honneur que vous me faites en acceptant de codiriger ce travail. A travers cette thèse, recevez toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour votre enseignement riche en informations lors de mes stages. Merci à l’ équipe de l’ INSERM et à tout le personnel du CNR des staphylocoques en commençant par le **Professeur Jérôme ETIENNE**, sans pour autant oublier **Professeur François VANDENESH** ainsi que toute l’ équipe technique que j’ ai été amené à côtoyer durant mon stage au CNR et particulièrement **Michèle BES, Anne TRISTAN, Hélène MEUGNIER, Christine GARDON, Christine COURTIER, Caroline BOUVEYRON** et **Olivier DAUWALDER**.

C’ est aussi pour moi un plaisir autant qu’ un devoir, d’ exprimer ma reconnaissance au **Professeur TAZIR Mohammed**, Chef de service du laboratoire de microbiologie du CHU Mustapha Bacha, de m’ avoir accueilli à bras ouverts au sein de son laboratoire. Je veux exprimer ma reconnaissance à tout le personnel du laboratoire que j’ ai été amené à côtoyer : **Mohammed BACHTARZI, Mustapha LAHLEB, Zakia BENAMEUR, Djazia BENBOUZID, Soumia BEKTACHE** et **Asma ACHAB**.

A **Mr KHELAF Djamel**, Professeur à l’ ENSV d’ Alger, pour l’ intérêt qu’ il a accordé au sujet et pour avoir fait l’ honneur de présider le jury de soutenance.

Que **M<sup>me</sup> AIT-LOUDHIA Khatima**, Professeur à l’ ENSV d’ Alger, soit vivement remerciée pour avoir accepté d’ examiner ce travail.

Je tiens aussi, à exprimer mes chers remerciements à **Dr MENOUERI Nabil**, Maître de conférences classe A, à l'ISV de Blida 1, pour avoir accepté de juger ce travail, hommages respectueux.

Je réitère tous mes remerciements à **Dr AMROUCHE Tahar**, Maître de conférences à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou d'avoir accepté d'évaluer notre travail de thèse.

Mes remerciements à notre icône des pathologies de la reproduction, notre invité d'honneur **Professeur KAIDI Rachid** de l'ISV de Blida1.

Je remercie également **Dr BOUZID Riad**, Maître de conférences à L'école nationale supérieure vétérinaire pour l'intérêt qu'il a accordé à notre travail.

Mes remerciements s'adressent au **Professeur Ceferino LÓPEZ-SÁNDEZ** du département de pathologie animale, faculté vétérinaire de Lugo Espagne pour son aide précieuse dans l'analyse des données.

A **Dr BENTAYEB Lamia**, à laquelle des remerciements sur papiers ne suffiront jamais à traduire ma gratitude envers elle, pour son soutien et ses encouragements continuels.

Je remercie **Dr ANTRI Kenza**, Maître de conférences à l'USTHB de Bab Ezzouar pour ses précieux conseils.

A **Dr SAIDJ Dihia**, Maître assistante à l'institut vétérinaire de Blida 1

A **Dr IDDOU Yacine**, Docteur vétérinaire praticien à Azazga, wilaya de Tizi Ouzou.

A **Dr FERDJI Abdelkrim**, Docteur vétérinaire praticien dans la région de Ouacif, wilaya de Tizi-Ouzou.

A **Dr SAIDANI Khelaf**, Maître assistant à l'institut vétérinaire de Blida 1

A **Dr MEBKHOUT Faiza**, **Dr HAMMOUNI Rabah**, **Dr TIGOULMAMINE Bilal**, **Dr MEGUENINE Redouane**.

Je vous témoigne à tous mes meilleurs sentiments et mes vifs remerciements pour vos conseils et surtout votre soutien moral dans les moments difficiles.

# *Dédicaces*

En hommage et à la mémoire de mes grands parents

A mes très chers parents, source de mes joies, secret de ma force. C'est à vous que je dois le mérite pour ce que je suis devenu aujourd'hui.

Puisse Dieu le Tout Puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur

A toute ma famille.

Recevez à travers ce travail, toute ma gratitude, mon estime et mes profonds sentiments

A tous ceux que j'aime et qui croient toujours en moi...

Enfin à toute personne qui reste convaincue que l'effort sincère et honnête est la seule voie vers la réussite et la réalisation de soi

## TABLE DES MATIERES

<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des productions scientifiques</b>	
<b>Résumés</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I.1. Caractérisation phénotypique et génotypique de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>I.1.1. Taxonomie .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1.2. Propriétés bactériologiques.....</b>	<b>3</b>
<b>I.1.3. Caractérisation du génome de <i>S. aureus</i> .....</b>	<b>4</b>
I.1.3.1. Le core du génome.....	5
I.1.3.2. Le core-variable du génome .....	5
I.1.3.3. Les éléments génétiques mobiles.....	6
I.1.3.3.1. Les bactériophages.....	6
I.1.3.3.2. Les îlots de pathogénécité staphylococciques (SaPI) .....	7
I.1.3.3.3. Les plasmides.....	7
I.1.3.3.4. La cassette chromosomique staphylococcique (SCC) .....	8
I.1.3.3.5. Les transposons .....	8
I.1.3.3.5. Les régions génomiques variables.....	9
<b>I.1.4. Evolution de la résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>9</b>
I.1.4.1. Emergence de <i>S. aureus</i> résistant à la méticilline (SARM) .....	9
I.1.4.1.1. Résistance de haut niveau à la méticilline.....	9
I.1.4.1.2. Résistance de bas niveau à la méticilline .....	10
I.1.4.2. Groupes de SARM chez l'homme .....	10
I.1.4.2.1. SARM-associé aux hôpitaux (SARM-AH) .....	11
I.1.4.2.2. SARM-associé à la communauté (SARM-AC) .....	11
I.1.4.2.3. SARM-associé au bétail (SARM-AB) .....	11
I.1.4.3. Menace de la résistance à la vancomycine (SARV) .....	12
<b>I.2. Niches écologiques et impacts de <i>S. aureus</i> chez l'homme et l'animal.....</b>	<b>12</b>
<b>I.2.1. Dissémination et survie dans des environnements variés.....</b>	<b>12</b>
<b>I.2.2. Spectre pathologique chez l'homme .....</b>	<b>13</b>
I.2.2.1. Infections à <i>S. aureus</i> chez l'homme.....	13
I.2.2.2. Prédipositions de l'homme aux infections à <i>S. aureus</i> .....	13

I.2.2.3. Importance de portage asymptomatique chez l'homme.....	13
I.2.2.3.1. Taux et type de portage chez l'homme.....	13
I.2.2.4.2. Acquisition et portage de <i>S. aureus</i> .....	15
I.2.2.4.3. Portage de SARM chez les professionnels de bétail.....	16
I.2.2.4.3.1. Prévalences chez les professionnels de l'élevage.....	16
I.2.2.4.3.2. Facteurs de variation du portage de SARM.....	16
I.2.2.4.4. Du portage à l'infection.....	16
I.2.2.2. Intoxications alimentaires staphylococciques.....	17
I.2.2.2.1. Définition.....	17
I.2.2.2.2. Facteurs de risque.....	17
I.2.2.2.2.1. Température, durée et niveau de contamination requis.....	17
I.2.2.2.2.2. Souches entérotoxigènes.....	17
I.2.2.2.3. Fréquence des intoxications staphylococciques.....	18
<b>I.2.3. Spectre pathologique chez les animaux.....</b>	<b>18</b>
<b>I.2.4. Infections intramammaires chez la vache laitière.....</b>	<b>19</b>
I.2.4.1. Importance des mammites à <i>S. aureus</i> .....	19
I.2.4.2. Classification des mammites à <i>S. aureus</i> .....	20
I.2.4.2.1. Critères de classification des mammites.....	20
I.2.4.2.2. La mammite clinique.....	20
I.2.4.2.2.1. La mammite suraiguë gangréneuse.....	20
I.2.4.2.2.2. La mammite clinique aiguë.....	20
I.2.4.2.2.3. La mammite chronique.....	21
I.2.4.2.3. La mammite subclinique.....	21
I.2.4.3. Pathogénie des mammites à <i>S. aureus</i> .....	21
I.2.4.3.1. Adhésion de <i>S. aureus</i> aux cellules hôtes.....	22
I.2.4.3.2. Echappement aux défenses de l'hôte.....	22
I.2.4.3.3. Invasion du tissu mammaire.....	23
I.2.4.3.4. Régulation de la virulence.....	24
I.2.4.4. Réponse immunitaire mammaire contre <i>S. aureus</i> .....	24
I.2.4.4.1. Caractère antigénique de <i>S. aureus</i> .....	24
I.2.4.4.2. Défenses anatomiques.....	25
I.2.4.4.3. Défenses cellulaires.....	25
I.2.4.4.4. Défenses humorales.....	27
I.2.4.5. Source de <i>S. aureus</i> et transmission.....	27
I.2.4.5.1. Pathogène à réservoir mammaire.....	27

I.2.4.5.2. Pathogène environnemental .....	28
I.2.4.6. Méthodes de prophylaxie et de contrôle.....	28
I.2.4.6.1. Mesures préventives.....	28
I.2.4.6.2. Antibiothérapie.....	29
<b>I.3. Phylogénie de <i>S. aureus</i> isolé chez l’homme et les animaux.....</b>	<b>29</b>
<b>I.3.1. Outils de typage moléculaire de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>29</b>
I.3.1.1. Le profil de Macro restriction du chromosome (PRMC) en champs pulsés.....	30
I.3.1.2. Méthodes fondées sur le séquençage.....	30
I.3.1.2.1. Multi locus sequence typing (MLST).....	30
I.3.1.2.2. <i>Spa</i> -typing .....	30
I.3.1.3. Amplification d’ADN par PCR.....	31
I.3.1.3.1. Typage <i>agr</i> .....	31
I.3.1.3.2. Détermination des gènes accessoires.....	31
I.3.1.4. Séquençage total du génome.....	31
<b>I.3.2. Bases moléculaires de la spécificité d’hôte de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>I.3.3. Phylogénie des souches de <i>S. aureus</i> .....</b>	<b>33</b>
I.3.3.1. Clones majeurs chez l’homme.....	33
I.3.3.2. Clones majeurs chez les ruminants .....	34
I.3.3.3. Adaptation aux nouvelles hôtes.....	34
<b>I.2.4. Evolution de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>35</b>

## **II. PARTIE PRATIQUE**

<b>II.1. Canevas général.....</b>	<b>36</b>
<b>II.1.1. Objectifs.....</b>	<b>36</b>
<b>II.1.2. Philosophie pratique.....</b>	<b>36</b>
<b>II.1.3. Protocole de l’étude et considérations pratiques.....</b>	<b>37</b>
<b>II.2. Matériel et méthodes .....</b>	<b>38</b>
<b>II.2.1. Population de l’étude et échantillonnage.....</b>	<b>38</b>
II.2.1.1. Choix de lieu de l’enquête .....	38
II.2.1.2. Echantillonnage.....	39
II.2.1.3. Détermination de la taille de l’échantillon.....	39
<b>II.2.2. Enquête au sein des élevages.....</b>	<b>40</b>
II.2.2.1. Prospection des élevages.....	40
II.2.2.2. Examen clinique des mamelles .....	40

II.2.2.3. Dépistage des mammites subcliniques.....	40
<b>II.2.3. Prélèvements et analyse microbiologique.....</b>	<b>41</b>
II.2.3.1. Prélèvement des échantillons du lait.....	41
II.2.3.1.1. Prélèvement des laits mammitieux chez les vaches.....	41
II.2.3.1.2. Technique de prélèvement.....	41
II.2.3.2. Prélèvements chez les professionnels .....	42
II.2.3.2.1. Considérations d'éthique et technique de prélèvement.....	42
II.2.3.2.2. Recueil des données démographiques .....	42
II.2.3.3. Isolement et identification des souches de <i>S. aureus</i> .....	42
II.2.3.3.1. Isolement de <i>S. aureus</i> .....	42
II.2.3.3.1.1. Tiges nasales.....	42
II.2.3.3.1.2. Echantillons de lait.....	43
II.2.3.3.2. Identification des souches de <i>S. aureus</i> .....	45
II.2.3.3.2.1. Test de la catalase.....	45
II.2.3.3.2.2. Pastorex <sup>TM</sup> Staph Plus.....	45
II.2.3.3.2.3. Test de la coagulase.....	45
II.2.3.3.2.4. Walk away.....	46
<b>II.2.4. Résistance aux antibiotiques et typage moléculaire.....</b>	<b>46</b>
II.2.4.1. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	46
II.2.4.2. Recherche de la résistance à la méticilline.....	47
II.2.4.2.1. Le disque de la céfoxitine.....	47
II.2.4.2.2. Le disque de l'oxacilline.....	47
II.2.4.2.3. Mise en évidence de la PLP <sub>2a</sub> .....	47
II.2.4.3. Conservation des souches.....	48
II.2.4.4. Caractérisation moléculaire des souches au CNR des staphylocoques de Lyon.....	48
II.2.4.4.1. Dispositions générales.....	48
II.2.4.4.2. Extraction Qiagen-Qiacube de l'ADN bactérien.....	49
II.2.4.4.2.1. Préparation des lysats .....	49
II.2.4.4.2.2. Extraction de l'ADN .....	50
II.2.4.4.2.3. Principe de l'extraction par colonne d'extraction sur Qiacube .....	51
II.2.4.4.3. Dosage de l'ADN.....	52
II.2.4.4.4. Amplification de l'ADN.....	53
II.2.4.4.4.1. Préparation des mélanges réactionnels (MIX) .....	53
II.2.4.4.4.2. Amorces utilisées.....	53

II.2.4.4.3. Amplification .....	54
II.2.4.4.5. Révélation des fragments amplifiés.....	54
II.2.4.4.5.1. Préparation du gel .....	54
II.2.4.4.5.2. Dépôt des amplifiats et migration .....	55
II.2.4.4.5.3. Révélation des amplifiats.....	55
<b>II.2.4.5. Le typage du gène codant pour la protéine A (Typage-de-<i>spa</i>) .....</b>	<b>56</b>
II.2.4.5.1. Séquençage de la région polymorphique de <i>spa</i> .....	56
II.2.4.5.2. Amplification du gène <i>spa</i> par PCR .....	56
II.2.4.5.3. Séquençage et analyse des séquences répétées .....	56
II.2.4.6. Typage par les puces à ADN .....	57
II.2.4.6.1. Présentation et importance des puces à ADN.....	57
II.2.4.6.2. Protocole d'utilisation des puces à ADN.....	57
II.2.4.6.3. Amplification et marquage de l'ADN extrait .....	58
II.2.4.6.3.1. Préparation du mélange réactionnel (MIX).....	58
II.2.4.6.3.2. Amplification de l'ADN.....	58
II.2.4.6.4. Hybridation et révélation des puces .....	59
II.2.4.6.4.1. Préparation des puces .....	59
II.2.4.6.4.2. Hybridation des puces .....	60
II.2.4.6.4.3. Addition du conjugué .....	60
II.2.4.6.4.4. Révélation des puces.....	60
II.2.4.6.4.5. Lecture des puces.....	60
<b>II.2.5. Synthèse des données et analyse statistique.....</b>	<b>61</b>
II.2.5.1. Collecte des données.....	61
II.2.5.2. Codage et saisie des données.....	61
II.2.5.3. Analyse statistique.....	62
<b>II.3. Résultats.....</b>	<b>63</b>
<b>II.3.1. Etude de l'échantillonnage.....</b>	<b>63</b>
II.3.1.1. Distribution géographique des échantillons.....	63
II.2.1.2. Description et évolution de l'échantillonnage au sein des fermes.....	64
<b>II.3.2. Enquête sur les mammites bovines au sein des élevages.....</b>	<b>66</b>
II.3.2.1. Prévalence des mammites chez les vaches laitières.....	66
II.3.2.2. Distribution clinique et subclinique des mammites chez les vaches.....	66
II.3.2.3. Facteurs de variation de la prévalence.....	67
II.3.2.3.1. Variations géographiques de la prévalence.....	67

II.3.2.3.2. Variations inter-cheptels de la prévalence des mammites.....	68
II.3.2.3.3. Variations individuelles .....	69
<b>II.3.3. Analyse bactériologique et isolement de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>69</b>
II.3.3.1. Analyse bactériologique de lait mammiteux.....	69
II.3.3.1.1. Résultats globaux.....	69
II.3.3.1.2. Impact des staphylocoques sur la santé de la mamelle chez la vache.....	70
II.3.3.1.3. Prévalence de <i>S. aureus</i> en mammites des vaches laitières .....	70
II.3.3.1.4. Répartition de <i>S. aureus</i> dans les mammites cliniques et subcliniques .....	71
II.3.3.2. Aspects descriptifs des mammites à <i>S. aureus</i> chez la vache.....	71
II.3.3.2.1. Prévalence des mammites à <i>S. aureus</i> chez les vaches laitières.....	71
II.3.3.2.2. Variations géographiques de la prévalence.....	72
II.3.3.3. Analyse de risque de mammites à <i>S. aureus</i> dans les élevages.....	72
II.3.3.3.1. Description des facteurs retenus.....	72
II.3.3.3.2. Facteurs de risques potentiels associés aux mammites.....	73
II.3.3.3.3. Facteurs de risques potentiels associés aux mammites à <i>S. aureus</i> .....	74
II.3.3.3.4. Portage nasal de <i>S. aureus</i> chez les professionnels .....	75
II.3.3.5. Isolement de <i>S. aureus</i> au niveau des fermes.....	76
II.3.3.6. Origine géographique des souches de <i>S. aureus</i> isolées.....	77
<b>II.3.4. Résistance aux antibiotiques et typage moléculaire.....</b>	<b>77</b>
II.3.4.1. Résistance aux antibiotiques .....	77
II.3.4.2. Profils de résistance aux antibiotiques .....	78
II.3.4.3. Allèles des gènes accessoires de régulation ( <i>agr</i> ).....	80
II.3.4.4. Typage de la protéine A (Typage de <i>spa</i> ).....	81
II.3.4.4.1. Composition en géotypes (types-de- <i>spa</i> ).....	81
II.3.4.4.2. Regroupement des souches de <i>S. aureus</i> selon les types-de- <i>spa</i> .....	82
II.3.4.5. Typage par les puces à ADN.....	84
II.3.4.5.1. Regroupement des géotypes .....	84
II.3.4.5.2. Spécificité d'espèce et gènes de virulence.....	85
<b>II.4. Discussion.....</b>	<b>87</b>
<b>II.4.1. Protocole d'étude et biais de conception .....</b>	<b>87</b>
II.4.1.1. Constitution de l'échantillon et biais de conception.....	87
II.4.1.2. Critères d'inclusion et qualité de données .....	88
<b>II.4.2. Enquête sur les mammites bovines en élevages.....</b>	<b>89</b>
II.4.2.1. Prévalence et importance des mammites.....	89
II.4.2.2. Caractérisation de la prévalence des mammites.....	89

II.4.2.2.1. Mammmites subcliniques.....	90
II.4.2.2.2. Mammmites cliniques .....	90
<b>II.4.3. Impact de <i>Staphylococcus aureus</i> dans l'environnement de l'élevage.....</b>	<b>91</b>
II.4.3.1. Portage nasal chez les professionnels.....	91
II.4.3.2. Caractérisation des mammmites à <i>S. aureus</i> chez la vache.....	92
II.4.3.2.1. Culture bactérienne du lait mammitieux.....	92
II.4.3.2.2. Fréquence d'isolement de <i>S. aureus</i> dans les cas de mammmites .....	92
II.4.3.2.3. Prévalence des mammmites à <i>S. aureus</i> .....	93
II.4.3.2.4. Analyse de risque d'apparition des mammmites à <i>S. aureus</i> .....	93
<b>II.4.4. Caractérisation de l'impact de <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>94</b>
II.4.4.1. Résistance aux antibiotiques des souches animales et humaines.....	94
II.4.4.1.1. Résistance à la méticilline.....	94
II.4.4.1.2. Fréquence de SARM en mammmites bovines.....	94
II.4.4.1.3. Fréquence de SARM en portage chez les professionnels .....	95
II.4.4.1.4. Résistance aux autres antibiotiques.....	96
II.4.4.1.5. Pression de sélection et transfert horizontal de gènes chez <i>S. aureus</i> .....	96
II.4.4.2. Typage des gènes accessoires de régulation ( <i>agr</i> ).....	97
II.4.4.3. Typage de <i>spa</i> et diversité clonale.....	97
II.4.4.4. Gamme de <i>Staphylococcus aureus</i> chez ruminants.....	98
II.4.4.5. Changement de l'hôte homme-bovin.....	99
II.4.4.6. Transfert anthro-po-zoonotique des génotypes de <i>S. aureus</i> .....	100
II.4.4.7. Toxines et profils de résistance.....	101
II.4.4.7.1. Mammmites à <i>S. aureus</i> et risque pour le consommateur.....	101
II.4.4.7.2. Staphylo-entérotoxines chez les souches supposées humaines.....	101
II.4.4.7.3. Résistance aux antibiotiques et contagiosité des mammmites à <i>S. aureus</i> .....	102
<b>CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>103</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>107</b>

**Annexes**

**Article**

# Liste des tableaux et figures

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Structure du génome de <i>S. aureus</i> : les séquences codant pour des protéines ayant des rôles variés dans le processus cellulaire ( <b>Holden et Lindsay, 2008</b> )	4
02	Fréquence de portage à <i>S. aureus</i> dans la population générale et les porteurs nasals ( <b>Wertheim et al., 2005</b> )	14
03	Modèle schématique de devenir intracellulaire de <i>Staphylococcus aureus</i> ( <b>Garzoni et Kelley, 2009</b> ).	23
04	Réponse immunitaire mammaire contre les microorganismes responsables de mammites ( <b>Oviedo-Boyso et al., 2007</b> ).	26
05	Pouvoir discriminant des outils moléculaires de caractérisation de <i>S. aureus</i>	29
06	eBURST plot de 696 STs issues de l'homme et des animaux ( <b>Shepherd et al., 2013</b> ).	33
07	Schéma récapitulatif du protocole général de l'étude	37
08	Répartition géographique de la population de l'étude et échantillonnage	38
09	Isolement de <i>Staphylococcus aureus</i> à partir du lait mammitéux	43
10	Protocole d'isolement de <i>S. aureus</i> à partir des tiges nasales et du lait mammitéux	44
11	Test à la PLP <sub>2a</sub>	48
12	Photo de l'automate d'extraction Qiagen-Qiacube	49
13	Face interne de l'automate avec les différents emplacements	50
14	Mise en place des lysats (a) ; des réactifs (b) et des colonnes d'extractions (c)	50
15	Extraction d'ADN par la colonne de l'automate Qiagen-Qiacube ( <b>Qiagen®, 2010</b> )	52
16	Dosage de l'ADN par le Nano-Drop 8000, ThermoScientific®	52
17	Dépôts des amplifiats dans le gel	55
18	Molecular Imager Gel Doc™ XR+	55
19	Les principales étapes d'utilisation des puces	58
20	Technique de préparation des puces à l'aide d'une pipette multicanaux	59
21	Thermomixeur de la marque Eppendorf®	59
22	Aspect des puces après l'étape de révélation	60
23	Lecture d'une puce ADN de <i>S. aureus</i> par l'automate Clondiag® - ARRAYMATE	61
24	Distribution inter-quartiers de la prévalence des types de mammites chez les vaches	69
25	Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats de PCR des gènes <i>mecA</i> , <i>mecC</i> et <i>gyr</i> chez les souches de <i>S. aureus</i> issues des professionnels.	80
26	Analyse des produits de PCR pour l'identification des groupes spécifique d' <i>agr</i> à partir des souches de <i>S. aureus</i> issues des professionnels	80
27	Arbre phylogénique <i>spa</i> -dépendante des souches animale et humaine	83
28	Illustration de dispersion des types-de- <i>spa</i> humains par rapport aux génotypes bovins	84

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Aperçu des facteurs associés au portage nasal à <i>S. aureus</i> (Wertheim <i>et al.</i> , 2005)	15
02	Infections cliniques les plus courantes à <i>S. aureus</i> chez les animaux (Pellerin, 2010)	19
03	Echelle clinique de détermination de la gravité de la mammité (Scott <i>et al.</i> , 2011)	20
04	Comparaison des réponses immunitaires mammaires contre <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i> chez la vache (Oviedo-Boyso <i>et al.</i> , 2007).	27
05	Exemples des traits de spécificité d'hôte et de leurs déterminants génétiques chez <i>S. aureus</i> (Peton et Le Loir, 2013)	32
06	Référence des amorces du système des gènes accessoires de régulation ( <i>agr</i> )	53
07	Référence des amorces des gènes <i>mecA</i> , <i>mecC</i> , <i>gyr</i> et <i>spa</i>	54
08	Répartition géographique des échantillons au sein de la population d'étude	63
09	Echantillonnage professionnel et animal au sein des fermes visitées	65
10	Prévalences cheptel, individuelle et quartier des mammites chez les vaches laitières	66
11	Prévalences quartier et individuelle des mammites chez les vaches examinées	66
12	Variations géographiques de la prévalence <b>individuelle</b> des mammites	67
13	Variations géographiques de la prévalence <b>quartier</b> des mammites chez les vaches	67
14	Variations de la survenue intra-cheptel des mammites cliniques et subcliniques au sein des élevages visités	68
15	Variations inter-quartiers de la prévalence des mammites cliniques et subcliniques	69
16	Nombre des espèces bactériennes isolées par échantillon de lait mammitéux	70
17	Fréquence d'isolement des bactéries des laits issus des quartiers mammitéux	70
18	Prévalences cheptel, individuelle et quartier de <i>S. aureus</i> responsable de mammites chez les vaches laitières	71
19	Prévalence de <i>S. aureus</i> impliqué dans les mammites cliniques et subcliniques chez les vaches laitières	71
20	Prévalence cheptel, individuelle et quartier des mammites à <i>S. aureus</i> chez les vaches laitières	72
21	Variations géographiques de la prévalence des mammites à <i>S. aureus</i>	72
22	Description des facteurs de risque potentiels associés aux mammites à l'échelle vache	73
23	Dernière étape de la régression logistique combinatoire relative aux mammites bovines	74
24	Dernière étape de la régression logistique combinatoire relative à l'infection par <i>S. aureus</i>	75
25	Distribution de la prévalence de <i>S. aureus</i> en fonction du type de contact professionnel	75
26	Prévalence et fréquence d'isolement de <i>S. aureus</i> des laits mammitéux et en portage nasal chez les éleveurs	76
27	Origine géographique des souches de <i>S. aureus</i> isolées en mammité et en portage	77
28	Fréquence de résistance aux antibiotiques des souches de <i>S. aureus</i> humaines et bovines	78
29	Profils de résistance des souches de <i>S. aureus</i> isolées des professionnels et de mammites bovines	79
30	Fréquence des allèles <i>agr</i> chez les souches de <i>S. aureus</i> isolées des professionnels et de	81

	mammites bovines	
<b>31</b>	Diversité des types-de- <i>spa</i> en fonction de leurs clusters	<b>82</b>
<b>32</b>	Caractérisation des souches de <i>S. aureus</i> isolées de lait de vaches ayant une IIM	<b>85</b>
<b>33</b>	Facteurs de virulence et origine des souches selon l'analyse par les puces à ADN	<b>86</b>
<b>34</b>	Comparaison des prévalences des mammites chez les vaches laitières selon les études	<b>90</b>

## *Liste des abréviations*

<b>ADN</b>	Acide désoxy-ribo-nucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b><i>A<sub>w</sub></i></b>	Activity water
<b>Bap</b>	Biofilm associated protein
<b>BURST</b>	Based upon related sequence types
<b>CC</b>	Complexe clonal
<b>CCS</b>	Comptage des cellules somatiques
<b>chips</b>	Chemotaxis inhibiting protein
<b>CMT</b>	Californian mastitis test
<b>EGM</b>	Eléments génétiques mobiles
<b>EHSGs</b>	Extended host spectrum genes
<b>FnBP</b>	Fibronectin binding protein
<b>Ica</b>	Intracellular adhesion
<b>IEC</b>	Immune evasion cluster
<b>Ig</b>	Immunoglobulin
<b>IIM</b>	Infections intramammaires
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IS</b>	Insertion sequence
<b>kpb</b>	Kilo paires de bases
<b>LPS</b>	Lipo-poly-saccharide
<b>LTA</b>	Acide lipotéichoïque
<b>MLST</b>	Multi locus sequence typing
<b>MSCRAMM</b>	Microbial surface components recognising adhesive matrix molecules
<b>OR</b>	Odds Ratio
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>pb</b>	Paires de Bases
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>pH</b>	Potentiel hydrogène
<b>PLP</b>	Protéines liant pénicillines
<b>PMRC</b>	Profile de macro-restriction de chromosome
<b>Sak</b>	Staphylokinase
<b>SaPI</b>	Staphylococcal pathogenicity island
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
<b>SARV</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine
<b>SASM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
<b>SCC</b>	Staphylococcal cassette chromosome

<b>SCIN</b>	Staphylococcal complement inhibitor
<b>SNP</b>	Single nucleotide polymorphism
<b><i>spl</i></b>	Serin protease like
<b><i>ssl</i></b>	Staphylococcal superantigen like
<b>ST</b>	Sequence type
<b>TGF-β</b>	Transforming growth factor beta
<b>TGH</b>	Transfert génétique horizontal
<b>TIAC</b>	Toxi-infections alimentaires collectives
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNF-α</b>	Tumor necrosis Factor-alpha
<b><i>tsst-1</i></b>	Toxic shock syndrome toxin-1
<b>UFC</b>	Unités formant colonies
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>VISA</b>	Vancomycin intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>

#### Dénomination des gènes de *S. aureus*

<i>agr</i>	accessory gene regulator
<i>ccr</i>	gène des recombinaisons
<i>gyrA</i>	gène de la gyrase
<i>mecA</i>	gène de la résistance à la méticilline
<i>mecC</i>	gène de résistance à la méticilline
<i>spa</i>	gène de la protéine A
<i>sarT</i>	<i>Staphylococcus</i> accessory regulator T
<i>sarG</i>	<i>Staphylococcus</i> surface protein G
<i>vSaa</i>	Variable <i>Staphylococcus aureus</i> alpha
<i>vSaβ</i>	Variable <i>Staphylococcus aureus</i> beta

#### Dénomination des gènes de toxines staphylococciques

<i>egc</i> :	enterotoxin gene cluster
<i>hla</i> :	hémolysine alpha
<i>hlb</i> :	hémolysine beta
<i>hlg</i> :	hémolysine gamma
<i>hlgv</i> :	hémolysine gamma variant
<i>lukSPV-lukFPV</i> :	leucocidine de Panton Valentine
<i>lukE-lukD</i> :	leucocidine lukE-lukD
<i>lukM</i> :	leucocidine M
<i>sea-i, sep, ser, ses, set</i> :	entérotoxine A-I, P, R, S et T
<i>sej-o, se/q, se/u, se/u2, se/v</i> :	entérotoxines-like J-O, Q, U, U2, et V

*vwb* : von willebrand

### Dénomination des gènes des adhésines de *S. aureus*

*efb* extracellular fibrinogen binding

*eap* extracellular adherence protein

*clfA* et *clfB* : clumping factors A et B

*fnbpA* et *fnbpB* : fibronectin binding protein

### Dénomination des gènes de ménage séquencés en MLST

*arcC* : carbamate kinase

*aroE* : shikimate déshydrogénase

*glpF*: glycerol kinase

*gmk*: guanylate kinase

*pta*: phosphate acétyltransférase

*tpi*: triphosphate isomérase

*yqiL*: acetyl coenzyme A acétyltransférase

# *Liste des productions scientifiques*

## Article

**Madjid Akkou, Kenza Antri, Mohamed-Azzedine Bachtarzi, Michèle Bes, Anne Tristan, Olivier Dauwalder, Rachid Kaidi, Hélène Meugnier, Mohamed Tazir, Jérôme Etienne, Frédéric Laurent and Nadjia Ramdani-Bouguessa, 2016.** Phenotypic and Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Bovine Mastitis and Nasal Carriage of Workers in Contact to Animals in Algeria. *Pakistan Veterinary Journal*, 36 (2): 184-188.

## Communications internationales

### Poster

**Akkou M., Antri K., Bès M., Tristan A., Bachtarzi M-A., Meugnier H., Tazir M., Etienne J., Ramdani-Bouguessa N., Laurent F, 2014.** Forte association de *Staphylococcus aureus* CC22 et CC97 aux infections intra-mammaires chez les vaches laitières dans les élevages algériens. SYMPOSTAPH (2014-10-20 à 2014-10-21) Lyon, France.

## Communications nationales

### Orale

**Akkou Madjid, Kaidi Rachid, Tazir Mohamed, Ramdani-Bouguessa Nadjia, 2015.** Prévalence et antibiorésistance de *Staphylococcus aureus* impliqué dans les mammites bovines et en portage nasal chez les professionnels d'élevage en Algérie. 5<sup>ème</sup> Journées Vétérinaires-Blida J.V.B. 28 & 29 novembre 2015, institut des sciences vétérinaires de Blida.

## RESUME

Pour caractériser la dynamique de *Staphylococcus aureus* dans le milieu de l'élevage, 32 cheptels bovins disposant de 5 à 25 vaches laitières, et 129 professionnels incluant les éleveurs, les vétérinaires et les ouvriers des abattoirs ont été retenus dans nos enquêtes. Parallèlement à une enquête de questionnaire, la recherche des cas de mammites a été réalisée systématiquement sur toutes les vaches en lactation soit cliniquement ou par le CMT. L'isolement de *S. aureus* a été effectué sur les échantillons de lait mammitieux et les écouvillons nasals issus des professionnels. Les souches dérivées de la culture ont été caractérisées initialement par les tests de sensibilité aux antibiotiques puis par la recherche des gènes *gyrA*, *mecA*, *mecC*. Enfin, le typage *agr*, le *spa*-typing et le typage par les puces à ADN ont servi à déterminer la phylogénie des souches bovines et humaines.

Nos résultats montrent que la mammite reste une pathologie dominante dans l'élevage bovin. Nous avons enregistré en effet, à l'échelle troupeau, individu et quartier des prévalences de 96,8% (531/32), 52,2% (116/222) et 24,5% (218/888) respectivement. L'impact économique se justifie par le déficit apparent causé par l'atrophie des quartiers (1,2%), de l'atteinte clinique (3,2% des quartiers), en plus du fardeau des pertes occultes liées aux mammites subcliniques (21,3% des quartiers). *S. aureus* colonise 38% des professionnels dépistés alors qu'il est responsable de 29,8% (65/218) des atteintes des quartiers, et ce avec un haut risque pendant les deux premiers mois de lactation, chez les vaches allaitantes élevées en promiscuité étroite avec leurs veaux. Quatre professionnels sains (3,1%) étaient colonisés par le SARM dont deux CC80, alors que les isolats dérivés des mammites bovines étaient tous sensibles à la méticilline.

Au regard des mammites, bien que les complexes clonaux : CC479, CC705, CC1, CC5, CC8, CC25 et CC188 soient décrits, la majorité des génotypes de *S. aureus* se rattachent principalement aux lignées CC97 et CC22. En effet, de multiples types-de-*spa* constituent le CC97 alors que seulement t223 compose le CC22. La diversité intra-cheptel, inter-quartier et même intra-quartier des génotypes, pourrait justifier que les infections intra-mammaires à *S. aureus* ne sont pas entièrement et automatiquement le résultat d'une transmission d'une vache à l'autre.

Par ailleurs, le génotype t223 (CC22) a été détecté aussi bien chez les vaches (27/67 des souches) que chez les professionnels (7/50 des souches). En termes de spécificité d'hôte, les gènes *sak*, *scn* et *chp* marqueurs spécifiques des souches humaines et une *tst1* humaine ont été révélés chez tous les génotypes t223 humains et bovins. Ces résultats plaident en faveur de la considération de l'impact du transfert anthropo-zoonotique des agents pathogènes en industrie agricole pour agir en conséquence.

**Mots clés :** *Staphylococcus aureus*, professionnels de bétail, mammites bovines, SARM, complexe clonal (CC), spécificité d'hôte

## ABSTRACT

To characterize the dynamics of *S. aureus* in the barn environment, 32 beef cattle within 5 to 25 dairy cows, and 129 professionals including farmers, veterinarians and slaughterhouse workers were retained in our investigations. Along with a questionnaire survey, research of mastitis cases was carried out systematically on all lactating cows either clinically or by the CMT. Isolation of *Staphylococcus aureus* was performed on samples of mastitic milk and nasal swabs from professional. Derived stem culture were initially characterized by antibiotics susceptibility testing to and the search of *gyrA* gene, *mecA*, *mecC*. Finally, *agr*, *spa*-typing and typing by DNA microarray were used to determine the phylogeny of bovine and human strains.

Our results show that mastitis remains a dominant disease in cattle. We recorded in fact, the herd scale, individual and quarter prevalence of 96.8%, 531/32, 52.2% (116/222) and 24.5% (218/888) respectively. The economic impact is justified by the apparent deficit caused by atrophy of quarters (1.2%), clinical attack (3.2% of districts), plus hidden losses subclinical mastitis burden (21.3% of quarters). *S. aureus* colonizes 38% of professionals detected while it is responsible for 29.8% (65/218) of the affected quarters, and with a high risk during the first two months of lactation in lactating cows reared in close promiscuity with their calves. Four healthy professionals (3.1%) were colonized with MRSA within Two CC80, while isolates derived from bovine mastitis were sensitive to methicillin.

In view of mastitis, although the lines CC479, CC705, CC1, CC5, CC8, CC25 and CC188 are described, the majority of *S. aureus* genotypes are related mainly to the CC97 and CC22 lines. Thus, multiple *spa*-types constitute CC97 while only t223 dials the CC22. The diversity of genotypes noted in herds, between quarters of same cows and even in the same quarter can justify that *S. aureus* related intramammary infections are not fully and automatically the result of transmission from one cow to another.

In addition, the t223 genotype (CC22) was detected in cows (27/67 of the strains) as well as among professionals (7/50 of the strains). In terms of host specificity, *sak*, *chp* and *scn* genes specific markers of human strains and a human *tst1* have been revealed in all human and cattle t223 genotypes. These results argue for considering the impact of anthropo-zoonotic transfer of pathogens in the agricultural industry to act accordingly.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, livestock professionals, bovine mastitis, MRSA, clonal complex (CC), host specificity



# ***Introduction***

### INTRODUCTION

La mammite est la pathologie la plus coûteuse et la plus importante dans l'industrie laitière. Elle se définit comme étant l'inflammation d'un ou plusieurs quartiers de la glande mammaire, caractérisée par des changements physique, chimique et microbiologique de la sécrétion lactée ainsi que des modifications pathologiques dans le tissu mammaire (**Sharif et Muhammad, 2009**). Les pertes économiques se justifient par le faible rendement des mamelles infectées, les traitements vétérinaires, les saisies de lait ainsi que la réforme prématurée des vaches (**Peton et Le Loir, 2014**). En termes d'incidence des mammites subcliniques, un coût moyen annuel de 4896 € a été estimé dans un troupeau de 100 vaches laitières au Pays-Bas (**Halasa et al., 2009**). Or, la présence d'agents pathogènes et/ou de toxines dans le lait ainsi que des résidus d'antibiotiques résultant de traitement des mammites peut compromettre sérieusement la santé publique.

L'agent causal de cette pathologie est un pathogène opportuniste de l'homme et de nombreuses espèces animales. Dans la population humaine saine, *S. aureus* est un résident permanent de nez chez 20% des individus, et un colonisateur intermittent chez 30% d'autres (**Wertheim et al., 2005**). D'où, il peut infecter tous les tissus du corps et être associé à un large éventail de troubles, des plus bénins au plus fatals (**Antreolletti et al., 2009**). Chez l'homme, les infections dues à *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) provoquent deux fois plus de mortalités que celles dues à *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) (**Cauda et Garau, 2009**). En Algérie la situation ne vaut pas mieux, car la fréquence des infections à SARM a atteint 42% en 2007 aussi bien en communauté qu'en milieu hospitalier (**Antri et al., 2011**). L'évidence croissante que le SARM peut se transmettre dans les deux sens, de l'homme à l'animal et vice-versa (**Oppliger et al., 2012; Ye et al., 2015**) est une préoccupation majeure, puisque *S. aureus* est incriminé dans environ un tiers des cas de mammites cliniques et subcliniques chez les vaches laitières (**Botrel et al., 2010**). Le principal réservoir de *S. aureus* est le quartier infecté de la mamelle et la transmission entre les vaches se produit habituellement pendant la traite (**Fox et Guy, 1993**). Des phénotypes multi-résistants incluant les SARM ont été décrits dans des infections intramammaires sévères et incurables chez les vaches (**Feßler et al., 2010**). De plus, le lait et les produits laitiers ont souvent été impliqués dans des intoxications alimentaires staphylococciques, et le lait cru contaminé étant souvent incriminé (**De Buyser et al., 2001**).

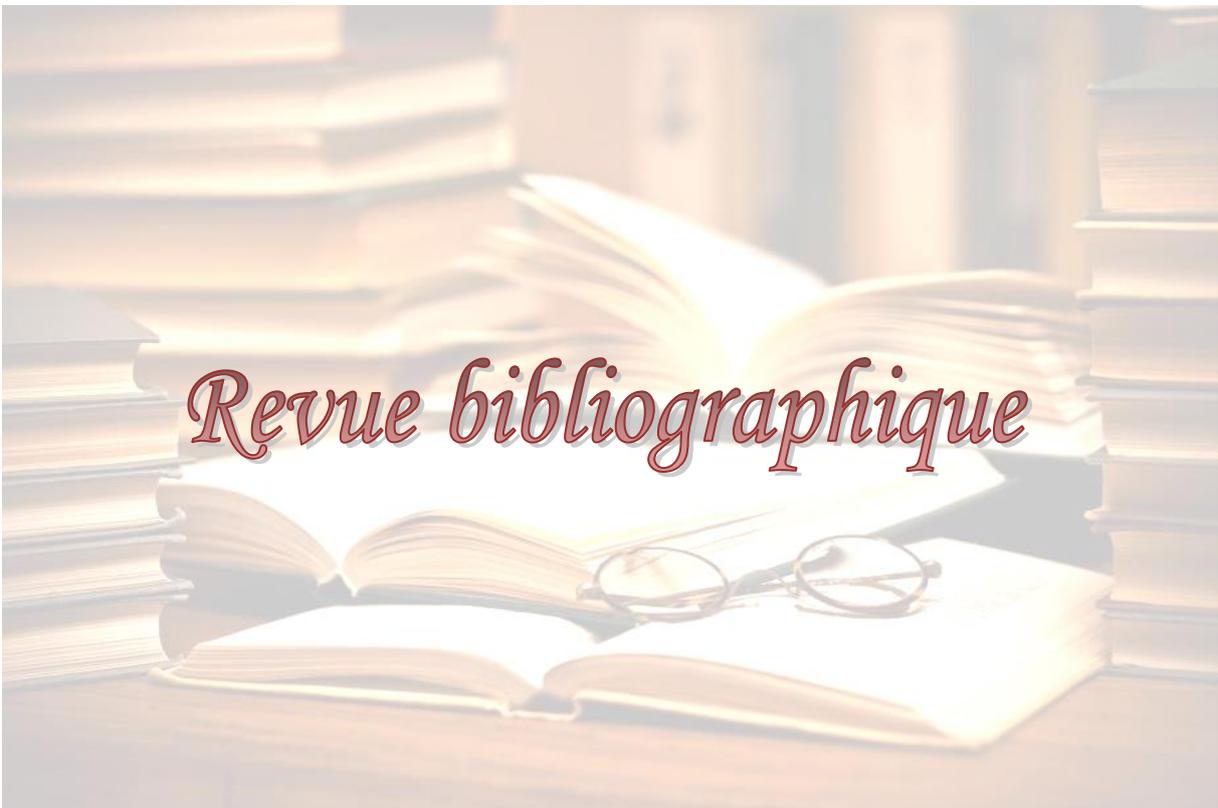
Le développement des outils moléculaires de caractérisation génétique des staphylocoques comme l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) et le

typage de la protéine A (*spa-typing*), a permis de préciser la phylogénie de *S. aureus*. Plusieurs populations ont été en effet, distinguées par rapport à l'épidémiologie, au risque zoonotique, à la contagiosité intra-troupeau, à la virulence et la persistance dans la glande mammaire ainsi qu'à la résistance aux antibiotiques (**Fournier et al., 2008 ; Graber et al., 2009 ; Piccinini et al., 2012**). En termes de spécificité de l'hôte, les méthodes de *spa-typing* et MLST ont montré que certains groupes clonaux étaient principalement à spécificité humaine (CC8, CC5, CC30, CC45, CC22), d'autres à spécificité animale (CC97, CC126, CC133, CC479 et CC705 chez les ruminants par exemple). Des clones à spécificité d'espèce occasionnelle voire inexistante ont été aussi enregistrés (**Hata et al., 2010 ; van Balkun et al., 2009**). La préoccupation majeure est liée à la transmission zoonotique de SARM-CC398 qui a eu lieu en Europe au cours des dernières années et à l'évidence que les souches associées au bétail peuvent coloniser et infecter l'homme (**Garcia-Alvarez et al., 2011**). Par ailleurs, l'isolement des clones CC8 dans les infections intramammaires chez les vaches en Suisse plaide en faveur de l'adaptation de clones humains chez les bovins (**Sakwinska et al., 2011a**). Il convient de signaler que des génotypes à spectre d'hôte étendu étaient rapportés parmi les clones de *S. aureus* impliqués dans les infections canines (**Vincze et al., 2013**). Or, pour adopter des stratégies de prévention et de prophylaxie adéquates, la considération des santés animale et humaine comme une seule santé devient une nécessité.

En Algérie, bien que l'épidémiologie moléculaire de *S. aureus* soit de plus en plus élucidée en communauté et dans les milieux hospitaliers (**Ramdani-Bouguessa et al., 2006 ; Antri et al., 2011 ; Ouchenane et al., 2011 ; Djoudi et al., 2013**), la dynamique de *S. aureus* dans le milieu de l'élevage entre les professionnels de bétail et les animaux reste mal connue. Afin de comprendre la dynamique des clones circulant dans le milieu de l'élevage, il nous a paru intéressant de mener des enquêtes épidémiologiques :

- ✓ Sur les vaches en lactation, en vue d'apprécier d'un côté, l'état de santé de leurs mamelles, en tenant compte des facteurs de risque liés à l'individu et à la conduite d'élevage ; et d'élucider d'un autre côté, la fréquence, la résistance intrinsèque, la virulence, la nature et l'origine des clones de *S. aureus* responsables de mammites bovines.
- ✓ Sur les professionnels ayant un contact étroit avec les animaux, afin de déterminer la fréquence, la résistance intrinsèque, la virulence, la nature et l'origine des clones de *S. aureus* impliqués dans le portage nasal des professionnels.

Cette étude a fait partie d'un projet algéro-français INSERM (unité 810) de 2010 à 2012.



## I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### I.1. Caractérisation phénotypique et génotypique de *S. aureus*

#### I.1.1. Taxonomie

Du point de vue taxonomique, le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des Firmicutes, à la classe des Bacilli et à l'ordre des Bacillales. En plus de *Staphylococcus sp.*, la famille bactérienne des *Staphylococcaceae* comprend quatre autres genres moins connus, *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* et *Salinicoccus*. Les membres du genre *Staphylococcus* diffèrent cependant de ceux du genre *Micrococcus* entre autres par leur métabolisme anaérobie facultatif, par un contenu en G+C compris entre 30 et 39% (contre 63 à 73% pour *Micrococcus*), par la paroi contenant un peptidoglycane et des acides teicoïques et par la présence de peptides oligoglycines dans les ponts peptidiques de la paroi (Pellerin *et al.*, 2010).

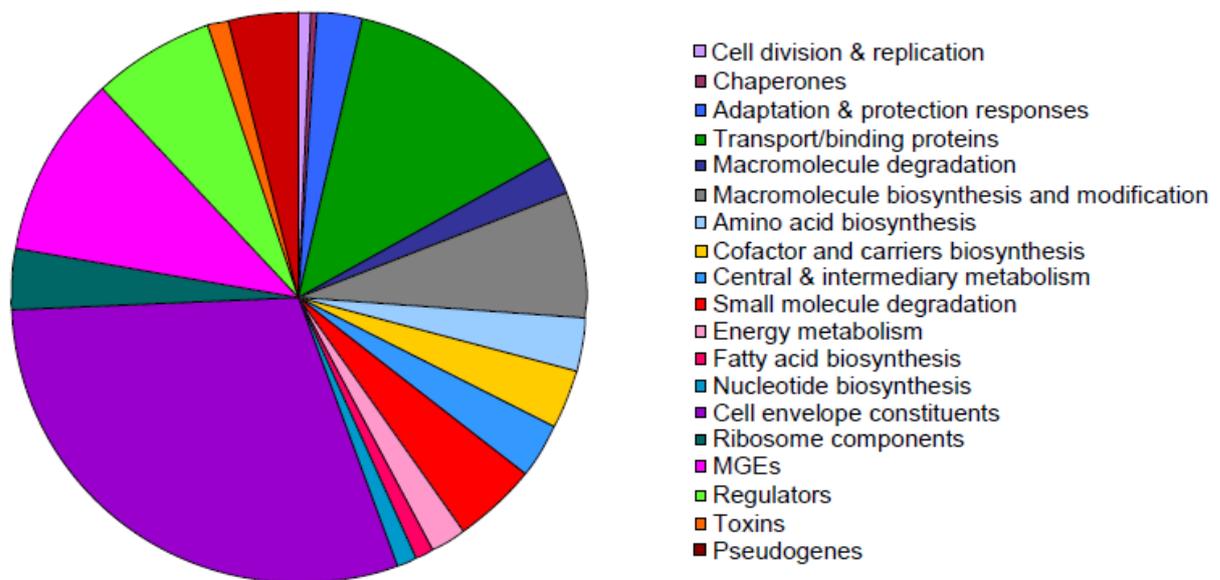
#### I.1.2. Propriétés bactériologiques

Les staphylocoques sont des coques immobiles, isolés ou groupés en diplocoques ou le plus souvent en amas plan de plusieurs éléments (du grec staphylo, grappe de raisin), avec un diamètre moyen de 0,8 à 1µm. Il est établi que *S. aureus* est une bactérie Gram-positive, aéro-anaérobie facultative qui produit une catalase et une coagulase, et pouvant tolérer une activité en eau très réduite ( $A_w=0,83$ ). Dans des conditions optimales, la division cellulaire se produit approximativement tous les 20 minutes (Freney, 2007 ; Pellerin *et al.*, 2010 ).

Au laboratoire, la bactérie est capable de croître sur une large gamme de milieux de culture, sélectifs ou non sélectifs. Sur une gélose au sang, les souches "typiques" de *S. aureus* donnent des colonies lisses, convexes avec des diamètres de 1~3 mm, de couleur jaune dorée due aux caroténoïdes, et sont souvent hémolytiques (Freney, 2007). L'aptitude de la bactérie à coaguler le plasma de lapin est le principal test caractérisant l'espèce *S. aureus*, mais de nouvelles espèces de staphylocoques à coagulase positive ont été récemment isolées : *S. schleiferi sub sp. coagulans*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. intermedius* et *S. hyicus*. Il est à noter que, d'une part, la coagulase n'est pas toujours présente chez ces deux dernières espèces et d'autre part, elles sont beaucoup plus rarement présentes dans les aliments que *S. aureus* (Brisabois *et al.*, 1997 ; Leyral et Vierling, 2007 ; De buyser, 2008).

### I.1.3. Caractérisation du génome de *S. aureus*

Le génome de *S. aureus* est constitué d'un chromosome et jusqu'à trois petits plasmides circulaires. Selon les souches, environ 2700 séquences codantes sont comptées chez *S. aureus*. En plus des ARNs structurels et régulateurs, la majorité des séquences codantes sont annotées à une fonction dont beaucoup d'entre elles sont putatives sur la base d'homologie avec des protéines ou des domaines connus (**Holden et Lindsay, 2008**). Les protéines codées entrent dans l'une des multiples catégories fonctionnelles selon leur implication dans la croissance, la réplication et la survie des cellules ainsi que l'interaction avec l'hôte (**Figure 1**). Les constituants de l'enveloppe cellulaire occupent la plus grande partie (20,3% du total des séquences codantes), avec les protéines de liaison/transport (9,2%) ainsi que des gènes associés aux éléments génétiques mobiles (EGM) (7,2%).



**Figure 1** : Structure du génome de *S. aureus* : les séquences codant pour des protéines ayant des rôles variés dans le processus cellulaire (**Holden et Lindsay, 2008**)

La structure du génome est en grande partie conservée et se compose d'un génome de base, qui affiche une identité de nucléotides élevée entre les souches, interrompue par des régions de différence d'une taille d'environ 500 pb à 50 kb. Les projets de séquençage du génome bactérien divisent traditionnellement le génome en un core et des parties accessoires, mais pour *S. aureus*, **Lindsay et al. (2006)** ont différencié le génome accessoire en EGM et une région variable de base. Les gènes du core variable affichent une plus grande variation que les gènes de base,

toutefois ils sont généralement stables et transférés verticalement à l'intérieur notamment des lignées clonales (**Lindsay et al., 2006**).

### I.1.3.1. Le core du génome

La comparaison de plusieurs souches de *S. aureus* appartenant à des lignées différentes, par des études d'hybridation génomique comparative, a révélé un génome de base "core" comprenant environ 77% du nombre total des cadres ouverts de lecture (ORF) (**Fitzgerald et al., 2001 ; Lindsay et al., 2006**). Le core du génome est fortement conservé, avec plus de 95% d'homologie entre les paires orthologues des gènes appartenant à des souches différentes (**Lindsay et al., 2006**). La divergence de séquence des gènes de base est due habituellement à une mutation ponctuelle (**Feil et al., 2003**). En effet, des exemples de changement adaptatif progressif ont été identifiés suivant la comparaison séquentielle des isolats cliniques. Un total de 35 SNP (*single nucleotide polymorphism*) associés à l'évolution de la résistance aux antibiotiques étaient identifiés chez les souches de *S. aureus* JH1 JH9, ce qui laisse suggérer qu'un nombre limité de mutations peut conduire à des changements phénotypiques importants dans cette espèce (**Mwangi et al., 2007**). La recombinaison homologue peut aussi conduire à la diversification de core du génome, bien que des études suggèrent que celle-ci soit > 15 fois moins probable (**Feil et al., 2003**).

### I.1.3.2. Le core-variable du génome

Le core-variable comprend environ 10% à 12% du génome de *S. aureus*. Certains gènes du core variable ne sont présents que dans un sous-ensemble de souches, généralement en conformité avec des complexes clonaux déterminés (**Lindsay et al., 2006**). Des régions portant de 1 à 9 gènes, dont beaucoup codent pour des déterminants importants de la virulence, peuvent être insérés ou supprimés. Des exemples comprennent le gène régulateur accessoire staphylococcique T "sarT" qui régule l'expression des facteurs de virulence tels que les  $\alpha$ -toxines (**Schmidt et al., 2001**), et le gène de la surface ancrée staphylococcique G "sasG" qui favorise l'adhérence aux cellules épithéliales nasales desquamées et la formation de biofilm (**Corrigan et al., 2007**). Alternativement, les gènes du core-variable peuvent exister dans toutes les souches, tout en montrant de grandes variations. Par exemple, FnbpA, un important facteur de virulence impliqué dans la liaison aux composants des tissus de l'hôte, des corps étrangers et d'agrégation plaquettaire, comporte une zone centrale d'environ 145 pb, qui varie sensiblement entre les souches (**Greene et al., 1995 ; Heilmann et al., 2004 ; Lindsay et al., 2006**). En outre,

différents variants de gène *coa* codant pour une coagulase ont été identifiés dans des complexes clonaux distincts (**Lindsay et al., 2006**).

### **I.1.3.3. Les éléments génétiques mobiles (EGM)**

Les EGM sont des pièces discrètes d'ADN qui codent pour des facteurs leur permettant de mobiliser au sein ou entre les génomes. Ces gènes peuvent être importants pour la virulence, la spécificité de niche, la résistance aux antibiotiques, la régulation et/ou des voies métaboliques particulières (**Ochman et al., 2000 ; Lindsay, 2008**). Un certain nombre de déterminants de virulence et de résistance se trouvent sur des phages, des îlots de pathogénéité de *Staphylococcus aureus* (SaPI), des plasmides ainsi que d'autres EGM chez *S. aureus*. Chaque souche de *S. aureus* porte une combinaison unique des EGM dans son chromosome, dont beaucoup peuvent se déplacer dans et hors des souches à une certaine fréquence (**Moore et Lindsay, 2001; Goerke et al., 2006**).

#### **I.1.3.3.1. Les bactériophages**

Les bactériophages sont très répandus chez les souches de *S. aureus*. Ils peuvent coder des toxines connues telles que l'entérotoxine A, la leucocidine de Pantone-Valentine (PVL), la protéine inhibitrice du complément (scin), la protéine inhibitrice de chimiotaxie (chip) et la staphylokinase (sak) (**Lindsay, 2010**). Les bactériophages sont classés en familles selon la séquence du gène de l'intégrase, qui détermine le site d'intégration dans le génome (**Lindsay et Holden, 2004**). Certains bactériophages, appelés phages de transduction généralisée, jouent un rôle important dans le transfert horizontal de l'ADN entre les souches de *S. aureus*. La majorité des bactériophages de *S. aureus* appartiennent à la famille des virus bactériens tempérés portant une queue des *Siphoviridae* (**Goerke et al., 2009**), également appelée des phages de classe II. Les génomes des phages ont souvent environ 40 kpb de longueur et présentent une structure en mosaïque, bien qu'il y ait généralement un arrangement conservé de modules fonctionnels pour la lysogénie, la réplication de l'ADN, la régulation de la transcription, l'emballage de la tête et la lyse. D'autres types de phages identifiés chez *S. aureus* incluant des phages de petite taille (<20 kpb) de classe I et des phages de grande taille (>125 kpb) de classe III qui sont membres de la famille des *Myoviridae* (**Kwan et al., 2005**).

Quand un phage intègre le chromosome, il devient un prophage stable et se réplique avec le reste du génome, en étant transféré verticalement aux cellules bactériennes filles. Le prophage peut être induit par des facteurs de stress tels que la lumière ultraviolette et certains antibiotiques, qui

le font exciser et reproduire comme une unité indépendante. Au fil du temps, la capacité de mobiliser peut être perdue et la totalité ou une partie de la séquence de prophage peut s'associer de façon stable, au chromosome. Enfin, la recombinaison et les autres mécanismes de dégradation du génome peuvent conduire à la perte des gènes structurels et fonctionnels, tout en conservant ceux qui ont une fonction importante pour la bactérie (McShan et Ferretti, 2007).

### I.1.3.3.2. Les îlots de pathogénéicité staphylococciques (SaPI)

Les îlots de pathogénéicité de *Staphylococcus aureus* (SaPI) sont des EGMs d'environ 15 kpb à 17 kpb, codant souvent des gènes de virulence. En plus de plusieurs sites spécifiques d'intégration chromosomique, un ou plusieurs SaPI ont été trouvés dans presque tous les génomes séquencés de *S. aureus*. L'excision et la réplication sont induites par un phage co-réplicateur ; l'élément est emballé dans des particules de phage-like puis transmis à une fréquence très élevée (Lindsay *et al.*, 1998 ; Ruzin *et al.*, 2001 ; Úbeda *et al.*, 2005 ; Tormo *et al.*, 2008).

Les SaPI, semblables à beaucoup de bactériophages, ont une structure en mosaïque, avec une organisation modulaire conservée. Chacun contient un gène de site-spécifique de l'intégrase adjacent à deux gènes codant pour des régulateurs de transcription putative, d'un module de réplication comprenant des protéines ayant une hélicase et une activité primase et un module d'encapsidation de six gènes (Subedi *et al.*, 2007; Úbeda *et al.*, 2007a; Úbeda *et al.*, 2007b). Les SaPI peuvent coder des toxines de syndrome de choc toxique-1 (tsst), des gènes de super-antigène, en particulier *seb* et *sec* qui sont également impliqués dans le syndrome de choc toxique, et des protéines associées aux biofilms Bap (Cucarella *et al.*, 2001 ; Lindsay, 2010). Un transporteur putatif de multi-résistance aux antibiotiques et un gène de résistance à l'acide fusidique ont également été signalés sur les SaPI (O'Neill *et al.*, 2007; Guinane *et al.*, 2008).

### I.1.3.3.3. Les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires qui se répliquent indépendamment du principal chromosome bactérien. Ils sont fréquemment transférés entre les cellules, bien que ce système de transfert puisse être bloqué dans le laboratoire en utilisant le système de modification de restriction *Sau1* (Waldron et Lindsay, 2006). En plus que le nombre de plasmides associés à une souche de *S. aureus* est très variable, les études de puces à ADN ne parviennent pas souvent à les détecter ; ce constat suggère l'existence de variations substantielles de séquences. Les isolats peuvent avoir plusieurs plasmides dont la taille varie de 3 kpb à 150 kpb (Lindsay, 2008).

On distingue trois familles, classées selon la taille et la capacité à conjuguer. Les plasmides de classe I sont les plus petits (généralement moins de 5 kpb), se présentent en grand nombre de copies, parfois intégrés dans le chromosome et peuvent transporter un ou deux gènes de résistance aux antibiotiques (**Khan, 2005**). Les plasmides de classe II sont plus grands, jusqu'à 40 kpb, dont beaucoup d'entre eux confèrent une résistance aux  $\beta$ -lactamines, aux métaux lourds, aux antiseptiques ou aux aminoglycosides. Les gènes de résistance font souvent partie des transposons qui ont intégré le plasmide. Les plasmides de classe III sont les plus importants (jusqu'à 60 kb) et sont les seuls plasmides de conjugaison en raison de la présence de gènes *tra* (**Lindsay et Holden, 2006**). Ils sont semblables aux plasmides de classe II par rapport aux gènes de résistance portés.

#### **I.1.3.3.4. La cassette chromosomique staphylococcique (SCC)**

Les SCC sont de grandes pièces d'ADN qui s'insèrent toujours dans le gène *orfX* de *S. aureus*. Beaucoup portent le gène *mecA* codant pour la résistance à la méticilline (*SCCmec*). SCC peut également transporter d'autres gènes de résistance portés sur de petits transposons ou intégrés à de petits plasmides (**Lindsay, 2010**). Bien que les SCC soient probablement mobilisées par des protéines codées par des gènes de *ccr*, le processus ne semble pas être très efficace ; les *SCCmec* restent relativement stables et se déplacent rarement par rapport aux autres EGM (**Katayama et al., 2000**).

Plusieurs types de *SCCmec* ont été décrits (classI-VII, etc) et chacun a une combinaison unique de résistance, un *ccr* et d'autres gènes (**Ito et al., 2004**). Au cours des dernières années, de nouvelles classes semblent développer ou réorganiser les unes avec les autres et probablement se transférer entre les souches à une fréquence plus élevée (**Nübel et al., 2008**). Il est également suggéré que les classes IV soient les plus petites et les plus transférées entre les souches. Elles sont moins gênantes pour la cellule bactérienne (**Lee et al., 2007**) et ne portent pas *fudoh*, un gène qui pourrait limiter la virulence (**Kaito et al., 2008**).

#### **I.1.3.3.5. Les transposons**

Les transposons comprennent ceux qui sont relativement petits et codent des gènes de résistance (comme Tn552 portant *bla* pour pénicillinase et Tn554 portant des gènes de résistance à l'érythromycine et à la spectinomycine). Ils peuvent être trouvés intégrés dans le SCC ou dans les plasmides ou sur le chromosome. D'autres transposons ont tendance à être grands et relativement rares, mais peuvent coder pour la résistance à la tétracycline, au triméthoprime ou aux

aminosides (**Lindsay, 2010**). Les transposons peuvent également se transférer entre des espèces distinctes, telles que le transposon *vanA* originaire des entérocoques (**Clark et al., 2005**). Vu qu'ils s'intègrent souvent dans des sites non spécifiques du génome, plusieurs copies de transposons peuvent être identifiées. Des séquences d'insertion (IS) sont des transposons qui codent seulement pour la transposase. Plusieurs types, identifiés dans les EGM du génome de *S. aureus*, peuvent être considérés comme "égoïstes", car ils utilisent la cellule hôte pour générer plusieurs copies. En conséquence, ils portent souvent des gènes qui fournissent un avantage sélectif de sorte qu'ils aient une plus grande chance d'être retenus (**Ochman et al., 2000**).

### I.1.3.3.5. Les régions génomiques variables

*vSaa* et *vSaf* sont des îlots génomiques identifiés chez *S. aureus* qui varient considérablement entre les lignées clonales. Il n'y a aucune preuve que ces îlots génomiques sont mobiles et ne contenant généralement pas de gènes impliqués dans la mobilité. *vSaa* codent pour un groupe de protéines super-antigéniques-like (*ssl*) et dix lipoprotéines. *vSaf* codent pour le cluster *egc* de superantigènes, le bi-composant leucotoxine *lukD* et *lukE*, et le cluster *spl* des sérine protéases. Les deux îlots codent également pour des protéines de modification de restriction et des transposases putatives HsdS et HsdM, qui dans certains cas sont cadre-décalés, ce qui suggère qu'ils ne sont plus fonctionnels (**Lindsay et al., 2006 ; Lindsay, 2008**).

## I.1.4. Evolution de la résistance aux antibiotiques

### I.1.4.1. Emergence de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM)

#### I.1.4.1.1. Résistance de haut niveau à la méticilline

Le mécanisme clé de la résistance à la méticilline chez les souches de SARM est lié à l'expression d'une protéine liant les pénicillines (PLPs) codée par un élément génétique mobile *mec*. Les PLPs sont une famille de protéines qui catalysent les réactions de transpeptidation dans les couches de peptidoglycane de la paroi des staphylocoques. Ainsi, l'acquisition d'une cassette chromosomique *SCCmec* portant le gène *mecA*, qui code une protéine membranaire additionnelle (PLP2a) dont l'affinité pour les bêta-lactamines est très faible, entraîne une résistance croisée à toutes les molécules de cette famille (**Sanchini et Pantosti, 2011**).

En 2011, de nouveaux clones de SARM multi-sensibles vis-à-vis des autres familles d'antibiotiques ont été décrits pour la première fois dans les prélèvements de mammites bovines et chez l'homme au Royaume-Uni et au Danemark (**Garia-Alvarez et al., 2011**). Ces souches

portent un nouveau variant de gène *mecA* présentant moins de 70% d'homologie avec le classiquement décrit gène *mecA*. Compte tenu de cette faible homologie, ce variant pouvait être considéré comme porteur d'un véritable nouveau mécanisme de résistance. Initialement dénommé *mecA* LGA251 du nom de la première souche identifiée (*S. aureus* LGA251), il portera finalement le nom *mecC* (International World Group for *SCCmec* Cassette (IWG-*SCCmec*). Les travaux conduits parallèlement par **Garcia-Alvarez et al. (2011)** et **Shore et al. (2011)** sur les premières souches identifiées ont montré que ce gène *mecC* est porté par une cassette *SCCmec* du type XI, différente de toutes les cassettes *SCCmec* décrites à ce jour. A l'instar de gène *mecA* qui code une PLP2a, le gène *mecC* code une PLP2c possédant elle aussi une faible affinité pour l'ensemble des bêta-lactamines. Cependant cette résistance s'avère phénotypiquement difficile à détecter en raison d'augmentation très variable des concentrations minimales inhibitrices d'une bêta-lactamine à l'autre, ce qui entraîne une mauvaise détection de certaines souches par les automates d'analyse classiquement utilisés en routine (**Sanchini et Pantosti, 2011**).

### I.1.4.1.2. Résistance de bas niveau à la méticilline

Elle est beaucoup plus rare et concerne les souches phénotypiquement résistantes à la méticilline mais ne possédant pas le gène de résistance. Elle est liée à d'autres mécanismes que la présence d'une PLP supplémentaire : **(i)** Une pénicillinase peut être hyper-produite (rarement une oxacillinase, une méticillinase) cette dernière étant capable d'hydrolyser partiellement les pénicillines M ; l'activité de l'antibiotique est restaurée par les inhibiteurs de bêta-lactamases. Ces souches sont appelées BORSA (Borderline resistant *S. aureus*). **(ii)** une modification des PLPs initiales ayant une moindre affinité pour la méticilline, ces souches sont appelées MODSA (Modified *S. aureus*) (**Brun et al., 2007**).

### I.1.4.2. Groupes de SARM chez l'homme

Les SARM présentent une virulence similaire à celle de *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM). Les taux élevés de mortalité liés aux SARM se produisent en cas d'infections sévères mal traitées en raison de la multi-résistance des isolats. Les bactériémies à SARM causent un taux de 30 à 40% de mortalité, dont environ 20% sont imputables directement à l'organisme (**Gould, 2007**). On peut distinguer trois classes de SARM :

#### **I.1.4.2.1. SARM-associé aux hôpitaux (SARM-AH)**

Traditionnellement le SARM est considéré comme étant un agent pathogène hospitalier (SARM-AH). Les infections à SARM-AH sont censées être nosocomiales si elles apparaissent au moins 48 heures après l'admission dans un établissement de soins. Le séjour prolongé à l'hôpital, les soins dans les établissements de santé, le traitement prolongé aux antibiotiques, les interventions chirurgicales et/ou le contact étroit avec des personnes infectées ou colonisées par le SARM sont des facteurs de risque pour attraper le SARM-AH (**McCarthy et al., 2010**). Selon **Kock et al. (2010)**, plus de 150000 patients sont infectés annuellement par le SARM dans les établissements hospitaliers de l'union européenne. Enfin, des prévalences de 33,2% (204/614) et 42% (141/335) ont été rapportées pendant les périodes de 2003 à 2004 et de 2006 à 2007 respectivement dans les hôpitaux d'Alger (**Ramdani-Bouguessa et al., 2006 ; Antri et al., 2010**).

#### **I.1.4.2.2. SARM-associé à la communauté (SARM-AC)**

Dès 1990, les souches de SARM ont été de plus en plus documentées chez les personnes en bonne santé et sans facteurs de risque liés aux soins. Ces cas ont été référés comme des SARM-associés à la communauté (SARM-AC). Un contact étroit entre les personnes dans les milieux sportifs, les écoles, les crèches et les prisons est considéré comme un facteur de risque (**Catry et al., 2010**). L'analyse moléculaire des souches de SARM-AC a montré une nette distinction avec les souches typiques de SARM-AH. Les SARM-AC et les SARM-AH appartiennent à différentes séquences-types et portent des types distincts de cassettes *SCCmec*. De plus, les souches de SARM-AC sont porteuses de facteurs de virulence tels que la leucocidine de Pantone-Valentine (PVL) (**Vanderhaeghen et al., 2010**). En Algérie, une prévalence de 35% de SARM-AC a été rapportée parmi 365 souches de *S. aureus* responsables d'infections invasives et non invasives durant les années 2006 et 2007 (**Antri et al., 2010**).

#### **I.1.4.2.3. SARM-associé au bétail (SARM-AB)**

Récemment, le SARM a émergé dans le bétail (**Kock et al., 2010**). Les animaux peuvent servir de réservoirs, et la bactérie peut être transmise aux personnes ayant un contact étroit avec des animaux colonisés par le SARM. De ce réservoir, le SARM a été désigné comme SARM-associé au bétail (SARM-AB) pour le distinguer des SARM-AH et SARM-AC (**Smith et Pearson, 2011**).

### I.1.4.3. Menace de la résistance à la vancomycine (SARV)

Les glycopeptides sont une famille d'antibiotiques à disposition depuis une quarantaine d'années ; cette famille constitue la référence pour le traitement des infections à SARM. Les premières souches de *S. aureus* de résistance diminuée à la vancomycine (VISA) ont été décrites au Japon en 1997, et ont depuis été signalées partout dans le monde (**Howden et al., 2010**). Le mécanisme de la résistance partielle est lié à la synthèse d'une paroi cellulaire épaisse qui absorbe la vancomycine (**Pereira et al., 2007**). Bien que les épidémies de VISA ne soient pas signalées, l'identification aux Etats-Unis, en Inde et en Iran, de souches entièrement résistantes à la vancomycine (SARV) par acquisition du gène *vanA* des entérocoques, constitue une menace certaine (**Lindsay, 2010**). Il a été montré en effet, qu'un peptide sécrété par *S. aureus*, aurait une action de phéromone et stimulerait le transfert conjugatif de plasmide provenant d'*Entérocooccus faecalis*. Ce phénomène contribuerait à l'acquisition du plasmide portant le gène *vanA* des entérocoques (**Massey et al., 2006**). Il convient de signaler que la fréquence des souches de SARV restent très rares et la proportion des souches ayant une résistance intermédiaire est beaucoup plus faible que pour la méticilline (<10%) (**Howden et al., 2010**). Toutefois, quelques exceptions notables ont été rapportées, tel qu'un hôpital en Turquie, où le taux des souches VISA hétérogènes est passée de 1,6% en 1998 à 32% en 2001 (**Sancak et al., 2005**).

## I.2. Niches écologiques et impacts de *S. aureus* chez l'homme et l'animal

*Staphylococcus aureus* est une bactérie ubiquitaire pouvant vivre en bactérie saprophyte dans la nature (sols, air, eaux, aliments), commensale sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux et enfin comme un agent pathogène engendrant des infections humaines et animales qui peuvent être redoutable.

### I.2.1. Dissémination et survie dans des environnements variés

*Staphylococcus aureus* possède des capacités d'adaptation et de résistance au stress qui font de lui un organisme ubiquitaire capable de survivre dans des environnements très variés. D'où la difficulté de son éradication dans les milieux hospitaliers et agro-alimentaires (**Delbès, 2010**). *S. aureus* est intrinsèquement chimiquement et physiquement robuste et peut tolérer des gammes de pH de 4,5 à 9,0 et du NaCl concentré jusqu'à 9 %. La résistance à la chaleur dépend des matrices voisines. *S. aureus* en suspension dans 0,9 % de NaCl est rapidement inactivé à 46°C. Lorsqu'il est protégé par des protéines (comme le lait ou du pus), il peut survivre pendant plus de 50 minutes à 60°C. La résistance de *S. aureus* à la dessiccation est dépendante de la surface et de la

matrice, elle peut aller en effet, jusqu'à plusieurs jours. *S. aureus* peut acquérir des gènes lui conférant une résistance à des classes spécifiques de désinfectants tels que des substances cationiques (par exemple des amines quaternaires, le triclosan) par un mécanisme d'efflux, qui présentent une résistance croisée à certains antibiotiques. Quoique, les concentrations d'application recommandées des désinfectants correspondants, surmontent cette résistance dans des conditions adéquates (**Antreolletti et al., 2009**).

### **I.2.2. Spectre pathologique chez l'homme**

#### **I.2.2.1. Infections à *S. aureus* chez l'homme**

*S. aureus* peut infecter tous les tissus du corps ; il peut donc être associé à un large éventail de troubles tel que : l'infection des plaies, la pneumonie, la bactériémie, l'endocardite, l'ostéomyélite, les abcès, l'arthrite septique, l'ostéomyélite et la conjonctivite. Les infections localisées affectent principalement la peau et les tissus mous, ainsi que des sites auxquels la bactérie obtient l'accès par la rupture de la peau et d'autres sites causés par des blessures telles que les procédures iatrogènes comme les plaies postopératoires. Des infections localisées peuvent conduire à une septicémie avec diffusion hématogène à d'autres organes, à une inflammation généralisée et à l'intoxication. La pneumonie due à *S. aureus* peut commencer soit, par les voies aériennes particulièrement chez les patients ventilés ou par la diffusion hématogène (**Antreolletti et al., 2009**).

#### **I.2.2.2. Prédispositions de l'homme aux infections à *S. aureus***

En comparaison à la distribution à grande échelle de *S. aureus* comme un colonisateur, l'infection reste un événement rare. Néanmoins, l'exposition à la bactérie, les troubles de la peau, l'immunodéficience, l'âge (les nouveau-nés et les personnes âgées), les traitements immunosuppresseurs, le diabète et l'utilisation de drogues injectables ont été identifiés comme facteurs prédisposant l'homme aux infections à *S. aureus* (**Antreolletti et al., 2009**).

#### **I.2.2.3. Importance de portage asymptomatique chez l'homme**

##### **I.2.2.3.1. Taux et type de portage chez l'homme**

*S. aureus* colonise la peau et les muqueuses de l'homme avec une préférence pour les régions chaudes et humides. La fréquence de portage sain de *S. aureus* chez les humains varie en fonction des cohortes étudiées et des tissus examinés. Des fréquences de portage de 23% à 46% ont été observées au niveau des narines (**Amir et al., 2006 ; Choi et al., 2006**), de 24 à 36% au

niveau de la bouche chez l'adulte (Smith *et al.*, 2001) et jusqu'à 64% chez les enfants (Watson *et al.*, 2006). Chez l'adulte, les fosses antérieures du nez constituent la niche écologique principale de cette bactérie. Chez les personnes porteuses au niveau nasal, la prévalence du portage cutané est d'environ 40%, *S. aureus* étant le plus souvent retrouvé sur les mains (90%), le périnée (60%) et le pharynx (20 à 50%) (Wertheim *et al.*, 2005). Dans la population générale, la plupart des auteurs donnent 20 à 30% comme prévalences de référence au portage nasal de *S. aureus*. Des prélèvements répétés chez les mêmes individus pendant plusieurs mois permettent de distinguer trois types de porteurs.

- ✚ Trente pourcent (16-70%) de la population est porteuse de différentes souches avec une fréquence variable, il s'agit de porteurs dits occasionnels ou intermittents.
- ✚ Cinquante pourcent (16-69%) de la population ne sont jamais porteurs.
- ✚ Environ 20% des individus sont dits "porteurs permanents". Ce terme doit être réservé à une fraction de la population, toujours colonisée par la même souche sur une période de plusieurs mois voire plusieurs années (Wertheim *et al.*, 2005).

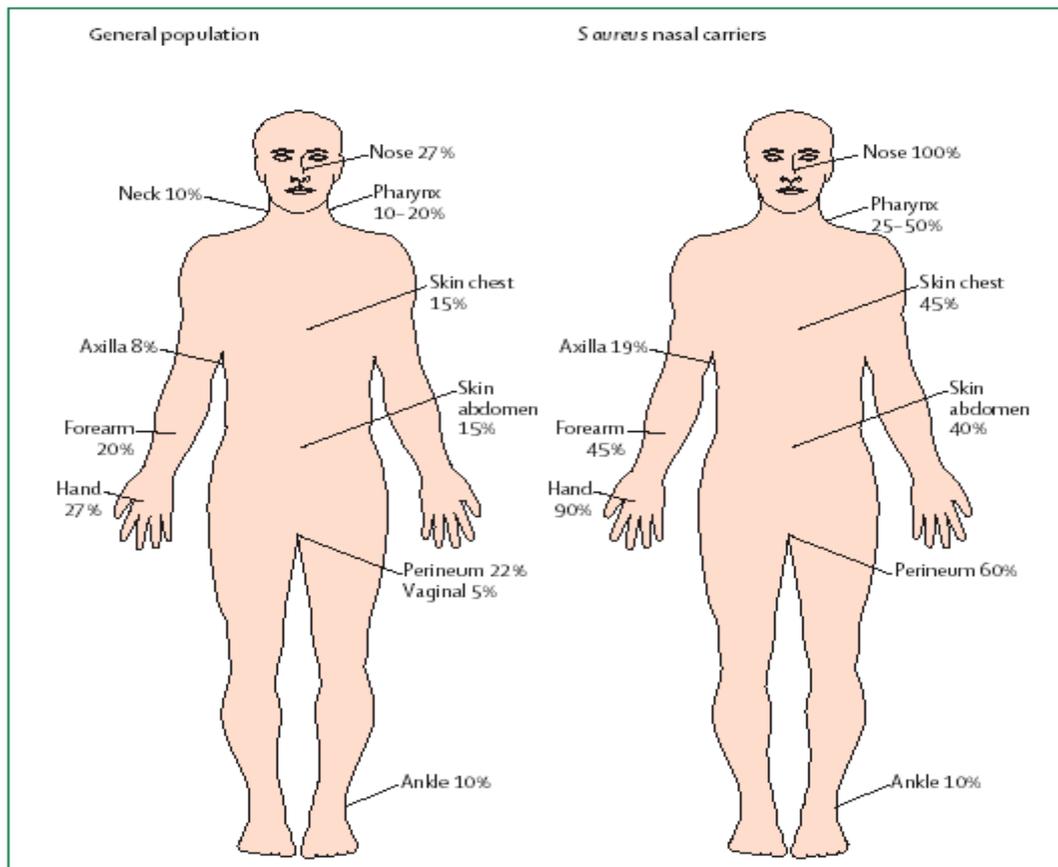


Figure 2 : Fréquence de portage à *S. aureus* dans la population générale et les porteurs nasals (Wertheim *et al.*, 2005)

**I.2.2.4.2. Acquisition et portage de *S. aureus***

L'acquisition puis le portage de *S. aureus* par l'adulte sont des phénomènes complexes liés à l'hôte et à la bactérie. Les pré-requis pour le portage nasal sont : un contact entre le nez et *S. aureus*, l'adhésion de *S. aureus* à sa niche nasale, l'échappement aux défenses de l'hôte et enfin la capacité de prolifération de *S. aureus*. Les facteurs déterminants le portage nasal à *S. aureus* sont rapportés dans le tableau ci-dessous (Wertheim *et al.*, 2005).

**Tableau 1** : Aperçu des facteurs associés au portage nasal à *S. aureus* (Wertheim *et al.*, 2005)

Mécanisme	Hôte	<i>S. aureus</i>
<b>Général</b>	L'âge, le sexe, l'ethnicité	La virulence
	La classe socio-économique	
	L'utilisation des antibiotiques	Résistance aux antibiotiques
	La maladie sous-jacente (diabète insulino-dépendant, HIV, maladie hépatique, eczéma, troubles nasal, autres)	
	Le type d'HLA	
	Le statut immunitaire	
<b>Exposition</b>	Le partenaire colonisé (lourdement)	
	L'environnement hospitalier	
	Le curage de nez	
<b>Adhérence</b>	Les récepteurs	Les adhésines
	Protéines de matrice (extracellulaire)	Les MSCRAMMs
	La cyto-kératine type 10	Le facteur d'agrégation-B
	Membranes épithéliales	Les acides (lipo) teicoïques, la capsule
	Les mucines	Les polysaccharides capsulaires
	La charge de surface	La charge de surface
	L'hydrophobicité	L'hydrophobicité
<b>Echappement aux défenses de l'hôte</b>	Les barrières de la peau et des muqueuses	Les protéases et les lipases
	La clairance dans le mucus par les microvillosités	Internalisation des cellules de l'hôte
	Les immunoglobulines	La protéine A (lié au Fc des IgG)
	Le lysosyme, la lactoferrine, les peptides anti-microbiens	La résistance aux peptides anti-microbiens
	L'opsonisation	La capsule

MSCRAMMs : Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix-Molecules

Le portage permanent semble avoir des conséquences sur l'acquisition d'autres souches. Il constituerait une barrière à la colonisation par d'autres souches. Ainsi, l'acquisition et la transmission de nouvelles souches de *S. aureus* ne concernerait que les porteurs intermittents (Nouwen *et al.*, 2004).

### I.2.2.4.3. Portage de SARM chez les professionnels de bétail

#### I.2.2.4.3.1. Prévalences chez les professionnels de l'élevage

Une étude méta-analytique sur 33 articles publiés entre 2006 et 2014, a montré que la prévalence de portage de SARM chez les personnes ayant un contact étroit avec les animaux varie entre 0,0% à 85,8%. La prévalence globale de portage de SARM était de 14,2% (9,1%-20,1% ; IC à 95%) (**Liu *et al.*, 2015**). Cette dernière est significativement supérieure à celle enregistrée chez la population générale (0,8% - 1,3%) (**Malik *et al.*, 2009 ; Koser *et al.*, 2012**). La prévalence de portage de SARM est significativement élevée dans les enquêtes longitudinales (38,9%, IC à 95% : 33,6%-44,4%) que dans les études transversales (11,8% ; IC à 95% : 7,2%-17,3%). Des différences significatives de prévalence existent entre les éleveurs (18,2% ; IC à 95% : 9,3%-29,0%), les vétérinaires (9,4%, IC à 95% : 3,5%-17,6%), les ouvriers de l'abattoir (2,6% ; IC à 95% : 0,8% - 5,4%) et les bouchers (5,7% ; IC à 95% : 3,3%-8,9%). Aucune différence n'a été rapportée entre les études effectuées en Asie, aux USA et en Europe (**Liu *et al.*, 2015**).

#### I.2.2.4.3.2. Facteurs de variation du portage de SARM

Le facteur de risque majeur impliqué dans le portage de SARM chez les professionnels ayant un contact étroit avec les animaux était le travail direct en contact avec les animaux de bétail, tel que les porcs (OR= 5,91 ; IC à 95% : 4,84-7,24) et les bovins (OR=2,84 ; IC à 95% : 1,67-4,81). Un autre facteur de risque important était l'intensité de contact avec les animaux (OR= 4,75 ; IC à 95% : 1,83-12,35). Enfin, l'âge était positivement associé à l'augmentation de la prévalence de portage de SARM (OR=1,34 ; IC à 95% : 1,18-1,52) (**Liu *et al.*, 2015**).

#### I.2.2.4.4. Du portage à l'infection

Le portage nasal est un facteur de risque pour la survenue d'une infection à *S. aureus*. La plupart des infections à *S. aureus* ont un point de départ cutané. Le grattage du nez et de la peau représente le mécanisme habituel de passage du portage nasal asymptomatique à l'infection cutanée et à une éventuelle dissémination hématogène. La peau et les muqueuses représentent la barrière de protection essentielle contre les infections staphylococciques (**Antreolletti *et al.*, 2009**). L'infection est ainsi favorisée par toute altération de cette barrière : plaie cutanée, lésions des muqueuses respiratoires provoquées par une infection virale. Les corps étrangers comme les dispositifs intra-vasculaires ou les prothèses orthopédiques constituent également des facteurs favorisants. Le portage est un facteur de risque bien identifié d'infections chez les patients de chirurgie et de soins intensifs, les patients infectés par le VIH ou encore chez les personnes

hémodialysés. Enfin, une diminution significative du taux d'infections de sites opératoires après décontamination des patients avec la mupirocine a été rapportée (**Kluytmans *et al.*, 1997**).

### **I.2.2.2. Intoxications alimentaires staphylococciques (TIAC)**

#### **I.2.2.2.1. Définition**

Une toxi-infection alimentaire collective est définie par l'incidence de deux cas ou plus, d'une maladie similaire, à symptomatologie gastro-intestinale le plus souvent, dont la cause peut être rapportée à une même origine alimentaire. Les TIAC à staphylocoque sont dues à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques, toxines protéiques préformées dans les aliments par des souches entérotoxigènes de staphylocoques à coagulase positive. L'espèce incriminée est principalement *S. aureus*. L'aliment ne devient toxique que si des conditions favorables à une multiplication bactérienne importante et à la toxinogénèse se trouvent réunies (**Delmas *et al.*, 2006**).

#### **I.2.2.2.2. Facteurs de risque**

##### **I.2.2.2.2.1. Température, durée et niveau de contamination requis**

Pour qu'il y ait une intoxication, l'aliment doit être maintenu pendant un certain temps à une température favorisant une croissance importante de *S. aureus* suivi d'une production d'entérotoxines. On considère qu'une densité supérieure à  $10^6$  UFC de *S. aureus*/g d'aliment est nécessaire pour atteindre une quantité d'entérotoxines susceptibles d'induire une intoxication. Plus on s'éloigne des températures optimum de croissance et de toxigénèse, plus le temps nécessaire sera long. Il est de l'ordre de quelques heures à 37°C, quelques jours à température ambiante et de quelques semaines à 10°C dans des conditions optimales par ailleurs (**Hennekine et De Buyser, 2010**).

##### **I.2.2.2.2.2. Souches entérotoxigènes**

La fréquence de production d'entérotoxines A à E par les souches de *S. aureus* est très variable en fonction des études publiées, de l'origine alimentaire ou non des souches testées, et de leur origine géographique. Une étude récente effectuée en France sur diverses catégories d'aliments a montré que 30,5% des 213 souches testées produisaient une des cinq entérotoxines recherchées (A à E) avec des variations importantes en fonction de l'aliment d'origine des souches : 12,5% pour les souches isolées des fromages au lait cru de vache, 31,5% pour les souches isolées de plats cuisinés, 62,5% pour les souches isolées de fromage au lait cru de chèvre et de brebis et

64% pour les souches isolées de pâtisserie. Dans cette étude, près de 60% des souches isolées d'aliments et appartenant au biotype humain étaient entérotoxigènes (**Rosec et al., 1997**).

Les gènes *seg* à *sej* ont été recherchés par amplification génique chez de nombreuses souches de *S. aureus* d'origines diverses. Il apparaît que ces gènes sont fréquemment détectés, en particulier les gènes *seg* et *sei* faisant partie de l'opéron *egc* (*enterotoxin gene cluster*). Dans certaines enquêtes, la prise en compte de ces gènes augmente considérablement la proportion de souches potentiellement toxigènes. En France, 57% de 258 souches isolées d'aliments variés étaient porteuses de *seg*, *seh* et *sei* et 31% portaient uniquement ces gènes (*seg* et *sei*) (**Rosec et Giraud, 2002**). En Italie, 100% de 50 souches isolées de lait de vaches atteintes de mammite étaient porteuse de *seg* et *sei* (**Zecconi et al., 2006**). Enfin, parmi les souches responsables ou suspectées dans des TIAC, certaines ne portaient que le gène *seh*, ou les gènes *seg* et *sei*, ou aucune des gènes *sea* à *sei* (**Mc Lauchlin et al., 2000 ; Cha et al., 2006 ; Kerouanton et al., 2007**). L'implication de SEH a été confirmée par la mise en évidence de cette entérotoxine dans des aliments responsables de TIAC (**Jorgensen et al., 2005**). L'implication de SEG et SEI est plus discutable

### **I.2.2.2.3. Fréquence des intoxications staphylococciques**

Les plats ayant nécessité des manipulations et les produits laitiers ont été les aliments les plus fréquemment associés aux TIAC à staphylocoque (**Delmas et al., 2006**). Pour tenter de déterminer la nature des produits incriminés, une étude a été réalisée sur 59 foyers de TIAC à staphylocoques impliquant des produits laitiers. Il était précisé pour la moitié de ces produits qu'ils étaient au lait cru, mais le traitement du lait n'était pas impliqué pour l'autre moitié. Les fromages affinés représentaient le type de produit laitier le plus fréquemment impliqué, notamment les fromages à pâte pressée non cuite (**De Buyser et al., 2001**).

### **I.2.3. Spectre pathologique chez les animaux**

L'infection clinique à *S. aureus* chez les animaux diffèrent en fonction des espèces, ainsi on énumère dans le tableau ci-dessous les infections cliniques les plus courantes chez les animaux.

**Tableau 2:** Infections cliniques les plus courantes à *S. aureus* chez les animaux (Pellerin, 2010)

Hôtes	Infections
• Bovins	Mammites, impetigo
• Moutons	Mammites, dermatites, folliculites bénigne
• Chèvres	Mammite, dermatite,
• Porcs	Botryomycose mammaire
• Chevaux	Mammites, plaies de castration
• Chats	Dermites, infections urinaires et suppurations diverses
• Chiens	Dermites, suppurations diverses (rare)
• Oiseaux	Dindes : arthrites, septicémies
• Oiseaux	Poulets : arthrites

#### I.2.4. Infections intramammaires chez la vache laitière

##### I.2.4.1. Importance des mammites à *S. aureus*

La mammite est la principale cause des pertes économiques dans les troupeaux bovins laitiers, en raison de faible rendement des mamelles infectées, des traitements vétérinaires, des saisies du lait (contaminés par des agents pathogènes et/ou avec des résidus d'antibiotiques) ainsi que de la réforme prématurée des vaches infectées. Selon la directive CEE 94/71, le lait est considéré impropre à la consommation humaine, si la concentration cellulaire (leucocytes) du lait de tank est supérieure à 400 000/mL (Peton et Le Loir, 2014). Dans un troupeau de 100 vaches laitières au Pays-Bas, le coût annuel moyen de la mammite subclinique est estimé à 4 896 € (Halasa et al., 2009). De plus, la durabilité de l'élevage, pourrait être menacée en cas de fortes prévalences de mammites dans les troupeaux laitiers (Peton et Le Loir, 2014).

*Staphylococcus aureus* est considéré comme étant l'agent pathogène mammaire causant les plus grandes pertes économiques au niveau de l'industrie des bovins laitiers. Les infections causées par *S. aureus* sont plus dommageables pour le tissu sécrétoire suite à la production de toxines par cet organisme (Akers, 2002). Les IIM causées par *S. aureus* peuvent devenir chroniques étant donné la capacité de la bactérie à se localiser à l'intérieur des cellules empêchant ainsi le système immunitaire de la reconnaître et de l'éliminer (Sears et McCarthy, 2003). Autant, cet organisme a tendance à s'établir dans le tissu et les alvéoles des régions profondes du pis ce qui peut générer des abcès (Akers, 2002; Barkema et al., 2006).

La mammite à *S. aureus* est également un problème potentiel de santé publique, étant donné que plus de la moitié des souches impliquées dans les infections intramammaires possèdent des gènes d'entérotoxines. L'excrétion dans le lait à partir des glandes infectées est généralement modérée (moins de 10 000 UFC/mL), mais la contamination du lait de tank peut conduire à une

intoxication alimentaire à *Staphylococcus* via des produits laitiers fermentés crus (Peton et Le Loir, 2014).

#### I.2.4.2. Classification des mammites à *S. aureus*

##### I.2.4.2.1. Critères de classification des mammites

La sévérité de la mammite est liée aux symptômes généraux, locaux et aux modifications macroscopiques et microscopiques du lait (Tableau 3)

**Tableau 3** : Echelle clinique de détermination de la gravité de la mammite (Scott *et al.*, 2011)

	Non-infectée	Subclinique	Clinique faible (Grade 1)	Clinique modérée (grade II)	Clinique sévère (Grade III)
<b>Vache</b>	Normal	Normal	Normal	Normal	+
<b>Mamelle</b>	Normal	Normal	Normal	+	+
<b>Lait</b>	Normal	Normal	+	+	+
<b>SCC</b>	Normal	+	+	+	+
<b>Bactéries</b>	Normal	+	+	+	+

##### I.2.4.2.2. La mammite clinique

###### I.2.4.2.2.1. La mammite suraiguë gangréneuse

Dans quelques rares cas, on peut observer une mammite suraiguë, dont le déclenchement est très brutal. Les vaches présentent initialement une température rectale élevée (41- 42°C). Le quartier atteint est fortement enflé et douloureux, le lait est très modifié (séreux voire sanguinolent). Le quartier manifeste peu après des signes de gangrène ischémique, avec des plaques bleuâtres visibles à la surface cutanée. La mort de l'animal est possible, sinon un sillon nécrotique se développe, ce qui aboutit à la perte physique de la glande atteinte. Dans les formes suraiguës gangréneuses, un œdème sous-cutané avec une forte congestion vasculaire sont présents. Le tissu mammaire, ferme et ischémique, ne sécrète plus le lait, le liquide qui envahit les canaux et les citernes est séreux, sanguinolent avec des flammèches de fibrines (Rainard et Gilbert, 2010 ; Prescott *et al.*, 2011).

###### I.2.4.2.2.2. La mammite clinique aiguë

Dans la phase clinique, le quartier infecté est chaud, enflé, sensible. Des grumeaux sont visibles dans le lait, dont la concentration cellulaire est fortement augmentée. Il peut y avoir des

symptômes généraux, avec hyperthermie, ralentissement ruminal et perte d'appétit (**Rainard et Gilbert, 2010 ; Prescott *et al.*, 2011**).

#### **I.2.4.2.2.3. La mammite chronique**

Le passage à la chronicité est l'issue la plus fréquente. Les infections à *S. aureus* de la mamelle sont notoirement difficiles à traiter, ce qui conduit à la formation d'une infection chronique avec une fibrose extensive et une induration de la mamelle (**Prescott *et al.*, 2011**). Environ 80% des nouvelles infections persistent pendant toute la lactation, sans traitement l'infection n'est pas éliminée pendant la phase de tarissement. Elle est retrouvée lors de la lactation suivante et pourrait persister des années en absence de traitement ou de réforme (**Rainard et Gilbert, 2010**).

#### **I.2.4.2.3. La mammite subclinique**

Dans la grande majorité des cas, la phase clinique de courte durée est suivie d'un passage à un état subclinique sans symptômes généraux ; celle-ci est associée à des perturbations locales peu ou pas détectables par l'éleveur. Seule l'élévation de la concentration cellulaire du lait persiste, avec des fluctuations généralement entre 200 000 et 2 millions/mL (**Rainard et Gilbert, 2010**). Il convient de signaler que, le nombre de cellules présentes dans le lait est étroitement associé à l'inflammation et la santé de la glande mammaire. Le CCS est accepté comme mesure standard internationale de la qualité du lait. En général, un CCS normal se situe en-dessous de 200 000 cellules/mL (**Harmon, 2001**). Or, le CCS est loin d'être une valeur fixe. La présence d'une IIM, le stade de lactation, l'âge, la saison, le stress, la régie et la variation diurne peuvent tous avoir un impact sur la variation du CCS (**Barkema et Olde Riekerink, 2008**). Toutefois, selon une méta-analyse faite par **Harmon (1994)**, le facteur majeur influençant le CCS est le statut d'infection de la glande mammaire. Les effets de l'âge, de la saison et de divers stress sur le CCS sont mineurs lorsque la glande mammaire n'est pas infectée. Malgré que l'IIM soit le facteur faisant le plus varier le CCS, celui-ci peut être influencé par le stade de lactation et le niveau de production. Par exemple, le colostrum et le lait produit au cours des premières semaines de lactation sont souvent plus élevé en cellules somatiques que le lait produit par la suite (**Smith, 2009**).

#### **I.2.4.3. Pathogénie des mammites à *S. aureus***

Le franchissement du canal du trayon livre aux bactéries l'accès à la lumière de la glande, où elles entament leurs multiplications en présence du lait résiduel. Chez les ruminants, seul un petit nombre de facteurs de virulence est directement impliqué dans les différentes phases de

l'infection mammaire : l'adhésion, l'échappement aux défenses de l'hôte et l'invasion du tissu mammaire (**Rainard et Gilbert, 2010**).

#### I.2.4.3.1. Adhésion de *S. aureus* aux cellules hôtes

L'adhésion de *S. aureus* aux membranes cellulaires de l'hôte, est assurée par un groupe d'adhésines appelés "*Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules*" (MSCRAMM). Cette bactérie produit un grand nombre de protéines qui se lient à la fibronectine (FnBP), au fibrinogène, au collagène, à la vitronectine et à l'élastine. De plus, *S. aureus* produit quatre protéines extracellulaires capables de se lier au fibrinogène : la coagulase, la protéine de fibrinogène extracellulaire (Efb), les protéines d'adhérence extracellulaires (Eap), qui se lient soit au fibrinogène ou à la prothrombine, et une protéine de matrice de liaison extracellulaire (**Oviedo-Boyso et al., 2007**).

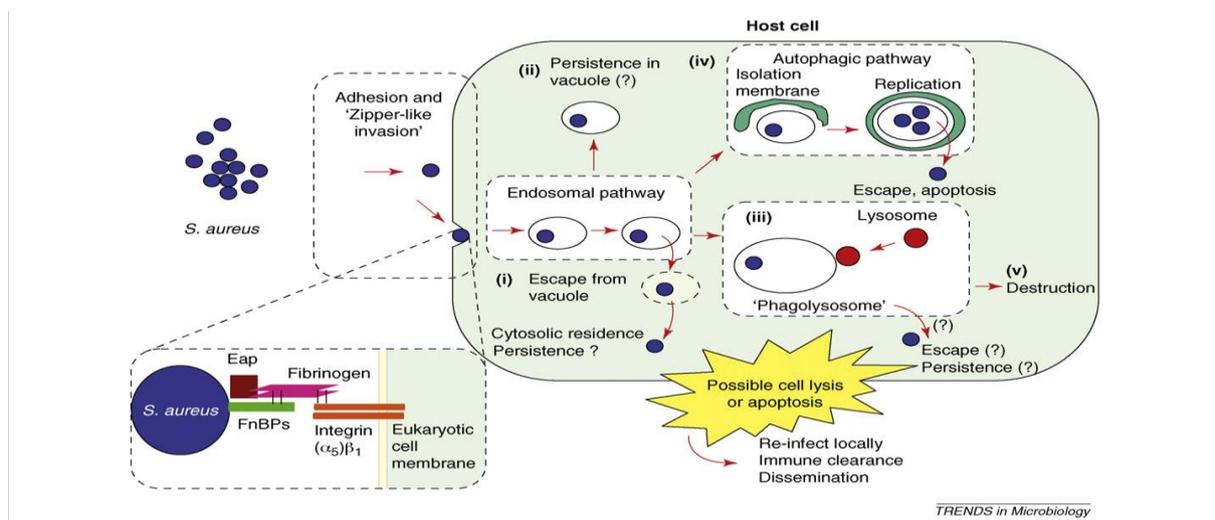
#### I.2.4.3.2. Echappement aux défenses de l'hôte

La protection vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte est assurée par des protéines permettant aux bactéries d'inhiber la chimiotaxie des neutrophiles, d'éliminer les leucocytes et résister à la phagocytose et de protéger contre les peptides antimicrobiens et le lysozyme (**Foster, 2005**). Or, Efb inhibe l'activation du complément en empêchant le dépôt de C3 sur la surface de *S. aureus*. Eap se lie à ICAM-1 située à la surface des cellules endothéliales et bloque la liaison des neutrophiles à ces cellules (**Oviedo-Boyso et al., 2007**).

La toxine alpha est toxique pour les neutrophiles, mais la famille de toxines les plus agressives pour la phagocytose sont les leucotoxines, qui sont des toxines à deux composants qui forment des pores transmembranaires (**Prévost et al., 2001**). Parmi ces leucotoxines, l'hémolysine  $\gamma$  mais surtout LukM/F' sont très cytotoxiques pour les neutrophiles des ruminants (**Barrio et al., 2006**). En cas de mammite gangréneuse, un effet cytotoxique est visible sur les neutrophiles isolés du lait, et la toxine est détectée dans la sécrétion mammaire (**Rainard, 2007**). La perturbation de la réponse immunitaire par les entérotoxines agissant comme des superantigènes sur les lymphocytes T est supposée participer au maintien des infections mammaires sur de longues périodes (**Ferens et Bohach, 2000**). L'exposition prolongée à de faibles doses de superantigènes pourrait dévoyer et affaiblir les réponses immunitaires en favorisant l'apparition de lymphocytes régulateurs à action immunosuppressive chez les bovins (**Seo et al., 2007**).

### I.2.4.3.3. Invasion du tissu mammaire

Il a été montré que des cellules épithéliales mammaires et des macrophages isolés du lait de glandes infectées naturellement par *S. aureus* contiennent des staphylocoques, et que dans la plupart des cas, ces bactéries sont cultivables, ce qui indique qu'elles peuvent survivre en situation intracellulaire (Hebert *et al.*, 2000). Suivant l'internalisation bactérienne selon le mécanisme F-actin-dépendent zipper-type semblable à la phagocytose professionnelle, de nombreux scénarios de trafic intracellulaires de *S. aureus* peuvent se produire : (i) l'évasion rapide du compartiment endosomal, (ii) la persistance dans des vacuoles, (iii) la survie dans le lysosome, (iv) l'enveloppement par les organelles autophagiques de double-membrane (membranes d'isolement), (v) la destruction, (vi) les cellules hôtes infectées pourraient rapidement subir l'apoptose ou la nécrose se manifestant comme des effets cytotoxiques ou, alternativement, montrent peu ou pas de cytotoxicité (Garzoni et Kelley, 2009).



**Figure 3 :** Modèle schématique de devenir intracellulaire de *Staphylococcus aureus* (Garzoni et Kelley, 2009).

Des souches non invasives ont été isolées de mammites chroniques : cela indique que tous les isolats de mammite chronique ne sont pas capables d'envahir des cellules endothéliales mammaires en culture, et suggère que l'invasion n'est pas indispensable pour l'installation et la persistance d'une mammite (Anaya-Lopez *et al.*, 2006). Par contre, *S. aureus* pourrait s'organiser en micro-colonies puis développer un biofilm à une phase tardive du processus infectieux. La possession des deux principaux loci permettant la formation d'un biofilm, *ica* et *bap* serait associé à une propension à induire une mammite moins sévère, mais plus persistante et plus résistante aux traitements par les antibiotiques (Cucarella *et al.*, 2004).

Si l'invasion des cellules endothéliales mammaires n'est pas avérée *in vivo*, l'invasion du tissu interstitiel a été observée au cours des mammites cliniques : l'examen histologique des coupes de tissu mammaire a montré des staphylocoques en amas en position sous-épithéliale (**Hensen et al., 2000**). Enfin, la toxine alpha est considérée comme responsable des formes suraigües et gangréneuses, en particulier par son action vaso-constrictrice qui produirait une nécrose ischémique (**Prévost et al., 2001**).

#### **1.2.4.3.4. Régulation de la virulence**

L'expression des facteurs de virulence de *S. aureus* est temporellement coordonnée au cours de l'infection par différents systèmes de régulation. Les effecteurs de ces systèmes peuvent agir directement sur les gènes cibles ou bien interagir entre eux de manière complexe. Les systèmes de régulation à deux composants sont des systèmes enzymatiques de transduction de signaux, capables de détecter les changements de l'environnement et de déclencher la réponse adaptée de la cellule par le contrôle de la transcription des gènes. Chez *S. aureus*, le système agr est le système à deux composants le mieux décrit, mais d'autres systèmes sont impliqués dans la régulation de la virulence (SaeRS, SrrAB, ArlRS, LytRS) (**Boisset et Vandenesch, 2010**). Le système de régulation agr, est impliqué dans le contrôle d'expression d'un grand nombre de toxines staphylococciques, y compris la toxine  $\alpha$ . Des mutants déficients de système de régulation **agr** cependant, ne peuvent pas évader la vésicule d'endocytose, ni éviter la fusion lysosomal dans les fibroblastes ou induire la mort des cellules infectées (**Garzoni et Kelley, 2009**).

#### **1.2.4.4. Réponse immunitaire mammaire contre *S. aureus***

##### **1.2.4.4.1. Caractère antigénique de *S. aureus***

Contrairement aux bactéries à Gram négatif, où le LPS est la principale molécule immunostimulatrice, plusieurs composés importants tel que les lipoprotéines, le peptidoglycane et l'acide lipotéichoïque (LTA) ont été identifiés pour les organismes à Gram positif (**Wellnitz et Bruckmaier, 2012**). L'acide lipotéichoïque (LTA), seul ou en compagnie de lipoprotéines qui seraient un contaminant fréquent de LTA (**Hashimoto et al., 2006**), induit une réaction inflammatoire quand il est infusé dans la mamelle. La fraction de LTA pourrait donc jouer un rôle important dans le déclenchement de la réaction inflammatoire, d'autant que les cellules épithéliales mammaires réagissent au LTA par la transcription de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires (**Strandberg et al., 2005**). L'expression de récepteurs de type Toll (TLR2 et

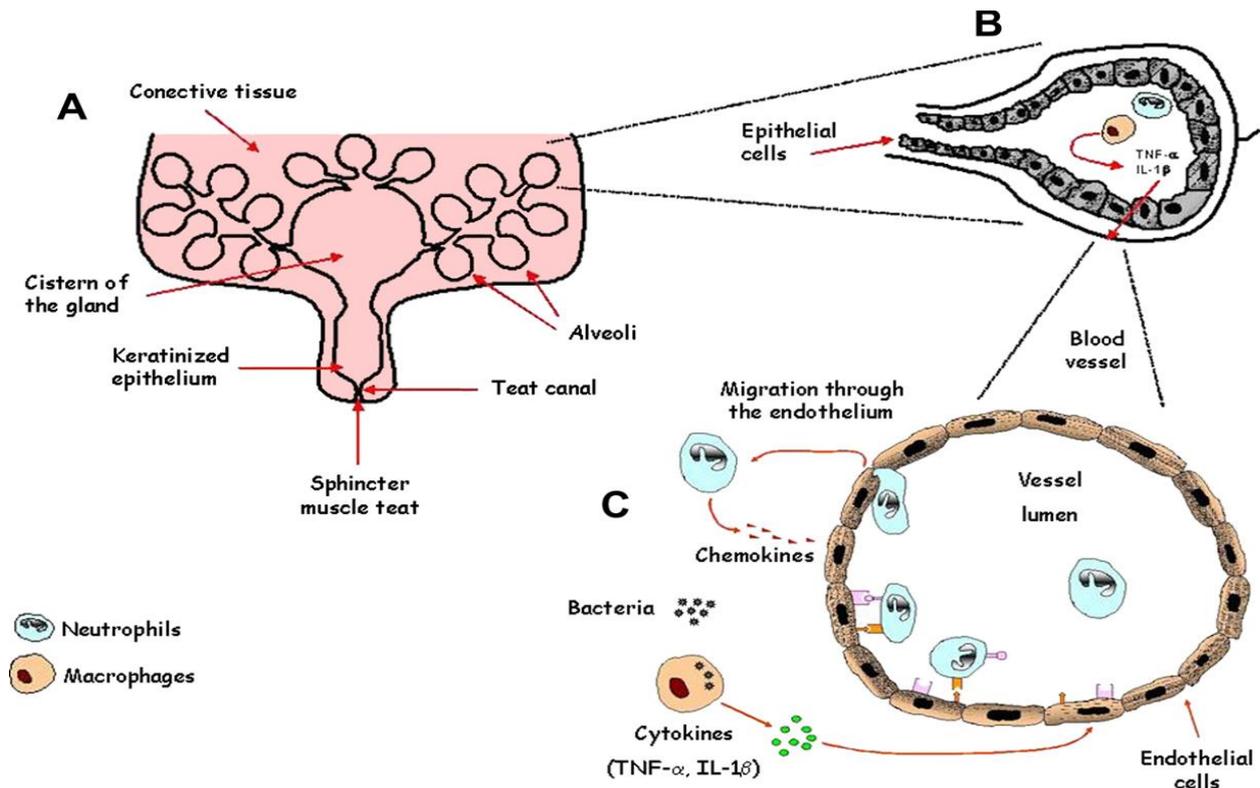
TLR4) par les cellules épithéliales mammaires (CEM) est vraisemblable (**Goldammer *et al.*, 2004**). *In vitro*, le LTA induit l'expression de TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8 par les CEM ; cette expression n'est pas accentuée par la stimulation additionnelle par le peptidoglycane ou d'autres composants pathogéniques des bactéries à Gram-positif. Il a été montré par ailleurs, que la réponse immunitaire de la mamelle contre le LTA, est comparable à l'infection naturelle de *S. aureus* (i.e. augmentation des chimiokines et IL-1b, mais peu de TNF- $\alpha$ , dans le lait) (**Wellnitz et Bruckmaier, 2012**).

#### I.2.4.4.2. Défenses anatomiques

Le canal du trayon est considéré comme une barrière importante contre les IIM. Pour causer des IIM, les bactéries doivent pénétrer dans la glande mammaire via le canal du trayon (**Figure 4**). En maintenant l'orifice du canal du trayon fermé, le muscle de sphincter du trayon permet d'isoler l'intérieur de la glande mammaire. Le canal du trayon est bordé de kératine, qui constitue une barrière physique supplémentaire, empêchant la migration des bactéries vers la citerne de la glande mammaire. Certaines protéines cationiques associées à la kératine peuvent se lier à des micro-organismes pathogènes des mammites, et augmenter leur sensibilité aux changements d'osmolarité. Outre, les acides gras estérifiés et non estérifiés associés à la kératine possèdent une fonction bactériostatique (**Oviedo-Boyso *et al.*, 2007**).

#### I.2.4.4.3. Défenses cellulaires

Les polynucléaires neutrophiles semblent jouer un rôle de défense essentiel. La phagocytose efficace de *S. aureus* nécessite la présence d'opsonines capables de se déposer à la surface des bactéries et d'interagir avec les récepteurs du phagocyte. Contrairement aux souches d'origine humaine, les composants du complément C3b et C3bi ne sont pas indispensables pour la phagocytose des souches de mammite bovine. Les composants bactériens qui sont les cibles des anticorps opsonisants doivent être exposés à la surface de la bactérie, et les anticorps fixés à leur cible doivent être accessibles aux récepteurs membranaires de cellules phagocytaires (**Rainard et Gilbert, 2010**).



**Figure 4 :** Réponse immunitaire mammaire contre les microorganismes responsables de mammites (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

En dépit de recrutement cellulaire intense, peu de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs chimio-attractants dans le lait de mammite staphylococcique subclinique sont détectés (**Tableau4**). L'interleukine (IL)-1 $\beta$  n'est pas détectée ou en petite quantité, et le *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ) n'est détectable dans le lait, alors que ces cytokines pro-inflammatoires sont produites en quantités importantes dans le lait de mammite dues à *Escherichia coli*. Le fragment C5a du complément activé et la chimiokine IL-8, capables d'attirer les polynucléaires neutrophiles sur un site inflammatoire, sont peu ou pas détectables, alors que des concentrations biologiquement actives sont mesurées en cas de mammites colibacillaires. En revanche, *S. aureus* induit la production d'une cytokine régulatrice de l'inflammation, le TGF- $\beta$ , qui peut réduire l'activité de polynucléaires neutrophiles (**Rainard et Gilbert, 2010**). Il est possible que la réaction inflammatoire modérée associée à l'absence de TNF- $\alpha$  et à la présence TGF- $\beta$  soient défavorables à l'efficacité bactéricide des cellules phagocytaires recrutées par l'inflammation (**Oviedo-Boyso *et al.*, 2007**).

**Tableau 4:** Comparaison des réponses immunitaires mammaires contre *S. aureus* et *E. coli* chez la vache (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Bactérie	Type d'IIM	Réponse immunitaire innée
<i>Staph. aureus</i>	Clinique	Augmentation de CCS
	ou	Augmentation <b>transitoire</b> des concentrations de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ et de C5a
	subclinique	Augmentation de la concentration d'IL-12
	chronique	Augmentation de recrutement des lymphocytes CD8+ Augmentation de la concentration d'IgG2
<i>Esch. coli</i>	Clinique	Augmentation de CCS Augmentation des concentrations de TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$ et C5a Augmentation des concentrations de LBP, BSA et sCD14

Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ); interleukin (IL; IL-1b, IL-12, IL-8); interféron gamma (IFN- $\gamma$ ); lipopolisaccharide binding protein (LBP); bovine serum albumin (BSA); complément 5a (C5a); récepteur soluble qui reconnaît le complexe moléculaire soluble LPS-LBP (sCD14); immunoglobuline G2 (IgG2); comptage de cellules somatiques (CCS).

#### I.2.4.4.4. Défenses humorales

Les défenses humorales contre *S. aureus* sont limitées. Le système du complément n'est pas bactéricide pour *S. aureus*, et la lactoferrine qui *in vivo* ralentit la croissance de certains isolats de mammite, est peu opérationnelle dans le lait en raison de la présence de citrate à forte concentration. Les défensines et d'autres petites protéines basiques sont susceptibles d'agir sur *S. aureus*, mais le lait, riche en protéines et en cations divalents, n'est pas favorable à l'expression de l'activité bactéricide de ces facteurs. Les anticorps neutralisant les toxines jouent vraisemblablement un rôle important dans la protection. Ils ont notamment été impliqués dans la protection contre les formes suraigües et gangréneuses de mammites staphylococciques. Enfin, des anticorps anti-leucotoxines sont présents chez les animaux qui ont développé une mammite staphylococcique, mais dans la grande majorité des cas la toxine elle-même n'est pas détectable dans le lait (Rainard et Gilbert, 2010).

#### I.2.4.5. Source de *S. aureus* et transmission

##### I.2.4.5.1. Pathogène à réservoir mammaire

En se basant sur les études épidémiologiques et les efforts de contrôle des mammites, *S. aureus* a été classé comme un agent pathogène contagieux. Cette classification est soutenue par les données moléculaires, qui montrent que dans la plupart des troupeaux présentant des mammites

à *S. aureus*, une seule souche majeure affecte plusieurs vaches. La transmission est supposée se produire principalement par la machine à traire, les lavettes d'essuyage ou les mains des trayeurs. Le typage moléculaire incrimine aussi les mouches dans la transmission de *S. aureus* entre les vaches. Bien qu'un contrôle efficace des mammites à *S. aureus* ait été décrit, la prévention de la transmission d'une vache à l'autre a souvent échoué à éliminer le problème dans les troupeaux laitiers. Les explications couramment avancées pour les résultats décevants des efforts de contrôle comprennent les cultures bactériologiques faussement négatives, résultant des cas non détectés qui peuvent réinfecter le reste du troupeau, et la faible réponse au traitement des mammites à *S. aureus*. Enfin, dans la plupart des troupeaux, de nombreuses souches à faible prévalence ou incidence peuvent être isolées en plus d'une ou quelques souches à forte prévalence (Zadock *et al.*, 2011)

### **I.2.4.5.2. Pathogène environnemental**

La présence de plusieurs souches prouve que ce ne sont pas toutes les infections qui sont le résultat d'une transmission d'une vache à l'autre. Dans certains troupeaux, les mammites à *S. aureus* montrent une épidémiologie moléculaire et une dynamique d'un agent pathogène environnemental. Dans des cas exceptionnels, presque 5 souches différentes ont été isolées à partir de lait d'un seul animal au fil du temps, un modèle qui est suggéré pour être spécifique aux agents pathogènes environnementaux. Le nombre de souches par troupeau est plus élevé dans les exploitations qui achètent des animaux que dans les troupeaux fermés. Les sources extramammaires de *S. aureus* comprennent la peau et les sites du corps des vaches et de l'environnement agricole, par exemple les matériaux de la litière, les insectes, le personnel, les animaux, les produits alimentaires et de l'air (Zadock *et al.*, 2011).

### **I.2.4.6. Méthodes de prophylaxie et de contrôle**

#### **I.2.4.6.1. Mesures préventives**

Les premières études ont défini des procédures de contrôle pour lutter contre la mammite contagieuse, dont le réservoir principal est la mamelle infectée. Les principales mesures comprennent des procédures de traite, de désinfection appropriée des trayons après la traite, de séparation ou de réforme des animaux infectés, et de contrôle à l'acquisition d'animaux infectés dans un contexte de renouvellement du troupeau. Pour prévenir la propagation de l'infection dans le troupeau, les quartiers infectés par *S. aureus* doivent être diagnostiqués précocement, de sorte

qu'ils peuvent être traités et les animaux infectés peuvent être isolés ou réformés (Zadock *et al.*, 2011, Peton et Le Loire, 2014).

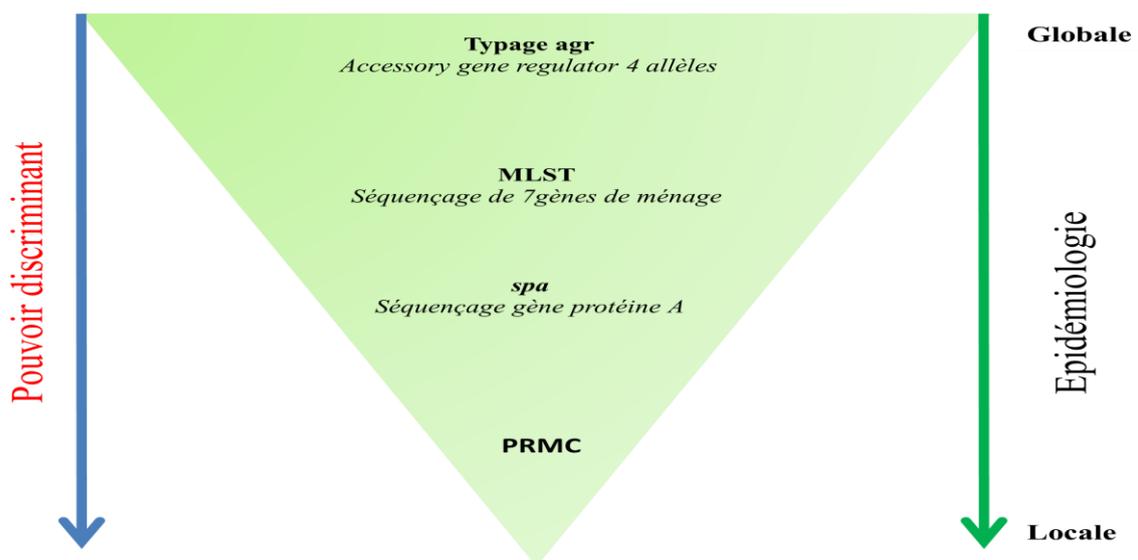
#### I.2.4.6.2. Antibiothérapie

Le succès de l'antibiothérapie face à une mammite à *S. aureus* est faible (Barkema *et al.*, 2006). Le succès du traitement dépend de plusieurs facteurs tels que le choix de l'antibiotique, la concentration minimale inhibitrice nécessaire, le dosage, la durée du traitement et le statut immunitaire de l'animal (Sears et McCarthy, 2003). En général, une infection chronique, un nombre élevé de quartiers infectés ou un CCS élevé sont des facteurs diminuant le succès thérapeutique des IIM à *S. aureus* (Sears et McCarthy, 2003; Barkema *et al.*, 2006). Le contrôle de cet agent pathogène dans un troupeau se fait via la prévention de l'infection et la réforme des animaux atteints (Akers, 2002).

### I.3. Phylogénie de *S. aureus* isolé chez l'homme et les animaux

#### I.3.1. Outils de typage moléculaire de *S. aureus*

Une panoplie de méthodes a été développée pour le typage de *S. aureus*, et la liste ne cesse de s'allonger. D'une façon générale, on distingue les méthodes basées sur la restriction de l'ADN, sur l'amplification d'ADN par la polymérase chain reaction (PCR), ou sur l'analyse de séquences d'ADN.



**Figure 5** : Pouvoir discriminant des outils moléculaires de caractérisation de *S. aureus*

### **I.3.1.1. Le profil de Macro restriction du chromosome (PRMC) en champs pulsés**

Cette technique est fondée sur la restriction de l'ADN total par une enzyme dont la fréquence de coupure est rare. L'enzyme *SmaI*, qui reconnaît la séquence CCCGGG, est généralement utilisée pour *S. aureus*, et les fragments générés sont séparés par l'électrophorèse en champs pulsés. Le PMRC s'est révélée être la méthode la plus discriminante lorsqu'elle était comparée à d'autres méthodes de typage génotypique ou phénotypique. Malgré le fait que la méthode est très reproductible dans un même laboratoire, la comparaison de données provenant de différents laboratoires n'est pas toujours aisée (**Blanc et al., 2010**).

### **I.3.1.2. Méthodes fondées sur le séquençage**

Avec le développement des méthodes de séquençage (automatisation diminution de temps et prix), les méthodes basées sur l'analyse de séquence sont les plus utilisées. Le principal avantage du séquençage de l'ADN pour le typage des souches est l'interprétation non ambiguë des résultats permettant la création de bases de données internationales (**Blanc et al., 2010**).

#### **I.3.1.2.1. Multi locus sequence typing (MLST)**

Cette méthode combine la séquence de plusieurs gènes structuraux dans une approche similaire à l'analyse des iso-enzymes. L'amplification et le séquençage de 450-500 pbs des sept gènes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL*, ont été retenus pour *S. aureus*. L'avantage de cette méthode est de procurer des données non ambiguës, reproductibles entre laboratoires. Une base de données internationale contenant des isolats provenant de différents laboratoires du monde entier est disponible sur internet (<http://www.mlst.net>). Les deux principaux inconvénients sont le coût élevé, une charge de travail importante (séquençage de sept gènes) et un pouvoir discriminant insuffisant pour faire de l'épidémiologie locale (**Blanc et al., 2010**).

#### **I.3.1.2.2. Spa-typing**

La région polymorphique X du gène *spa* (codant la protéine A) a été retenue pour le séquençage, car elle contient un nombre variable de répétitions de 24 pbs. La diversité de cette région provient non seulement de délétion et de la duplication de ces unités répétitives, mais aussi des mutations ponctuelles. Ainsi une valeur est donnée à chaque unité répétitive différente : un type-de-*spa*, est identifié par la succession de valeurs identifiant chaque répétition composant la région X. L'analyse n'étant pas aisée, un programme informatique ainsi qu'une base de données internationale ont été élaborés pour une identification standardisée de ces profils

(<http://www.ridom.de/staphtype/>). Le pouvoir discriminant de cette méthode reste cependant inférieure à celui du PMRC. Une base de données accessible sur internet a été mise en place permettant une standardisation de la nomenclature des types (<http://spa-server.ridom.de/>) (**Blanc et al., 2010**).

### **I.3.1.3. Amplification d'ADN par PCR**

#### **I.3.1.3.1. Typage *agr***

Il existe une étroite relation entre le type *agr* et le fond génétique. La détermination du type *agr* s'effectue grâce à l'utilisation des amorces s'hybridant au niveau d'une région d'*agrC* spécifique à chacun des 4 groupes *agr* (**Jarraud et al., 2002**).

#### **I.3.1.3.2. Détermination des gènes accessoires**

La détection des éléments génétiques mobiles est très difficile et la méthode basée sur les puces à ADN, est actuellement très coûteuse et techniquement lourde pour l'utilisation de routine. Par contre, un simple typage de la résistance et/ou le typage de SCC*mec* combiné à la toxinotypie pourrait être utile pour le typage de *S. aureus* (**Antreoletti et al., 2009**).

#### **I.3.1.4. Séquençage total du génome**

Il est à noter que la PCR est remplacée aujourd'hui par les puces à ADN, qui seront elles même concurrencés par le séquençage haut débit considéré comme l'outil d'avenir en caractérisation moléculaire. En effet, grâce à la capacité de ce dernier à travailler sur un grand nombre d'échantillons en parallèle, ses outils permettent de couvrir plusieurs technologies différentes employées jusqu'à maintenant comme les puces à ADN, le séquençage classique de Sanger ou la PCR quantitative à haut débit (**Metzker, 2010**).

### **I.3.2. Bases moléculaires de la spécificité d'hôte de *S. aureus***

Les études génomiques comparatives ont montré que le noyau du génome de *S. aureus* est hautement conservé et que les EGM sont susceptibles de jouer un rôle central dans l'adaptation spécifique à l'hôte (**Tableau 5**). L'acquisition ou la perte des EGM peut influencer sur les capacités de *S. aureus* à coloniser des hôtes animaux d'une part et/ou à provoquer la maladie de l'autre. En effet, la distribution des gènes ou des allèles varie également en fonction de l'hôte, ce qui reflète la mise en œuvre d'une stratégie d'infection différente ou résultant de la co-évolution hôte-pathogène.

**Tableau 5:** Exemples des traits de spécificité d'hôte et de leurs déterminants génétiques chez *S. aureus* (Peton et Le Loir, 2014)

Gènes	Fonction	Spécificité d'hôte	Support génétique
<i>vwb</i>	Coagulation du plasma	Le produit <i>vwb</i> équin coagule le plasma des ruminants et des équidés	<b>SaPIeq1</b>
<i>selx</i>	Superantigène	Différents profils d'activation Vb pour les lymphocytes humains et bovins	<b>Core du génome</b>
<b>Absence IEC</b>	Clusters d'évasion immunitaire.	Activité spécifique à la niche humaine	<b>ΦAvβ</b>
<b>Perte de la fonction <i>sspA</i></b>	Maturation de SspB qui contribue à la formation du caillot sanguin.	Absent chez les souches du poulet.	
<b><i>spaA</i> interrompu</b>	Adhésion à l'épithélium du poumon, attachement aux plaquettes humaines, inhibition de l'opsonophagocytose résultant d'un attachement non spécifique de la région Fc des IgG.	Absent chez les souches du poulet.	<b>Core du génome</b>
<b><i>lukM-lukF'-PV</i></b>	Cytotoxicité sur les neutrophiles	La leucotoxine la plus active sur les neutrophiles des ruminants	<b>Prophage</b>
<b><i>lukM-lukF'</i></b>	Cytotoxicité sur les neutrophiles	Faiblement active sur les cellules polynucléaires humaines	<b>Prophage</b>
<b><i>scn</i></b>	Inhibition staphylococcique du complément (SCIN)	Spécificité élevée pour les molécules cibles humaines / ne réagissent pas avec les cibles bovines	<b>Prophage</b>
<b><i>chp</i></b>	Protéines inhibitrices de la chimiotaxie de <i>S. aureus</i> (CHIPS)	Spécificité élevée pour les molécules cibles humaines / ne réagissent pas avec les cibles bovines.	<b>Prophage</b>
<b><i>sak</i></b>	La staphylokinase	Les souches humaines ne sont pas actives sur le plasminogène de ruminants.	<b>Prophage</b>
<b><i>pvl</i></b>	Panton et Valentine leucotoxine	Faiblement active sur les neutrophiles bovins	<b>Prophage</b>

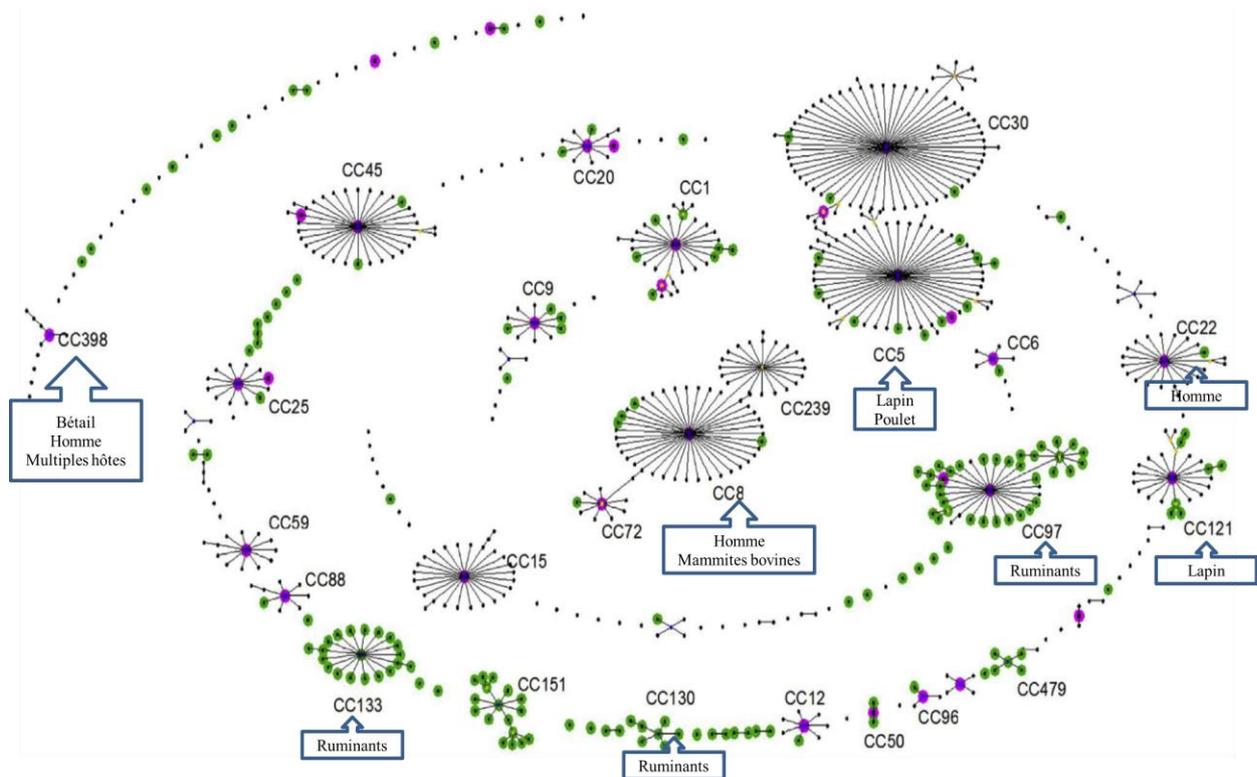
Un exemple d'adaptation divergente est donné par le complexe d'évasion de l'immunité (IEC, *immune evasion cluster*), qui regroupe les gènes *scn*, *chp*, *sak* et *sea*. Cet IEC est porté par des bactériophages (*β-hemolysin converting bacteriophages*) qui s'insèrent dans le gène *hly* (van Wamel *et al.*, 2006). Les produits des gènes *scn* et *chp*, les protéines SCIN (*staphylococcal complement inhibitor*) et CHIPS (*chemotaxis inhibitory protein of S. aureus*) sont très spécifiques des molécules cibles humaines et n'agissent pas sur les cibles bovines (Roijackers

*et al.*, 2005). La séquence peptidique du récepteur C5aR humain permettant l'interaction avec CHIPS n'est pas partagée avec le C5aR bovin. La staphylokinase (produit du gène *sak*) des souches humaines n'est pas active sur le plasminogène des ruminants (Collen *et al.*, 1993).

### I.3.3. Phylogénie des souches de *S. aureus*

#### I.3.3.1. Clones majeurs chez l'homme

Chez l'homme, les études MLST ont placé la majorité des isolats de *S. aureus* (portage et souches invasives de SASM et SARM) dans les cinq complexes clonaux universels majeurs : complexe clonal (CC) 8, CC30, CC5, CC22 et CC45 (van Balkun *et al.*, 2009). Par ailleurs, les complexes clonaux (CC1, CC8, CC30, CC59, CC80, et CC93) ont souvent été associés aux épidémies de SARM communautaires (Shepherd *et al.*, 2013) (Figure 6).



**Figure 6:** eBURST plot de 696 STs issus de l'homme et des animaux (Shepherd *et al.*, 2013). Les génotypes de l'hôte humain sont en noir, les génotypes des animaux sont indiqués en vert enfin les génotypes trouvés dans l'homme et les animaux sont en rose

Au Pays-Bas et aux USA la majorité des isolats appartiennent au CC30 et CC45 (Mells *et al.*, 2008) et ce, bien que la majorité des isolats de SARM communautaires aux USA appartiennent au CC8 (Tenover *et al.*, 2008). Au moins un représentant majeur de clone universel a été

observé dans une collection de souches de France, d'Algérie, de Moldavie et de Cambodge. Contrairement aux autres zones géographiques, les clones CC121 constituent une grande proportion de souches de Cambodge, alors que CC6 est fréquemment observé en France, en Algérie et au Cambodge (**Ruimy et al., 2009**). Enfin, une collection de souches différente de la tendance mondiale a été observée en Chine. Celle-ci est en effet, dominée par des souches de CC121, CC398, CC59 et CC182 (**Fan et al., 2009**).

### **I.3.3.2. Clones majeurs chez les ruminants**

Relativement peu de lignées clonales sont impliquées dans les infections intramammaires chez les ruminants (**Sakwinska et al., 2011a ; McCarthy et al., 2012**). Les clones majeurs sont souvent associés aux complexes clonaux CC97, CC133, CC130, CC126 et CC705. Ce dernier "CC705" qui inclut ST151, comprend des génotypes spécifiques aux bovins. En outre, les génotypes appartenant à CC133 ont été retrouvés chez les vaches, les moutons ou les chèvres, et sont largement diffusés parmi les espèces de ruminants (**Ben Zakour et al., 2008 ; Guinane et al., 2010**).

### **I.3.3.3. Adaptation aux nouvelles hôtes**

Certains complexes clonaux sont en effet partagés entre les humains et plusieurs hôtes animaux, comme cela a été montré pour le clone de SARM-ST398. Ce clone a émergé en 2004, dans un réservoir de porc aux Pays-Bas pour se propager rapidement dans le monde entier. Sa transmission à l'homme a donné lieu à la fois au portage sain et aux infections sévères (**Schijffelen et al., 2010**). Il a depuis été décrit chez les ruminants, la volaille, les chevaux et les animaux de compagnie (**McCarthy et al., 2012**). De même, des génotypes avec un spectre d'hôtes étendu (EHSGs) ont été récemment décrits dans les clones de *S. aureus* impliqués dans les infections canines. Ces souches canines partagent un degré élevé de similitude avec les souches humaines, indépendamment du fait qu'elles sont résistantes ou sensibles à la méticilline (**Vincze et al., 2013**). Bien que CC8 soit couramment impliqué en potage et en infections humaines, des souches appartenant à CC8 ont été fréquemment trouvées dans les isolats de mammites bovines (**Sakwinska et al., 2011a**). Par ailleurs, un certain nombre d'isolats de cheval, de lapin et de poulet se sont avérés être des clones associés habituellement à l'homme (CC8, CC121 et CC5, respectivement) (**Moodley et al., 2006, Smyth et al., 2009 ; Walther et al., 2009 ; Hasman et al., 2010**). Ces observations peuvent indiquer un saut puis l'adaptation de clones animaux chez l'homme ou vice versa.

#### I.2.4. Evolution de *S. aureus*

Le nouveau mode de vie a entraîné une plus forte densité de population, ainsi qu'une cohabitation de l'homme avec les animaux domestiques. Cette promiscuité étroite et de longue durée entre l'homme et les animaux, est accompagnée par une augmentation des agents pathogènes zoonotiques et anthropo-zoonotiques (**Pearce-Duvet, 2006**). Des facteurs tels que l'habitat, la pollution, le changement climatique, la pratique agricole et les stratégies de traitement médical peuvent avoir un effet profond sur les interactions microbes-hôtes (**Lebarbenchon et al., 2008**). Chez *S. aureus*, la transduction par les bactériophages est une composante principale de l'évolution. Certains groupes de prophages, tels que la famille des phages de  $\beta$ -conversion ont été bien étudiés en raison de leur rôle donnant un phénotype avantageux de la souche de l'hôte (**van Wamel et al., 2006**). La pression de sélection par le transfert génétique horizontal (TGH) peut être suffisamment importante quand le transfert se produit à partir de taxons éloignés, et ce malgré les obstacles qui existent pour minimiser cela. Un exemple notable est le transfert de Tn1546 portant *vanA* d'*Enterococcus faecalis* à *S. aureus* induisant une résistance à la vancomycine (**Chang et al., 2003 ; Weigel et al., 2003**).



# ***Canevas général***

## II. PARTIE PRATIQUE

### II.1. Canevas général

#### II.1.1. Objectifs

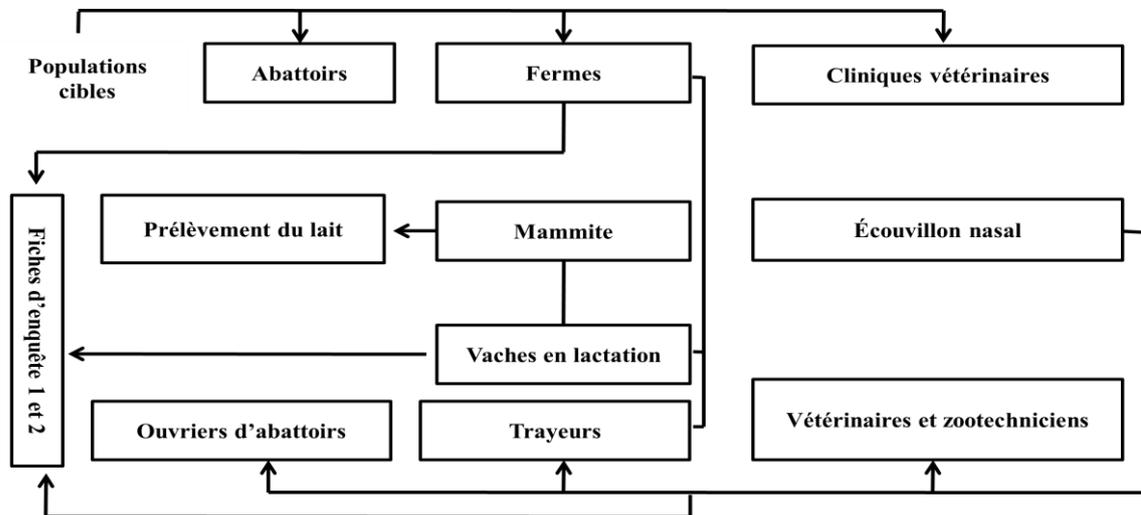
L'évolution inquiétante des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline communautaires (SARM-AC) en Algérie, a suscité l'intérêt d'explorer l'origine animale de *Staphylococcus aureus*. Ainsi, afin de mieux connaître la place de *S. aureus* dans l'environnement des bovins et des professionnels ayant un contact étroit avec les animaux en Algérie, nous nous sommes fixé comme objectif principal de caractériser génotypiquement les souches de *S. aureus* impliquées dans les mammites bovines et en portage nasal chez les vétérinaires, les inséminateurs, les éleveurs et les ouvriers des abattoirs. Afin de bien structurer notre démarche pratique, de multiples objectifs complémentaires ont été définis visant à introduire puis analyser les diverses données. De la sorte, nous avons été amené à :

1. Estimer la prévalence des infections intramammaires chez les vaches laitières, en tenant compte des aspects cliniques et subcliniques de la mammite.
2. Evaluer le taux d'implication de *S. aureus* parmi les infections intramammaires des bovins.
3. Calculer la fréquence du portage nasal de *S. aureus* chez les professionnels ayant un contact étroit avec les animaux en tenant compte de leurs données socio-épidémiologiques.
4. Déterminer la sensibilité intrinsèque des souches de *S. aureus* d'origine animale et humaine vis-à-vis des antibiotiques.
5. Caractériser et comparer les profils moléculaires des souches animales et humaines.
6. Définir le sens de transmission des clones d'un hôte à l'autre.
7. Evaluer les risques zoonotique et toxinique de *S. aureus* en santé publique.

#### II.1.2. Philosophie pratique

Pour répondre aux objectifs visés dans cette étude qui s'intéresse à la caractérisation des souches de *S. aureus* isolées de mammites bovines et impact sur les personnes à risque, nous avons élaboré le canevas général ci-dessous (**Schéma 7**). Ainsi, une attention particulière a été portée d'une part, sur la définition précise de la population cible puis de la démarche pratique à suivre d'autre part. Notons que les fermes, les abattoirs et les cliniques vétérinaires étaient les endroits

habituellement convoités par nos soins pour effectuer les prélèvements. Ces derniers, étaient des écouvillons nasals pour les professionnels accompagnés de fiches de renseignements (**fiche 2, annexe II**), et des échantillons de lait mammitique conjointement aux fiches d'enquête élevage et animale (**fiche 1, annexe I**).



**Schéma 7** : Schéma récapitulatif du protocole général de l'étude

### II.1.3. Protocole de l'étude et considérations pratiques

Afin de limiter les erreurs par excès et/ou par défaut lors de la progression de l'enquête, notre rigueur était particulièrement focalisée sur les exigences de prélèvements, de transport, puis des analyses microbiologiques et moléculaires des échantillons. C'est ainsi, que nous avons adopté la méthodologie suivante :

1. La définition de la population de l'étude et de l'échantillonnage
2. L'enquête sur les mammites au sein des élevages
3. La collecte des prélèvements chez les animaux et les professionnels contacts
4. L'isolement et la caractérisation phénotypique des souches de *S. aureus*
5. La caractérisation moléculaire des souches de *S. aureus*
6. L'analyse statistique et synthèse des données

**Note** : La caractérisation moléculaire des souches a été réalisée au Centre National de référence des Staphylocoques de Lyon, dans le cadre d'une coopération algéro-française DPGRF-INSERM (U351) de 2010- 2012.



NE CROYONS QUE CE QUE NOUS ANALYSONS

## *Matériel et méthodes*

## II.2. Matériel et méthodes

### II.2.1. Population de l'étude et échantillonnage

#### II.2.1.1. Choix du lieu de l'enquête

Le caractère contact professionnel avec les bovins est très différent chez la population humaine ; mais les éleveurs, les vétérinaires, les inséminateurs et les ouvriers d'abattoirs semblent être parmi les catégories avec les plus hautes fréquences. Or, le contact avec les vaches ayant des infections intramammaires est proportionnel à la densité de la population bovine d'une part, et à la fréquence d'apparition des mammites au sein de périmètre d'exercice professionnel de l'autre. Pour avoir une vision globale sur les clones circulants dans l'environnement d'élevage, six wilayas, Tizi-Ouzou, Boumerdès, Alger, Blida au nord centre et Khenchela et El-Bayad des hauts plateaux, ont servi de lieux pour notre enquête (**Figure 8**).



**Figure 8:** Répartition géographique de la population de l'étude et échantillonnage

Dans les six wilayas, toutes les cliniques vétérinaires joignables ont été contactées pour collaborer à ce travail. Après dépistage pour mammites clinique et subclinique, des prélèvements de lait mammitiqueux étaient effectués dans les wilayas de Tizi-Ouzou, Boumerdès, Blida et Khenchela au sein des fermes ayant un effectif variant entre 5 et 25 vaches. Parallèlement au

dépistage des mammites, des écouvillonnages nasals chez les trayeurs coopératifs ont été aussi réalisés.

### II.2.1.2. Echantillonnage

Pour mieux explorer sa variabilité écologique dans le milieu d'élevage en Algérie, via une sélection commode, six wilayas de pays ont été retenues pour la collecte des échantillons de lait mammitieux et des écouvillons nasals chez les personnes ayant un contact étroit avec les animaux pour la recherche de *S. aureus* et ce, durant la période allant de 7 juin au 1<sup>er</sup> septembre 2012. En l'absence d'une base précise de sondage, nous avons été obligés de mettre en application un plan d'échantillonnage qui allie à la fois la commodité et le hasard. Pour ce faire, le choix des exploitations était fonction de la disponibilité, alors que la taille de l'échantillon était le résultat du hasard, car seules les vaches présentant une mammitite, allaient être prélevées. Ainsi pour assurer une précision relative de l'enquête de 10%, à une prévalence quartier attendue de mammitite de 30%, 200 vaches (800 quartiers) en lactation allaient être dépistées.

Par contre, chez les professionnels contacts, nous avons été amenés à sensibiliser les manipulateurs afin de coopérer à la réalisation de cette enquête ; ceci veut dire que la participation a été facultative.

Au sein des deux abattoirs d'Alger, la commodité de travail par rapport aux laboratoires d'analyse microbiologique, la présence importante de professionnels coopératifs et disposant d'une promiscuité étroite avec les bovins de réforme au sein de l'abattoir d'El-Harrach et de la tuerie de Zéralda ont été les critères retenus dans le choix de notre enquête.

### II.2.1.3. Détermination de la taille de l'échantillon

La taille de l'échantillon animal était déterminée à partir d'une cohorte de 32 élevages laitiers coopératifs, ayant un effectif allant de 5 à 25 vaches, situés au sein des wilayas de Tizi-Ouzou, Boumerdès, Blida et Khenchela. Par conséquent, toutes les vaches en lactation des 32 exploitations laitières ont été prises en considération pour cette étude. Des prélèvements du lait sur tubes stériles étaient effectués chez les vaches présentant des quartiers à mammites cliniques ou celles révélées positives au test de CMT. Par ailleurs, des écouvillonnages nasals étaient également réalisés chez les trayeurs, les vétérinaires, les inséminateurs ainsi que des ouvriers des abattoirs de telle sorte à identifier un nombre de souches de *S. aureus* comparable à celui isolé en mammites.

Deux cents dix huit échantillons du lait mammitieux, répartis sur 116 vaches, ont été prélevés du 7 juin au 30 août 2012 au sein de 31 élevages bovins de quatre wilayas d'Algérie. De plus, 129 écouvillons nasals des professionnels coopératifs ayant un contact étroit avec les animaux et leurs informations socio-épidémiologiques, ont été aussi collectés.

### II.2.2. Enquête au sein des élevages

Afin d'accommoder notre protocole aux exigences pratiques, un ordre chronologique des examens est suivi ; celui-ci est présenté dans son ordre d'application comme suit :

#### II.2.2.1. Prospection des élevages

Au fur et à mesure de nos visites dans les fermes, des fiches de renseignement conçues spécialement pour repérer les facteurs animaux et environnementaux favorisant l'installation des infections intramammaires ont été remplies, suivant les informations du chargé d'élevage en tenant compte de nos constatations sur place (**Annexe I**). Les volets, descriptif des élevages, thérapeutique des mammites et les caractéristiques de la traite ont été développés dans la fiche d'élevage. Alors que, les facteurs intrinsèques liés au stade de lactation et au numéro de lactation ont été associés à la fiche de renseignement individuelle proposée lors du dépistage des mammites (**AnnexeII**).

#### II.2.2.2. Examen clinique des mamelles

Les différents quartiers des mamelles ont été examinés via inspection visuelle puis palpation pour révéler des symptômes de l'inflammation associés ou pas à des éventuelles lésions de pis. De plus, du lait de chaque quartier est prélevé et inspecté pour d'éventuels changements de couleur et de consistance.

#### II.2.2.3. Dépistage des mammites subcliniques

Chez les vaches en phase post-colostrale, une fois le pis est nettoyé d'une manière grossière, c'est selon les procédures données par **Quin et al. (1994)**, que le diagnostic de la mammite subclinique par le California Mastitis Test (CMT) a été réalisé. De chaque quartier, une fois les premiers jets éliminés, une quantité suffisante du lait est traite dans la coupelle correspondante de la palette de CMT, auxquelles une quantité égale du réactif de CMT est rajoutée. Ainsi, un doux mouvement circulaire dans un plan horizontal est assujéti à la palette pendant quelques secondes. Le résultat de la réaction marque le niveau de destruction des cellules somatiques et de

coagulation des acides nucléiques. De ce fait, la positivité est fonction de degré de formation de gel pouvant aller de +1 à +3 alors que, la négativité est l'aboutissement d'un mélange inchangé. Une vache est considérée atteinte d'une infection intramammaire si elle présente au minimum un quartier positif au CMT même en l'absence d'isolement de micro-organisme. Vu la grande subjectivité liée à la différenciation des degrés de formation de gel, seul l'aspect qualitatif de test CMT est retenu dans notre enquête (**Annexe III**).

### **II.2.3. Prélèvements et analyse microbiologique**

#### **II.2.3.1. Prélèvement des échantillons de lait**

##### **II.2.3.1.1. Prélèvement des laits mammites chez les vaches**

La qualité de l'examen bactériologique des laits de mammites dépend en grande partie de la qualité du prélèvement. Sur les mamelles en lactation, les prélèvements ont été effectués sur tous les quartiers présentant des signes cliniques incluant au minimum ; une modification apparente du lait et/ou une modification du quartier ou un CMT+. Ainsi, les prélèvements de lait ont été collectés, avant la traite du matin, selon les instructions de National Mastitis Council (**NMC, 1990**).

##### **II.2.3.1.2. Technique de prélèvement**

Afin de limiter tout biais lié à la technique de prélèvement, chaque quartier révélé préalablement atteint d'une infection intramammaire, a été lavé par de l'eau de robinet puis séché par des lavettes uniques jetables. Après avoir lavé soigneusement nos mains, des gants jetables ont été enfilés. L'extrémité du trayon est ensuite désinfectée avec un tampon de coton imbibé de l'alcool éthylique à 70°, en débutant par le trayon le plus éloigné et finissant par le plus proche.

La date, le numéro de l'animal et le quartier prélevé ont été mentionnées sur les tubes vacutainers stériles avant chaque collecte d'échantillon de lait. Après élimination des premiers jets, le bouchon est ôté. Le couple, tube et bouchon ont alors leurs ouvertures dirigées vers le bas, et ce afin d'éviter toute contamination. Sitôt, le trayon saisi de la main droite, est ramené en position latérale pour être trait presque horizontalement dans le flacon à prélèvement. Ce dernier en position oblique au moment où le lait gicle, est porté entre le pouce et l'index de la main gauche avec un bouchon porté par l'index et le médium orienté vers le bas. Enfin, le flacon est rebouché avant redressement, puis placé immédiatement dans un box isotherme (glacière) à 4°C et transféré au laboratoire pour analyse microbiologique. A l'inverse de l'ordre de désinfection

par l'alcool éthylique, l'échantillonnage de plusieurs quartiers a débuté par le trayon le plus proche et terminé par le plus éloigné.

### **II.2.3.2. Prélèvements chez les professionnels**

#### **II.2.3.2.1. Considérations d'éthique et technique de prélèvement**

Après avoir été informé de l'importance et les avantages scientifiques de notre enquête, les professionnels coopératifs ont donné leurs consentements écrits pour faire les prélèvements (**Modèle consentement : annexe IV**). Des écouvillons nasals ont été prélevés dans les deux narines et transportés dans le milieu de transport Amies (Institut Pasteur d'Algérie) au laboratoire pour analyse bactériologique. Les données relatives aux professionnels ont été tenues strictement confidentielles.

#### **II.2.3.2.2. Recueil des données démographiques**

Une fiche de renseignement préalablement conçue a été remplie parallèlement à un écouvillonnage nasal chez les professionnels ayant un contact avec le bétail. Ainsi, en plus des renseignements démographiques portant sur l'âge, le sexe, l'adresse professionnelle et la profession, les questions portaient essentiellement sur les données épidémiologiques du portage *S. aureus* tel que, l'hospitalisation, la promiscuité, les maladies chroniques, le type de contact avec les animaux et la prise des antibiotiques (**Annexe V**).

### **II.2.3.3. Isolement et identification des souches de *S. aureus***

A l'exception de Walk away réalisé au sein du laboratoire de microbiologie de CHU Mustapha Bacha, les manipulations de caractérisation phénotypique des souches ont été effectuées au Laboratoire d'Hygiène des Denrées Alimentaires d'Origine Animale de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger. Le protocole entier d'isolement et d'identification de *S. aureus* est donné par **la figure 10**

#### **II.2.3.3.1. Isolement de *S. aureus***

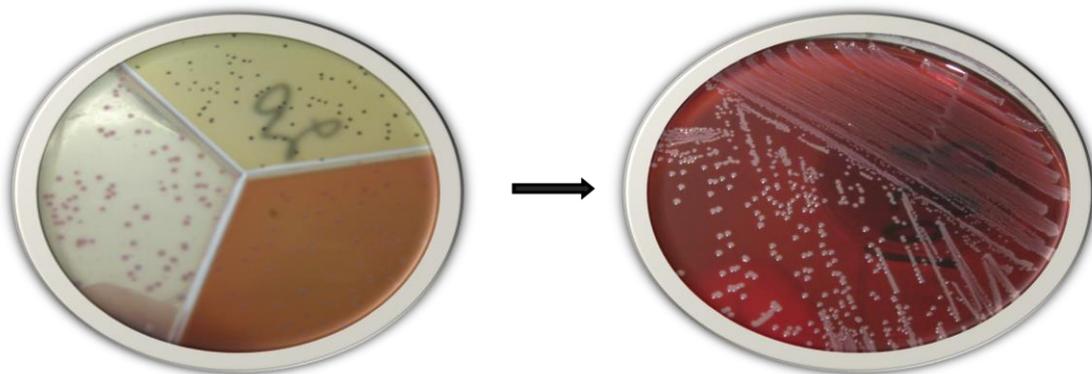
##### **II.2.3.3.1.1. Tiges nasales**

Une fois prélevés, c'est dans des bouillons cœur-cerveille (BHIB) que les tiges nasales ont été enrichies suivant une nuit d'incubation à 37°C. C'est via des suspensions résultantes homogénéisées, que des boîtes Pétri à deux compartiments contenant respectivement un milieu chromogène sélectif de *S. aureus* (*S. aureus*-select TM ; Oxoid, Paris, France) et une gélose

nutritive additionnée de 5% du sang de mouton, ont étéensemencées, puis incubées à 37°C pendant 24h à 48h. L'identification des staphylocoques a été effectuée d'abord grâce à l'aspect des colonies sur gélose au sang, par croissance sur le milieu chromogène sélectif de *S. aureus* et par les tests de catalase suivi par Pastorex et coagulase en série.

### II.2.3.3.1.2. Echantillons de lait

Après homogénéisation des échantillons du lait au vortex pendant cinq secondes, les milieux: gélose nutritive additionnée de 5% de sang de mouton, Baird-Parker supplémenté par 5% de jaune d'œuf et de 0,5% de tellurite de potassium, et le chromogène sélectif de *S. aureus* (*S. aureus*-select TM ; Oxoid, Paris, France), contenus respectivement dans les tiers de boîtes Pétri tri-compartimentées, ainsi que le bouillon cœur-cervelle (BHIB) ont été tousensemencés par 0,01 mL du lait chacun. Les boîtes et les bouillons sont ensuite, incubés pendant 24h à 48h à 37°C.



**Figure 9:** Isolement de *Staphylococcus aureus* à partir du lait mammitieux

**Lecture :** après incubation, un prélèvement est considéré positif une fois une croissance minimale de 100 UFC/mL est détectée. Tout échantillon montrant plus de deux différents types de colonies est considéré comme étant contaminé (NMC, 1990). En outre, toutes les colonies d'aspect caractéristique ou non caractéristique sont soumises à un test de confirmation (**Figures 9 et 10**).

Plan d'identification de *S. aureus*

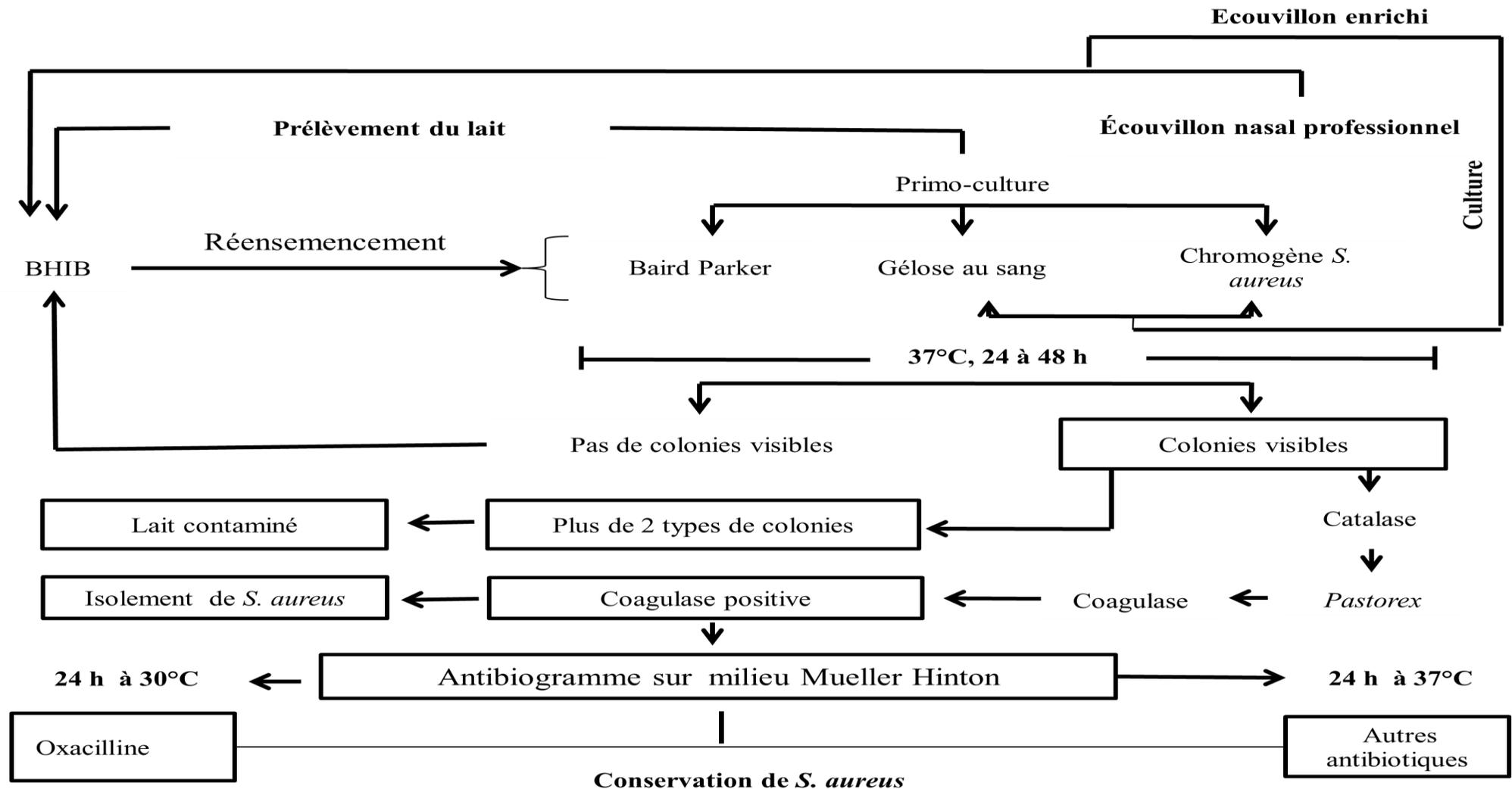


Figure 10 : Schéma de protocole d'isolement de *S. aureus* à partir des tiges nasales et du lait mammitieux

### II.2.3.3.2. Identification des souches de *S. aureus*

#### II.2.3.3.2.1. Test de la catalase

Il s'agit de mettre en évidence la présence de cette enzyme dans les bactéries. Pour cela, on racle à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie isolée de la souche à tester à partir de la gélose Baird Parker et on la dissocie dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur un fond propre et sec. Si la bactérie possède une catalase, il se produit un dégagement d'oxygène : on observe immédiatement une effervescence. Sinon, aucune réaction ne se produit. L'interprétation de la réaction se fait selon celles engendrées par les témoins positif et négatif.

#### II.2.3.3.2.2. Pastorex<sup>TM</sup> Staph Plus

C'est un test rapide d'agglutination sur lame pour la détection simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène, de la protéine A et des polysaccharides capsulaires de *S. aureus*. Le réactif est composé de :

**Le test de Latex** : Un flacon de 1mL de latex rouge sensibilisé par une solution d'albumine bovine, du fibrinogène, des IgG et des anticorps monoclonaux anti-polysaccharides capsulaires de *Staphylococcus aureus*.

**Le contrôle négatif** : Un flacon compte-goutte de 1mL de réactif témoin négatif de latex rouge sensibilisé par une solution d'albumine bovine.

La technique d'analyse consiste à mélanger une colonie de bactéries reconnues catalase positives avec une goutte de réactif sur une carte. L'apparition d'agglutinats indique que la souche est un *S. aureus*.

#### II.2.3.3.2.3. Test de la coagulase

Ce test permet la recherche de la coagulase, exo-enzyme capable *in vitro* de coaguler le plasma de lapin. Dans un tube à hémolyse stérile, on met un volume de plasma de lapin Bio-Rad (préalablement reconstitué), auquel on rajoute une colonie bactérienne et on laisse incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

### II.2.3.3.2.4. Walk away

Walk away est un test à télémaintenance, précis et fiable pour l'identification et l'antibiogramme automatisé, où la mesure des CMI est directe, c'est-à-dire non calculée et basée sur la croissance réelle de la bactérie dans chaque puits antibiotique.

Trois technologies de lecture y sont intégrées : colorimétrie, fluorescence et turbidimétrie, fournissant des résultats rapides d'identification en seulement 2h à 2h30 conduisant à des alertes automatiques, identifications biochimiques les plus rapides. Pour ce faire, nous avons suivi les étapes suivantes :

- ✚ Grâce à une pointe calibrée standardisée du Prompt <sup>TM</sup>, l'inoculum est rapidement et sans ajustement de la concentration par turbidimétrie ( $5 \times 10^5$  UFC/mL) prélevé à raison de 2 à 3 colonies pures et parfaitement identiques.
- ✚ La pointe du Prompt <sup>TM</sup> est par la suite introduite dans le flacon de préparation de la suspension, qu'on ferme puis mélange au Vortex pour homogénéiser.
- ✚ Cette suspension est versée sur le couvercle de la plaque PC31 "Pos Combo Panel Type 31" spécifique aux staphylocoques.
- ✚ A partir de cette suspension, l'inoculateur Renok permet d'inoculer et réhydrater les plaques Micro-Scan PC31 de façon simple et rapide en une seule étape (42 secondes).
- ✚ La plaque est ensuite fermée, débarrassée de l'excès de suspension et introduite dans l'appareil Microscan Walk Away 96 préalablement réglé, pendant 24h.
- ✚ Les résultats d'identification et de l'antibiogramme seront imprimés après 24 heures d'incubation.

## II.2.4. Résistance aux antibiotiques et typage moléculaire

### II.2.4.1. Test de sensibilité aux antibiotiques

Le test de sensibilité aux antibiotiques est réalisé *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose Muller-Hinton. La sensibilité à la pénicilline, l'oxacilline, la céfoxitine, la gentamicine, la kanamycine, l'érythromycine, la clindamycine, l'ofloxacine, la teicoplanine, la vancomycine, le cotrimoxazole, la tétracycline, la rifampicine, la fosfomycine, le chloramphénicol et la mupirocine pour les souches humaines a été interprété, selon les recommandations de CLSI

(2007). Par contre les critères d'interprétation de Comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie ont été retenus pour la pristinamycine et l'acide fusidique (SFM, 2007) (Annexe VI).

Le contrôle de qualité a été assuré par les souches de référence suivantes : *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, résistante à la méticilline et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sensible à la méticilline

### II.2.4.2. Recherche de la résistance à la méticilline

#### II.2.4.2.1. Le disque de la céfoxitine

Le disque de céfoxitine (30 $\mu$ g) est un bon marqueur de résistance à la méticilline. Il est appliqué dans les conditions standards selon le CLSI et interprété comme suit : si le diamètre est  $\leq 19$  mm, la souche est dite résistante à la méticilline, alors que s'il est  $>20$ mm, la souche est considéré sensible à la méticilline.

#### II.2.4.2.2. Le disque de l'oxacilline

Le disque de l'oxacilline (5 $\mu$ g) reste un marqueur non négligeable, servant au diagnostic phénotypique de la résistance hétérogène à la méticilline. Il est appliqué dans les conditions standards du CA-SFM et interprété comme suit, si le diamètre est  $\leq 20$  mm, la souche est dite résistante à la méticilline, alors que s'il est  $>20$ mm, la souche est considéré sensible à la méticilline. Il convient de signaler que le disque de l'oxacilline (5 $\mu$ g) est préféré au disque (1 $\mu$ g) de CLSI, car ce dernier est instable.

#### II.2.4.2.3. Mise en évidence de la PLP<sub>2a</sub>

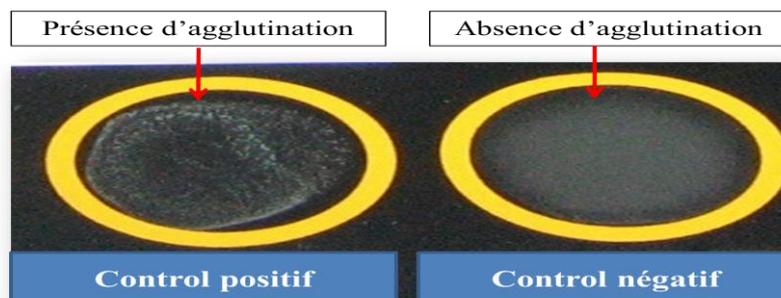
La recherche de la PLP<sub>2a</sub> a été opérée sur les souches ayant montré une résistance à l'oxacilline et/ou à la céfoxitine.

**Principe :** c'est un kit commercialisé (Oxoid) qui contient des particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal dirigé contre la PLP<sub>2a</sub> qui réagit spécifiquement avec les souches résistantes à méticilline entraînant l'apparition d'une agglutination visible à l'œil nu.

**Mode opératoire :** pour l'extraction des PLP, dans un tube de micro-centrifugeuse, 4 gouttes du réactif d'extraction "1" sont mélangées à une öse pleine de culture de souche à tester. La même opération est répétée pour les souches de références (ATCC433000 et ATCC25923), les tubes

sont mis ensuite au bain-marie à 95°C pendant 3 minutes. Une fois les tubes refroidis, une goutte du réactif d'extraction "2" est rajoutée à chacun des tubes. Après homogénéisation les tubes sont centrifugés à 1500 tours pendant 5 minutes, le surnageant est alors récolté.

Pour chaque tube (souche), l'agglutination est testée en mélangeant des gouttes de latex contrôle positif et de latex contrôle négatif avec le surnageant obtenu de chaque souche. Suivant des mouvements rotatoires de la carte, l'agglutination apparaît sur la carte dans les 3 minutes. Enfin, l'apparition de l'agglutination uniquement sur le latex contrôle positif, permet de considérer la souche testée résistante à la méticilline (**Figure 11**).



**Figure 11:** Test à la PLP<sub>2a</sub>

### II.2.4.3. Conservation des souches

La congélation des souches à -20°C a été réalisée sur des cryo-tubes contenant un bouillon de culture avec 10% de glycérol (cryo-conservateur) et une vingtaine de petites billes, sur lesquelles la souche adhère. Après avoir été richementensemencés à partir d'une culture pure et suivant une agitation, la totalité du bouillon est aspirée dans un Eppendorf stérile. Ainsi, les tubes contenant les billes et ceux remplis de cryo-conservateur étaient congelés séparément à -20°C. Sans décongeler le tube en entier, il suffit de retirer à chaque fois une bille pour les cultures ultérieures. Cette méthode permettra une durée de conservation de 10 ans et plus.

### II.2.4.4. Caractérisation moléculaire des souches au CNR des staphylocoques de Lyon

#### II.2.4.4.1. Dispositions générales

L'étude moléculaire a été réalisée au sein de Centre National de Référence des Staphylocoques de Lyon, France. Les techniques de caractérisation moléculaires adoptées pour les souches *S. aureus* étaient :

- ✚ **PCR (Polymerase Chain Reaction)** sur les 117 souches : pour identifier les gènes *gyr A*, *mecA*, *mecC* et les allèles *agr*.

- ✚ Séquençage du gène de la protéine A après amplification de ce dernier par PCR sur les 117 souches : utilisé pour identifier le type-de-*spa*, “*spa*-type”
- ✚ Analyse par les puces à ADN ou DNA microarray Clondiag® sur une sélection de 40 souches : pour une caractérisation approfondie des souches de *S. aureus*.

#### II.2.4.4.2. Extraction Qiagen-Qiacube de l'ADN bactérien

C'est une méthode qui nécessite un automate de marque Qiagen dit Qiacube, des colonnes d'extraction et différents réactifs liés à l'automate. Comparativement à la méthode chaud-froid, l'ADN extrait par la méthode Qiagen-Qiacube peut être conservé pendant longtemps. Or, pour écarter le danger de manipulation du chloroforme pour la santé, la méthode d'extraction Qiagen-Qiacube est adoptée bien qu'elle présente un rendement 100 fois plus faible que par la méthode phénol chloroforme. Le protocole d'extraction est le suivant :



Figure 12 : Photo de l'automate d'extraction Qiagen-Qiacube

##### II.2.4.4.2.1. Préparation des lysats

Une culture pure et fraîche d'une densité bactérienne supérieure à 3 Mc Farland, est préparée puis centrifugée pendant 10 minutes à 3000 tours/min. Le culot est alors rincé en étant repris dans 400  $\mu$ L d'eau PPI puis centrifugé une deuxième fois pendant 5 minutes à 3000 tours/min.

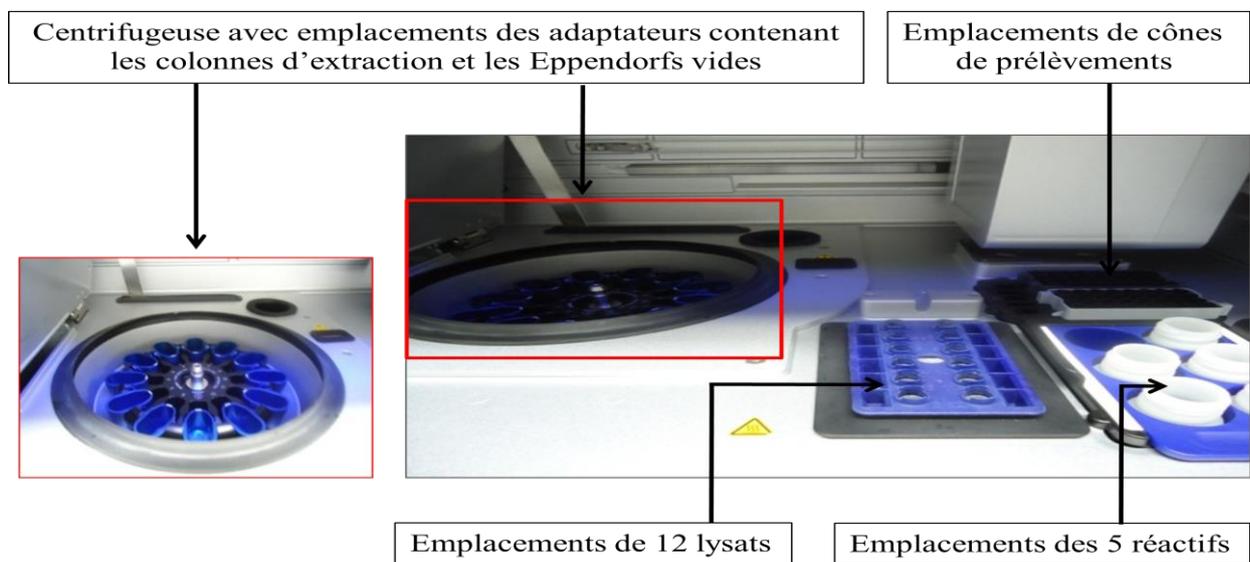
Le surnageant éliminé, le culot est remis en suspension dans 200  $\mu$ L de tampon Tris Tritons. La suspension obtenue est transférée dans un Eppendorf de 2 mL préalablement numéroté.

A cette suspension sont ajoutés les réactifs de lyse suivants: 20  $\mu$ L de lysostaphine à 2 mg/mL ; 20  $\mu$ L de lysosyme à 10 mg/mL et 20  $\mu$ L de ARNase à 10 mg/mL (afin d'éliminer certaines contaminations). La suspension est ensuite agitée au vortex et incubée au bain-marie à 37°C, pendant au moins une heure. Au bout de ce temps, 200  $\mu$ L de tampon “AL” (tampon de lyse

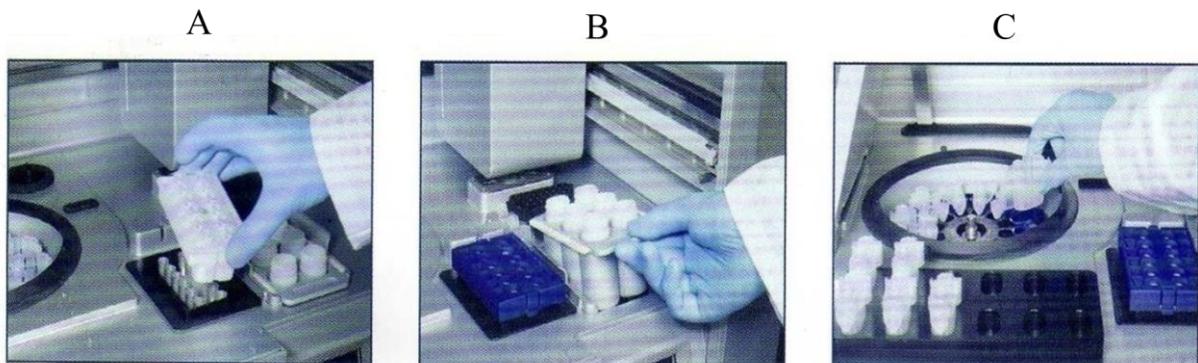
Qiagen) et 20 $\mu$ L de protéinase K (fournis par Qiagen, et dont la concentration n'est pas indiquée) sont ajoutés à la suspension. Après agitation, cette dernière est incubée pendant 1 heure au bain-marie à 50°C.

#### II.2.4.4.2.2. Extraction de l'ADN

Exécutée par l'automate Qiacube, elle se fait en plaçant les lysats obtenus dans l'appareil. En parallèle dans une centrifugeuse intégrée à l'automate, un support est placé, ce dernier contient d'un coté, des colonnes d'extraction et de l'autre, des Eppendorfs vides sur lesquels est noté le numéro de souche (**Figures 13 et 14**).



**Figure 13** : Face interne de l'automate avec les différents emplacements



**Figure 14** : Mise en place des lysats (a) ; des réactifs (b) et des colonnes d'extractions (c)

Une fois que tout est mis en place, le niveau des réactifs utilisés est vérifié alors l'extraction est lancée, elle dure plus ou moins 1 heure selon le nombre de lysats insérés. En sachant que l'automate peut prendre 12 lysats au maximum.

### II.2.4.4.2.3. Principe de l'extraction par colonne d'extraction sur Qiacube

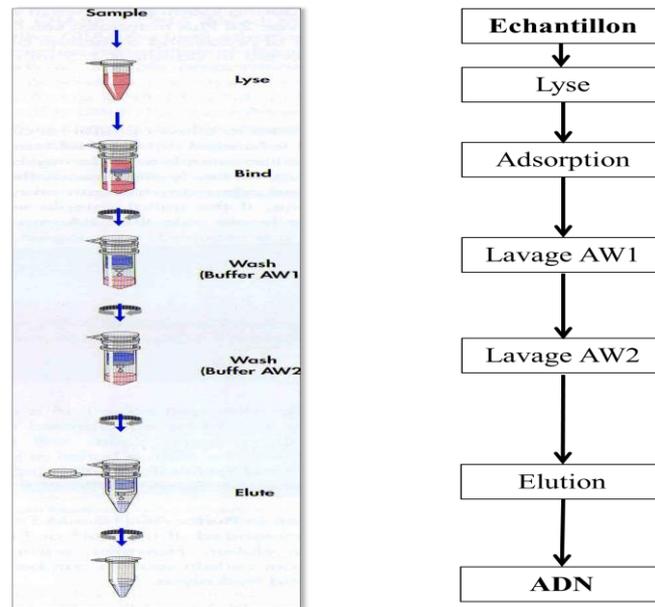
L'automate utilise 4 réactifs dont les concentrations et la composition exacte sont tenues confidentielles par le laboratoire Qiagen :

1. Tampon de lyse "AL", contient de la guanidine hydrochloride
2. Tampon d'élution "AW1"
3. Tampon d'élution "AW2"
4. Tampon d'élution "AE"
5. Ethanol absolue

A l'intérieur de l'automate, les lysats sont soumis à une dernière étape de lyse par le tampon de lyse "AL". Ils sont ensuite homogénéisés et transférés au niveau de la colonne d'extraction qui est placée dans la centrifugeuse.

Lors de la centrifugation, les lysats traversent la colonne d'extraction, et l'acide nucléique se lie à la membrane de silice ou résine de purification Qiagen. A ce moment là, un premier lavage est effectué avec le tampon d'élution "AW1" suivi d'une centrifugation puis d'un deuxième lavage avec le tampon d'élution "AW2", ces deux lavages ont pour but d'éliminer toutes les impuretés et différentes contaminations.

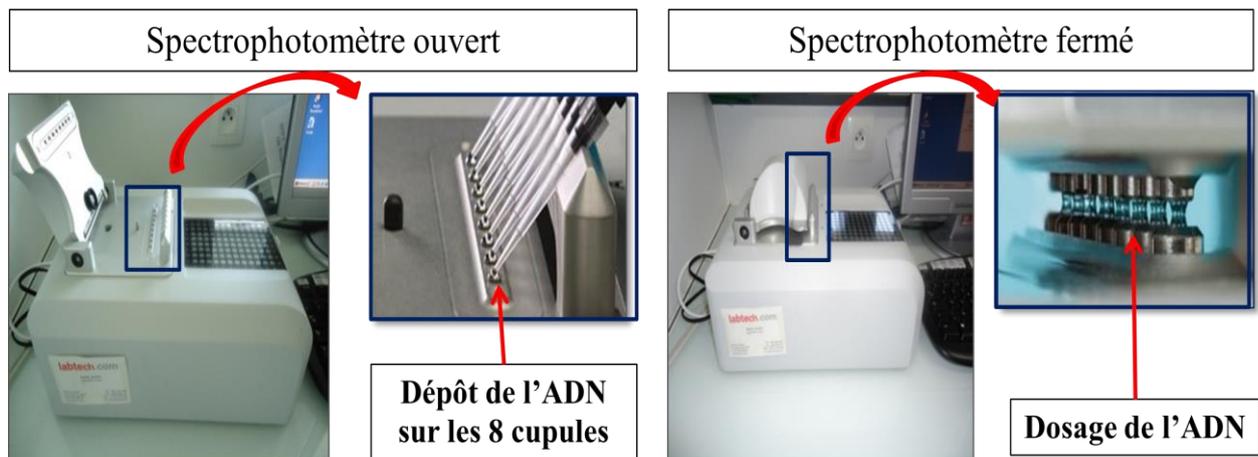
Enfin la colonne d'extraction est transférée au niveau de l'Eppendorf vide numéroté, où le tampon d'élution "AE" est ajouté, ce dernier va décrocher l'ADN qui sera élué dans l'Eppendorf vide (**Figure 15**). A la fin de chaque extraction, 200µL d'ADN sont récoltés dans chaque Eppendorf.



**Figure 15 :** Extraction d’ADN par la colonne de l’automate Qiagen-Qiacube (Qiagen®, 2010)

#### II.2.4.4.3. Dosage de l’ADN

Pour s’assurer du bon déroulement de l’extraction par la méthode Qiagen-Qiacube, des dosages à l’aide d’un spectrophotomètre Nano-Drop 8000 de la marque ThermoScientific®, ont été effectués sur chaque ADN extrait (**Figure 16**). Le protocole de dosage étant le suivant :



**Figure 16 :** Dosage de l’ADN par le Nano-Drop 8000, ThermoScientific®

- Après avoir initialisé les paramètres du Nano-Drop en mettant de 2 $\mu$ L d’eau PPI au niveau de chacune des huit petites cupules, l’appareil est calibré avec du tampon d’élution “ AE ” Quiagen® (utilisé comme blanc), l’ADN étant mis en suspension dans ce tampon lors de l’extraction.

- Une fois le spectrophotomètre calibré, 2µL de chaque ADN extrait sont déposés dans les huit cupules, l'appareil mesure la concentration de chaque ADN en nano-grammes par microlitres (**Figure 16**). Afin que l'extraction puisse être validée, la concentration de l'ADN extrait doit être supérieure ou égal à 150 ng/µL.

Dans le cas où la concentration d'ADN est inférieure à 150 ng/µL, l'échantillon est concentré dans une centrifugeuse à chaud, celle utilisée au CNR est de la marque DNA speed VAC®, DNA110 SAVANT®. L'échantillon en tube est inséré couvercle ouvert pendant environ 10 à 20 min. Il est préférable de ne pas dépasser ce temps, ni de répéter l'opération, afin de préserver la qualité de l'ADN.

Si la concentration de l'ADN est trop faible c'est-à-dire inférieur 80 ng/µL environ, l'extraction est à refaire.

#### **II.2.4.4.4. Amplification de l'ADN**

Avant de commencer l'amplification, nous préparons les mélanges réactionnels ou MIX des différentes PCR.

##### **II.2.4.4.4.1. Préparation des mélanges réactionnels (MIX)**

Chaque PCR doit contenir les réactifs suivant : du tampon 10X sans MgCl<sub>2</sub> (tampon spécial pour PCR), le MgCl<sub>2</sub>, des désoxy-ribo-nucléotides (DNTP), de l'eau PPI (Pour Préparation Injectable), l'enzyme Taq polymérase et les amorces appropriées à chaque gène recherché. Tous ces réactifs sont mélangés à des proportions différentes selon les PCR effectuées, (**Annexe VII**). Une fois préparé, le MIX est rigoureusement mélangé au vortex puis réparti dans des eppendorfs à PCR, à raison de 35 ou 45µL (selon la PCR). Puis 5µL d'ADN extrait sont ajoutés à chaque mélange. A ce stade l'amplification peut commencer.

##### **II.2.4.4.4.2. Amorces utilisées**

**Tableau 6:** Référence des amorces du système des gènes accessoires de régulation (*agr*)

Gène	Nom de l'amorce	Séquence	Taille de fragment (PB)
<b>Pan <i>agr</i></b>	Pan <i>agr</i>	5'-ATG CAC ATG GTG CAC ATG C-3'	
<b><i>agr 1</i></b>	<i>agr 1</i>	5'-GTC ACA AGT ACT ATA AGC TGC GAT-3'	<b>440</b>
<b><i>agr 2</i></b>	<i>agr 2</i>	5'-TAT TAC TAA TTG AAA AGT GGC CAT AGC-3'	<b>550</b>
<b><i>agr 3</i></b>	<i>agr 3</i>	5'-GTA ATG TAA TAG CTT GTA TAA TAA TAC CCA G-3'	<b>300</b>
<b><i>agr 4</i></b>	<i>agr 4</i>	5'-CGA TAA TGC CGT AAT ACC CG-3'	<b>650</b>

**Tableau 7:** Référence des amorces des gènes *mecA*, *mecC*, *gyr* et *spa*

Gènes	Nom de l'amorce	Séquences	Taille de fragment (PB)
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> -1	5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3'	533
	<i>mecA</i> -2	5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3'	
<i>mecC</i>	LGA <sub>251</sub> /DKFP	5'-GAA AAA AAG GCT TAG AAC GCC TC-3'	138
	LGA <sub>251</sub> /DKRP	5'-GAA GAT CTT TTC CGT TTT CAG C-3'	
<i>gyr</i>	<i>gyr</i> -1	5'-AGT ACA TCG TCG TAT ACT ATA TGG-3'	280
	<i>gyr</i> -2	5'-ATC ACG TAA CAG TTC AAG TGT G-3'	
<i>spa</i>	1095 F	5'AGACGATCCTTCGGTGAGC3'	
	1517 R	5'GCTTTTGCAATGTCATTACTG-3'	

#### II.2.4.4.3. Amplification

Elle est réalisée dans un thermocycleur pendant environ 1h30, dans les conditions suivantes : une étape de chauffage à 94°C pendant 5 minutes suivie de 25 cycles répétés comportant chacun une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant une minute est terminée par une dernière étape de chauffage à 72°C pendant 7 minutes.

Chaque PCR comportera :

- ☞ Un témoin négatif : sans ADN, c'est-à-dire contenant uniquement le MIX
- ☞ Un témoin positif contenant un mélange de plusieurs ADN préparés à partir de souches identifiées contenant les gènes codants pour les toxines recherchées

#### II.2.4.4.5. Révélation des fragments amplifiés

Les fragments d'ADN amplifiés ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose

##### II.2.4.4.5.1. Préparation du gel

Une concentration de 1,5% de gel d'agarose est requise, pour cela, 1,5g d'agarose sont préparés dans 100 mL de tampon Tris Borate EDTA (Tampon TBE) dilué au 1/20. Ce mélange tampon-agarose est chauffé au micro-onde jusqu'à l'obtention d'un liquide limpide puis additionné d'un agent révélateur : le SYBER safe® (sensible à la lumière) à raison de 1µL pour 10 mL de tampon.

Le gel préalablement mélangé est alors coulé au niveau du support de l'électrophorèse, en évitant la formation de bulles d'air. Enfin, le dépôt des amplifiats ne se fait qu'après solidification du gel nécessitant au moins 30 minutes.

#### II.2.4.4.5.2. Dépôt des amplifiats et migration

Après solidification du gel, on le dépose soigneusement dans la cuve à électrophorèse en superposant les puits sur les indicateurs, puis on l'inonde de la solution TBE diluée à 1/20<sup>ème</sup> permettant l'ouverture des puits pour un dépôt adéquat. Les amplifiats, le poids moléculaire et les témoins positif et négatif étant transparents, sont mélangés à un traceur, le loading dye avant leur dépôt. Dans chaque puits, 8 $\mu$ L d'amplifiats sont déposés, séparés par deux dépôts de poids moléculaire (100pb Ladder) dans des puits assez proches pour permettre la lecture de part et d'autre sur le gel. Enfin, la migration se fait à 130 volts pour une durée de 20 à 40 minutes selon la taille des fragments d'ADN et de la taille du gel.



Figure 17 : Dépôts des amplifiats dans le gel

#### II.2.4.4.5.3. Révélation des amplifiats

Une fois la migration terminée, les produits de PCR ainsi séparés vont être révélés grâce à un appareil de transillumination : Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ (Figure 18).

Après révélation des amplifiats, l'interprétation des résultats se fait en comparant la taille des fragments révélés avec ceux de témoin positif.



Figure 18: Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> XR+

#### II.2.4.5. Le typage du gène codant pour la protéine A (Typage-de-*spa*)

##### II.2.4.5.1. Séquençage de la région polymorphique de *spa*

Le gène codant pour la protéine A de *S. aureus*, désigné *spa*, est constitué d'une région X hautement polymorphique avec un nombre variable de séquences répétées de 25pb se situant au niveau de l'extrémité 3' du gène de structure codant pour la protéine A. L'identification par le typage de *spa* apparaît comme plus discriminante que le MLST et de réalisation plus facile et moins coûteuse, car ne nécessitant le séquençage que d'un seul gène (**Harmsem *et al.*, 2003 ; Mellman *et al.*, 2006**). Sur le plan pratique, elle consiste à amplifier d'abord le gène de la protéine A, à séquencer la région x du gène puis à analyser les séquences répétées. C'est ainsi que les 117 souches ont été identifiées par la méthode de typage de *spa* dans notre étude.

##### II.2.4.5.2. Amplification du gène *spa* par PCR

Suivant la préparation des mélanges réactionnels (**Annexe VI**), une PCR classique à la recherche du gène *spa* est effectuée comme citée précédemment. Pour l'amplification du gène, le programme suivant est utilisé : une étape de chauffage à 95°C pendant 5 minutes suivie de 30 cycles répétés comportant chacun une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 60°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 30 secondes puis elle est terminée par une étape de chauffage à 72°C pendant 5 minutes. Une fois l'amplification terminée, le gène est révélé par électrophorèse sur gel.

##### II.2.4.5.3. Séquençage et analyse des séquences répétées

Le séquençage est réalisé par sous-traitance entre le CNR et une société allemande (Ridom GmbH, Würzburg, Germany). Chaque ADN amplifié est de ce fait envoyé pour séquençage en Allemagne. Les séquences identifiées sont ensuite directement reçues par e-mail puis analysées. A chaque variation tant de la séquence que du nombre de répétitions de cette région variable, un numéro arbitraire est attribué à l'aide d'un logiciel informatique, le "*Ridom Staph Type Software*" (<http://www.spaserver.ridom.de/>). De plus, les séquences saisies sont automatiquement contrôlées permettant un haut niveau de qualité. Cette technique génère alors des "types-de-*spa*" (par exemple t223), que le logiciel regroupera au sein de "*spa-CC*" ou complexes clonaux "*spa*", contenant des "types-de-*spa*" proches.

#### II.2.4.6. Typage par les puces à ADN

Afin de mieux étudier la spécificité d'espèces et la virulence des souches, 29 *S. aureus* responsables de mammites bovines et 11 *S. aureus* issus de portage nasal chez les professionnels ayant un contact étroit avec les animaux, étaient analysées aux puces à ADN (**Tableau 8**). Ainsi, l'analyse par le kit StaphyType (Alere, Technologies GnbH, Jena, Allemagne) a ciblé :

- ✚ Les types-de-*spa* résistants à la pénicilline
- ✚ Les types-de-*spa* inhabituels
- ✚ Les types-de-*spa* identiques isolés aussi bien en mammites qu'en portage
- ✚ Les représentants de chaque type-de-*spa* responsable de mammites

##### II.2.4.6.1. Présentation et importance des puces à ADN

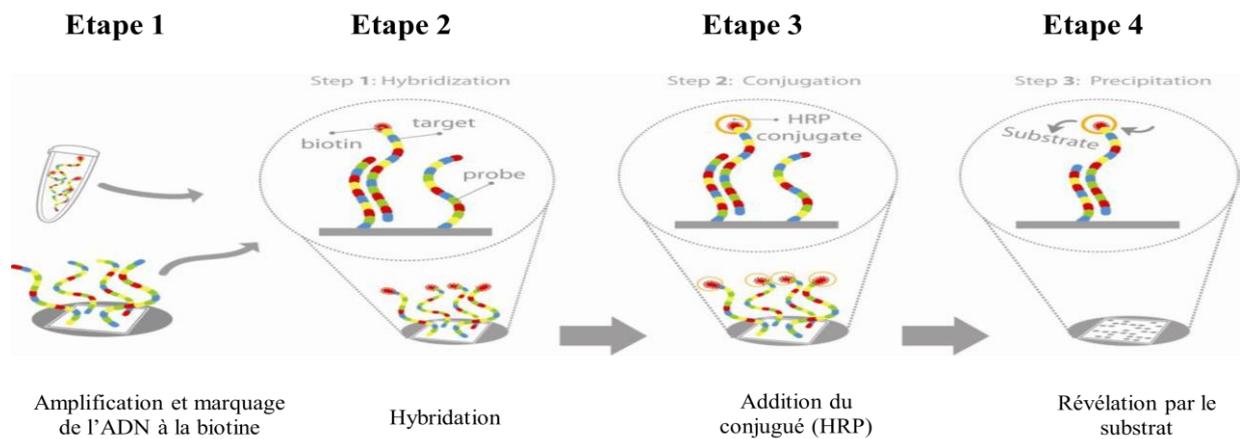
L'implantation de la technologie des puces à ADN a permis de remplacer l'ensemble des techniques de PCR, d'élargir le panel d'informations recueillies et de faciliter l'analyse des données. Elle permet également de mieux caractériser les facteurs de virulence et de les relier à un clone donné ou à une forme clinique observée. Le principe de cette technologie repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il se trouve en présence d'un brin complémentaire. Les puces à ADN se présentent sous la forme de surfaces solides (lame de verre, membrane) de quelques millimètres carrés sur lesquelles sont disposées, sous forme de spots alignés et ordonnés, de courtes séquences cibles d'ADN simple brin, pouvant s'hybrider avec les produits PCR complémentaires.

L'utilisation de la puce Alere repose sur l'amplification de 185 gènes qui codent pour : des marqueurs d'espèce, des marqueurs de résistance, des facteurs de virulence, des marqueurs de SSCmec, des capsules, des biofilms et autres marqueurs épidémiologiques permettant de rattacher les souches testées aux clones épidémiques et endémiques de *S. aureus*. Ces 185 gènes sont représentés par 332 allèles, ces derniers sont répartis sur la surface de la puce en 729 spots, chaque allèle (gène) est posé au minimum 2 fois (2 spots différents) ce qui permet de confronter les résultats obtenus et de les valider.

##### II.2.4.6.2. Protocole d'utilisation des puces à ADN

Après amplification et marquage de l'ADN, les fragments amplifiés sont mis en contact avec la puce pour permettre une ou des éventuelles hybridations amplifiat/cible. Ces hybridations seront ensuite révélées par une technique fluorescente ou chromogénique puis détectées à l'aide d'un

lecteur dédié (ArrayMate®, Alere). Le protocole entier permet d’avoir une cartographie génétique simplifiée de chaque souche testée en moins de 3 heures (**Figure 19**).



**Figure 19 :** Les principales étapes d’utilisation des puces

### II.2.4.6.3. Amplification et marquage de l’ADN extrait

#### II.2.4.6.3.1. Préparation du mélange réactionnel (MIX)

Ce mélange réactionnel n’est pas un mix classique mais il est adapté au protocole des puces Clondiag. En effet, il contient un marqueur, la biotine, à raison de 15µL et du tampon pour biotine à raison de 600µL.

Ce mélange est réparti dans des eppendorfs à PCR, à raison de 5µL, auquel sont ajoutés 5 à 6,5µL d’ADN extrait selon la concentration de ce dernier (pour l’application des puces, la concentration de l’ADN extrait doit être supérieure ou égale à 150 ng/mL).

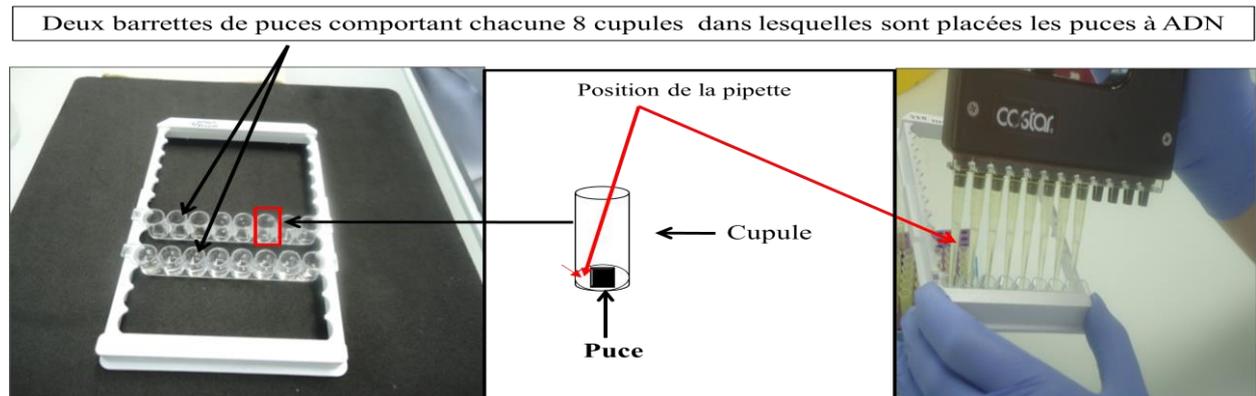
#### II.2.4.6.3.2. Amplification de l’ADN

C’est une amplification multiplex dans un tube unique, le programme d’amplification n’est donc pas le même que celui utilisé pour la PCR. Les conditions appliquées sont les suivantes : une étape de chauffage à 95°C pendant 5 minutes suivie de 45 cycles répétés comportant chacun une étape de dénaturation à 50°C pendant 20 secondes, d’hybridation à 72°C pendant 30 secondes et une élongation à 95°C pendant 20 secondes.

#### II.2.4.6.4. Hybridation et révélation des puces

##### II.2.4.6.4.1. Préparation des puces

Avant l'hybridation, les puces doivent être préparées. En sachant que la puce Alere est présentée, placée au fond d'une cupule au format d'une barrette de type ELISA à 8 puits (ArrayStrip, 8 puces/barrette), ce qui permet de traiter 8 puces donc 8 souches à la fois.



**Figure 20** : Technique de préparation des puces à l'aide d'une pipette multicanaux

Afin d'éviter de décrocher les sondes nucléotidiques et la formation des bulles d'air, une attention particulière était portée sur la survenue de contact entre la pipette et les puces (**Figure 20**)

La préparation des puces se fait par un premier lavage avec 200 $\mu$ L d'eau PPI, une fois le lavage terminé, 200 $\mu$ L de tampon d'hybridation "C1" sont ajoutés, la barrette de puce est alors incubée à 55°C pendant deux minutes sous agitation à 550 tours/min dans un thermomixeur de la marque Eppendorf® (**Figure 21**).



**Figure 21** : Thermomixeur de la marque Eppendorf®

#### II.2.4.6.4.2. Hybridation des puces

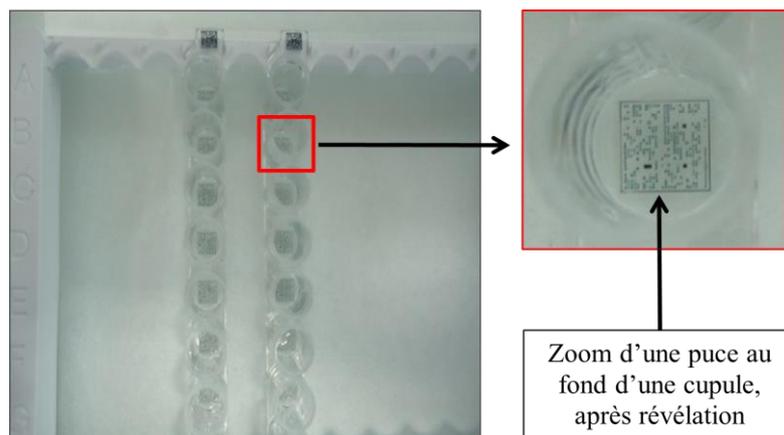
Après préparation des puces, le tampon est rejeté et l'hybridation peut alors commencer, elle s'effectue en ajoutant à chaque puce, 90 $\mu$ L de tampon "C1" avec 10 $\mu$ L d'ADN amplifié et marqué, l'hybridation dure 1 heure sous incubation à 55°C associée à une agitation de 550rpm dans le thermomixeur.

#### II.2.4.6.4.3. Addition du conjugué

L'hybridation étant achevée, l'ADN est alors, éliminé par 3 lavages successifs avec du tampon de lavage "C2". L'hybridation peut être détectée par l'addition d'un conjugué "C3", la streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) mélangé à son tampon "C4", le tout à raison de 100 $\mu$ L, soit 99 $\mu$ L de "C4" + 1 $\mu$ L de "C3". La détection dure 10 minutes à 30°C sous agitation à 550rpm. Au bout de ce temps, le conjugué est éliminé par un lavage avec 200 $\mu$ L de tampon de lavage "C5".

#### II.2.4.6.4.4. Révélation des puces

Les puces sont révélées par l'addition de 100  $\mu$ L du substrat "D1", spécifique du conjugué HRP. L'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, des puces additionnées de substrat "D1" associée à l'élimination de substrat après cinq minutes d'incubation permet de révéler les puces (**Figure 21**).

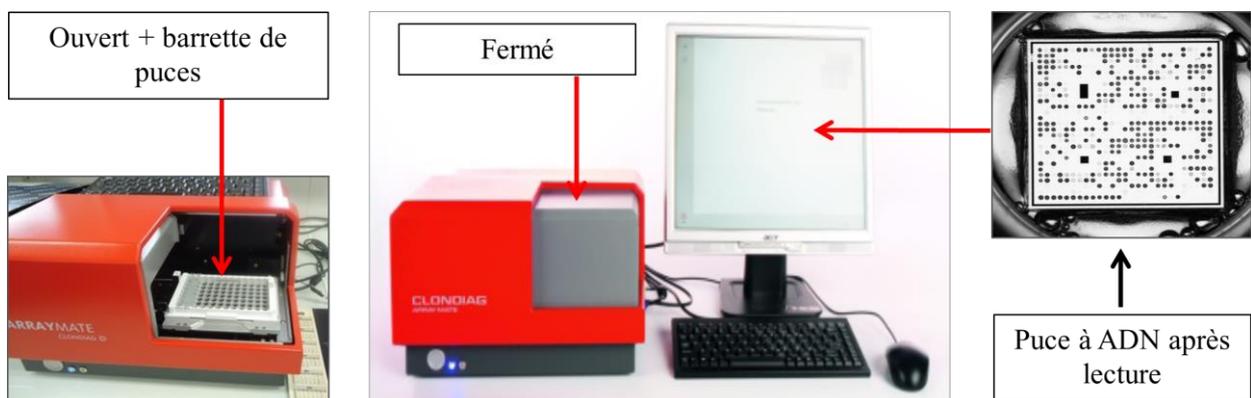


**Figure 22** : Aspect des puces après l'étape de révélation.

#### II.2.4.6.4.5. Lecture des puces

La lecture des puces par l'automate, ARRAYMATE de la marque Clontia® (**Figure 22**), doit se faire au plus tard dans les 30 minutes suivant la révélation. La barrette de cupules est alors

insérée dans le lecteur, l'automate par son logiciel affiche la photo de chaque puce. En sachant que l'emplacement de chaque spot correspond à un gène connu, la photo de la puce montre les différents spots colorés dans un dégradé de blanc à noir. Le blanc indiquant qu'il n'y a pas eu hybridation entre le gène et l'amorce, il sera donc interprété comme absence du gène recherché, au contraire un spot noir sera interprété comme présence du gène recherché. Un seuil de positivité étant établi pour les spots de couleur grise par spectrophotomètre. Evidemment l'interprétation des spots est effectuée par le logiciel, au final, une cartographie génétique complète est obtenue pour chaque souche avec un résumé des principaux caractères génétiques recherchés (**Figure 23**).



**Figure 23** : Lecture d'une puce ADN de *S. aureus* par l'automate Clondiag® - ARRAYMATE

### II.2.5. Synthèse des données et analyse statistique

#### II.2.5.1. Collecte des données

Sur le registre et les fiches de renseignement, un plan de notation a été élaboré afin de pouvoir reporter, sur place, les résultats des examens, en minimisant le risque d'erreur de saisie. Une seule personne était dédiée à cette opération pendant toute la durée de la pratique

#### II.2.5.2. Codage et saisie des données

Les données collectées sur place et les résultats des analyses ont ensuite été saisis, au fur et à mesure des analyses, à l'aide d'un système de gestion de base de données (Microsoft Excel, 2007). Afin de minimiser le risque d'erreur lors de cette opération, le formulaire de saisie a été élaboré en reprenant la même présentation que la version papier de plan de notation. Les explications des valeurs manquantes ou des éventuelles remarques ont été signalées dans une case prévue à cet effet.

### II.2.5.3. Analyse statistique

Le test Chi-deux ( $\chi^2$ ), avec corrections de Yates en cas de besoin ainsi que les tests non paramétriques permettant l'analyse d'indépendance entre les variables aléatoires ont été utilisés.  $P < 0.05$  est considéré statistiquement significatif. Par ailleurs, les intervalles de confiance étaient calculés selon les formules proposées par **Toma *et al.* (2001)**.

Afin d'investiguer les potentiels facteurs de risque des mammites, les variables ont été groupées puis catégorisées pour l'analyse statistique comme suit : nombre de parités, stade de lactation, conditions d'élevage et historique d'une mammité.

- ✚ Type d'élevage : vaches laitières vs vaches allaitantes
- ✚ Système d'élevage : intensif vs semi-extensif
- ✚ Séparation des veaux : non vs oui
- ✚ Type de traite : manuelle vs mécanique
- ✚ Nombre de trayeurs : 1, 2 ou 3 catégories
- ✚ Intrants récents : non vs oui
- ✚ Nombre de parités : 1, 2, 3, 4 et 5 ou plus catégories
- ✚ Stade de lactation : 1-2, 3-4, 5-6, ou 7-9 mois

Les variables dépendantes analysées étaient la positivité aux mammites (0-1), est considéré positif toute vache ayant au moins un quartier atteint de mammité clinique ou subclinique. De même une vache est considérée infectée à *S. aureus* (0-1) si elle présente au moins un quartier positif. Les données étaient analysées par l'algorithme de la régression logistique combinatoire. La ferme a été introduite comme un facteur aléatoire pour contrôler ses effets à travers le reste des autres facteurs, qui étaient introduits dans une méthode conditionnelle en arrière et enlevés de modèle un par un jusqu'à ce que le meilleur modèle soit construit, et ce, en tenant compte de la valeur minimale AIC (Akaike information criterion). L'Odds ratio était calculé en augmentant  $e$  à la puissance du coefficient logistique au-delà de la première catégorie de chaque facteur, mais pas au delà du dernier. L'analyse statistique a été réalisée par la fonction `glmer()` de logiciel `lme4` (**Bates *et al.*, 2015**) et de logiciel statistique R (**R v.3.2.3 ; R Core Team, 2015**).



NE CROYONS QUE CE QUE NOUS ANALYSONS

# *Résultats*

## II.3. Résultats

### II.3.1. Etude l'échantillonnage

#### II.3.1.1. Distribution géographique des échantillons

L'exploration des fluctuations épidémio-écologiques de *S. aureus* dans le milieu de l'élevage a concerné 129 personnes exerçant une activité professionnelle liée aux animaux et 32 élevages disposant de 222 vaches en lactation dans six différentes wilayas du pays. Une variabilité géographique importante du nombre de prélèvements est observée. En effet, 51,3% des vaches laitières émanent de la wilaya de Tizi-Ouzou et 79,8% des écouvillons nasals sont issus de professionnels des wilayas de Tizi-Ouzou et d'Alger (**Tableau 8**).

**Tableau 8:** Répartition géographique des échantillons au sein de la population d'étude

Région d'Algérie	Wilaya	Animaux			Professionnels			Total Nb (%)
		Fermes	Vaches	V. lac	Cat A Nb (%)	Cat B Nb (%)	Cat C Nb (%)	
Nord- centre	A	17	136	114	21	34	--	55 (42,6)
	B	8	70	55	8	2	--	10 (07,7)
	D	2	27	18	--	5	--	5 (03,8)
	E	--	--	--	12	11	25	48 (37,2)
Steppe	C	5	37	35	--	4	--	4 (03,1)
	F	--	--	--	--	7	--	7 (05,4)
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>32</b>	<b>270</b>	<b>222</b>	<b>41 (31,8)<sup>ab</sup></b>	<b>63 (48,8)<sup>a</sup></b>	<b>25 (29,3)<sup>b</sup></b>	<b>129 (100%)</b>

Tizi-Ouzou (A), Boumerdès (B), Khenchela (C), Blida (D), Alger (E), El-Bayadh (F), Catégorie (Cat), V. lac : vache en lactation ; **Cat A** : individus ayant un contact étroit et permanent avec les animaux du même élevage (éleveur et zootechniciens) ; **CatB** : Les professionnels ayant un contact étroit avec différentes exploitations (vétérinaires cliniciens) ; **Cat C** : Ouvriers des abattoirs

Des individus âgés entre 19 et 74 ans avec une moyenne d'âge de  $37 \pm 8,8$  ans, et ayant cumulé des expériences professionnelles oscillant de 1an à 50 ans, faisant une durée moyenne d'exercice de l'activité de  $12 \pm 8,9$  ans et un sexe ratio de 6,1 pour le masculin ont composé l'échantillon professionnel. En fonction du type de contact avec les animaux, des considérations épidémiologiques ont permis de répertorier en trois catégories le personnel dépisté. **La catégorie A** avec représentant 31,8% de l'échantillon, inclut les individus ayant, un contact étroit et permanent avec les animaux du même élevage (éleveurs et zootechniciens). Le personnel ayant un contact étroit avec différentes exploitations comme les vétérinaires cliniciens sont classés dans **la catégorie B**, cette dernière représente 48,8% des écouvillons. Enfin, les ouvriers des abattoirs composent la **catégorie C** avec un taux de 29,3% ( $P=0,0002$ ).

**II.2.1.2. Description et évolution de l'échantillonnage au sein des fermes**

Les élevages visités disposent de 5 à 32 têtes bovines ( $15,5 \pm 6,9$  têtes / élevage) hébergées dans 1 à 4 enclos et entretenues par environ deux éleveurs permanents par élevage. Ainsi, 49 éleveurs assurent l'entretien de 32 élevages abritant 496 têtes bovines dont 270 vaches. De ces dernières 48 (0 à 7 vaches / élevage) vaches étaient en phase de tarissement et n'ont pas fait l'objet de dépistage de mammites ; au moment où tous les quartiers des 222 vaches en lactation étaient soumis au dépistage de mammites cliniques et subcliniques (**Tableau 9**)

Sur les 49 éleveurs ayant un contact étroit et permanent avec leurs animaux dans les 32 élevages, 25 étaient favorables à un écouvillonnage nasal. Les professionnels (18 personnes) affiliés aux élevages E<sub>16</sub>, E<sub>17</sub> (Tizi-Ouzou) et E<sub>20</sub>, E<sub>21</sub> (Boumerdès) ainsi que ceux des élevages de Khenchela et de Blida étaient réfractaires aux prélèvements nasals. En outre, pour des raisons de non disponibilité (absence) six partisans des élevages E<sub>3</sub>, E<sub>9</sub>, E<sub>11</sub>, E<sub>12</sub>, E<sub>22</sub> et E<sub>24</sub> n'étaient pas prélevés (**Tableau 9**).

**Tableau 9:** Echantillonnage professionnel et animal au sein des fermes visitées

Elevage	Tizi-Ouzou (A)																	Boumerdès (B)								Khenchela (C)					Blida (D)		Total	
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30	E31	E32	32	
Nb Prof-T <sup>L</sup>	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	3	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1	49	
Nb Prof-Pr	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	25	
Nb T <sup>L</sup> -Bv.	16	17	14	9	20	13	5	10	13	13	19	20	22	24	19	7	22	22	13	9	19	32	8	23	19	8	9	12	13	9	32	7	496	
Nb T <sup>L</sup> -V	9	9	8	5	8	9	5	6	8	6	8	9	9	8	10	5	14	10	5	5	11	9	5	15	10	6	8	7	10	6	22	5	270	
Nb V-Lac	7	8	8	4	8	8	5	5	7	5	5	8	9	8	7	5	7	9	3	3	9	8	5	11	7	6	8	5	10	6	16	2	222	

Prof-T<sup>L</sup>: Professionnels totaux, Prof-Pr : Professionnels prélevés, T<sup>L</sup>-Bv : Total bovins, T<sup>L</sup>-V : Total vaches, V-Lac : Vaches en lactation

### II.3.2. Enquête sur les mammites bovines au sein des élevages

#### II.3.2.1. Prévalence des mammites chez les vaches laitières

Les paramètres retenus pour la description de la prévalence des mammites chez les vaches laitières dans notre enquête sont reportés dans le **tableau 10**. Sur les 222 vaches en lactation concernées par cette étude, 116 ( $52,2 \pm 6,7$ ) vaches ont présenté au moins un quartier mammitieux. Ainsi, 218 ( $24,5 \pm 2,9$ ) quartiers mammitieux ont été recensés selon la distribution donnée par la **formule n°1**. De plus, 11 quartiers non fonctionnels ont été diagnostiqués chez 10 vaches, ces derniers ne sont qu'une indication d'une précédente infection intramammaire (**Tableau 11**).

*Fréquence des mammites :  $54x1Q + 36x2Q + 12x3Q + 14x4Q = 218$  quartiers (Formule1)*

**Tableau 10:** Prévalences cheptel, individuelle et quartier de mammites chez les vaches laitières

U.E	Dépistés	IIM (%)	Intervalle de confiance à 95%	Pr=Pa/p (%)
Fermes	32	31 (96,8)	--	--
Vaches	222	116 (52,2)	$52,2 \pm 6,7$	12,8
Quartiers	888	218 (24,5)	$24,5 \pm 2,9$	11,8

Infection intramammaire (IIM), Précision relative (Pr), Précision absolue (Pa), Prévalence (p)

#### II.3.2.2. Distribution clinique et subclinique des mammites chez les vaches

La prévalence individuelle des mammites cliniques est de 6,3% (14/222) ; les 29 cas cliniques ont concerné 29 quartiers de 14 vaches. La distribution de nombre de quartiers ayant une mammitie clinique chez les vaches est donnée par la **formule n°2**. Les mammites subcliniques ont touché 45,9% (189/222) des vaches. La distribution de nombre de quartiers atteints par une mammitie subclinique par vaches est indiquée par la **formule n°3**.

*Fréquence clinique :  $6x1Q + 4x2Q + 1x3Q + 3x4Q = 29$  quartiers (Formule 2)*

*Fréquence subclinique :  $48x1Q + 32x2Q + 11x3Q + 11x4Q = 189$  quartiers (Formule 3)*

**Tableau 11 :** Prévalence quartier et individuelle des mammites chez les vaches visitées

U.E	Dépistés	Q. atrophie		Mammites subcliniques		Mammites cliniques		Total
		Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	
<b>Vaches</b>	222	10	4,50	102	45,9	14	6,3	116
<b>Quartiers</b>	888	11	1,23	189	21,3	29	3,2	218

U.E. Unité épidémiologique

### II.3.2.3. Facteurs de variation de la prévalence

#### II.3.2.3.1. Variations géographiques de la prévalence

L'étude des variations géographiques de la prévalence des mammites dans notre enquête a ciblé quatre wilayas d'Algérie : Tizi-Ouzou (A), Boumerdès (B), Khenchela (C) et Blida (D). Bien que les prévalences individuelles enregistrées en fonction des régions soient homogènes ( $P=0,126$ ), l'hétérogénéité très significative ( $P<0,00001$ ) de l'échantillonnage, à l'origine de grandes disparités des précisions relatives des investigations régionales, pourraient constituer un risque de biais majeur vis-à-vis de l'effet région sur la prévalence individuelle et quartier des mammites dans notre étude (**Tableau 12, 13**).

**Tableau 12** : Variations géographiques de la prévalence **individuelle** des mammites

Wilaya	Vaches	IIM	%	I.C à 95%	Pr=Pa/p (%)	P
A	114 <sup>a</sup>	57	50,0 <sup>a</sup>	50,0 ± 06,5	13,0	<b>0,126</b>
B	55 <sup>b</sup>	30	52,6 <sup>a</sup>	52,6 ± 11,7	22,1	
C	35 <sup>c</sup>	22	62,8 <sup>a</sup>	62,8 ± 15,0	23,9	
D	18 <sup>d</sup>	07	38,8 <sup>a</sup>	38,8 ± 23,1	59,7	
<b>Total</b>	<b>222</b>	<b>116</b>	<b>52,2</b>	<b>52,2 ± 06,7</b>	<b>12,8</b>	

A : Tizi-Ouzou, B : Boumerdès, C : Khenchela, D : Blida, Pr : Précision relative, Pa : Précision absolue, p : Prévalence

Comparativement à la prévalence individuelle qui s'avère homogène pour les différentes régions, la prévalence quartier des mammites au sein de la wilaya de Khenchela est significativement ( $P=0,0002$ ) élevée par rapport aux autres. Ceci indique que le nombre de quartiers atteint par vache dans les élevages situés à Khenchela est supérieur au rapport « quartiers atteints/vache » enregistré dans les autres wilayas (**Tableau 12, 13**).

**Tableau 13**: Variations géographiques de la prévalence **quartier** des mammites chez les vaches

Wilaya	Quartiers	IIM	%	I.C à 95%	Pr=Pa/p (%)	P
A	456 <sup>a</sup>	104	22,8 <sup>a</sup>	22,8 ± 3,9	17,2	<b>0,0002</b>
B	220 <sup>b</sup>	41	18,6 <sup>a</sup>	18,6 ± 5,2	28,2	
C	140 <sup>c</sup>	62	<b>44,2<sup>b</sup></b>	44,2 ± 8,4	19,0	
D	72 <sup>d</sup>	11	15,3 <sup>a</sup>	15,3 ± 8,5	55,4	
<b>Total</b>	<b>888</b>	<b>218</b>	<b>24,5</b>	<b>24,5 ± 2,9</b>	<b>11,8</b>	

A : Tizi-Ouzou, B : Boumerdès, C : Khenchela, D : Blida, Pr : Précision relative, Pa : Précision absolue, p : Prévalence

**II.3.2.3.2. Variations inter-cheptels de la prévalence des mammites**

Le **tableau 14** montre qu'environ 97% (31/32) des élevages visités ont exposé au minimum un cas d'infection intramammaire. La survenue des cas de mammite clinique a été observée dans 34,7% (11/32) des élevages examinés. De nos élevages ayant de 2 à 16 vaches en lactation, on peut noter une prévalence individuelle de mammite de 52,2%, avec une variation intra-cheptel allant de 0 à 100%. Ainsi, la totalité des vaches appartenant aux élevages E<sub>19</sub>, E<sub>20</sub>, E<sub>23</sub>, E<sub>30</sub> et E<sub>32</sub> ont exhibé au minimum un quartier mammiteux.

**Tableau 14:** Variations de la survenue intra-cheptel des mammites clinique et subclinique au sein des élevages visités

Elv/ IIM	Tizi-Ouzou (A)																	Boumerdès (B)										Khenchela (C)					Blida(D)		Total
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30	E31	E32			
Nb V-																																<b>222</b>			
dépi	7	8	8	4	8	8	5	5	7	5	5	8	9	8	7	5	7	9	3	3	9	8	5	11	7	6	8	5	10	6	16	2			
Nb IIM+	1	4	1	0	6	6	4	4	2	4	3	6	3	3	4	4	2	5	3	3	4	4	5	1	5	3	1	4	8	6	5	2	<b>116</b>		
IIM %	14,3	50	12,5	00	75	75	80	80	28,5	80	60	75	33,3	37,5	57,1	80	28,5	55,5	100	100	44,4	50	100	9,1	71,4	50	12,5	80	80	100	31,2	100	<b>52,2</b>		
Nb MC.	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	3	0	2	0	0	1	0	1	0	0	<b>14</b>		
MC. %	00	00	00	00	00	12,5	00	00	00	20	20	00	00	12,5	00	20	00	11,1	00	33,3	00	00	60	00	28,5	00	00	20	00	16,7	00	00	<b>06,3</b>		

V-dépi : Vaches dépistées, IIM : Infection intramammaire, MC : Mammite clinique

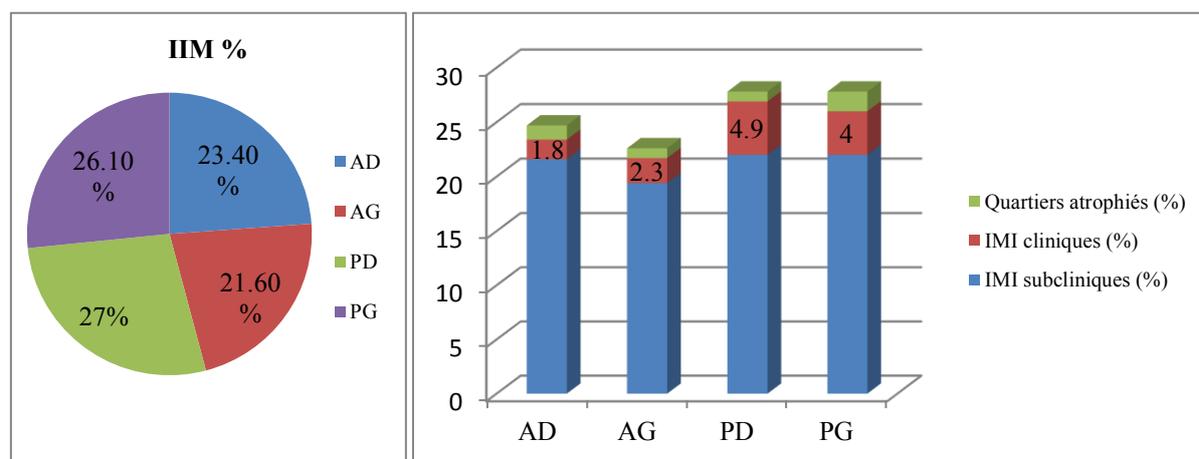
### II.3.2.3.3. Variations individuelles

L'effet de localisation de quartier sur la prévalence des mammites chez la vache est présenté dans le **tableau 15** et la **figure 24**. Au regard des résultats, il s'avère que tous les quartiers ont le même risque de contracter une mammite. Néanmoins la survenue des mammites cliniques est plus fréquente sur les quartiers postérieurs que les antérieurs.

**Tableau 15:** Variations inter-quartiers de la prévalence des mammites cliniques et subcliniques

Quartiers	Dépistés	Mammites		Mammites subcliniques		Mammites cliniques		Q. atrophies	
		Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%
AD	222	52	23,4 <sup>a</sup>	48	21,6	04	1,8	3	1,3
AG	222	48	21,6 <sup>a</sup>	43	19,4	05	2,3	2	0,9
PD	222	60	27,0 <sup>a</sup>	49	22,0	11	<b>4,9</b>	2	0,9
PG	222	58	26,1 <sup>a</sup>	49	22,0	09	<b>4,0</b>	4	1,8
<b>Total</b>	<b>888</b>	<b>218</b>	<b>24,5</b>	<b>189</b>	<b>21,3</b>	<b>29</b>	<b>3,2</b>	<b>11</b>	<b>1,2</b>

Q : Quartier, AD : antérieur droit, AG : antérieur gauche, PD : postérieur droit, PG : postérieur gauche



**Figure 24 :** Distribution inter-quartiers de la prévalence des types de mammites chez les vaches

## II.3.3. Analyse bactériologique et isolement de *S. aureus*

### II.3.3.1. Analyse bactériologique de lait mammitéux

#### II.3.3.1.1. Résultats globaux

Parmi les 218 quartiers étudiés, 21 (9,6%) se sont révélés bactériologiquement négatifs, 7 prélèvements sont contaminés et 190 (87,15%) quartiers sont infectés. Cent cinquante deux

quartiers (69,7%) ont permis l'isolement d'un seul germe et 38 quartiers (17,4%) deux germes (Tableau 16).

**Tableau 16:** Nombre des espèces bactériennes isolées par échantillon de lait mammitieux

Culture	Echantillons de lait	Pourcentage (%)
0 germe	21	09,6
1 germe	152	69,7
2 germes	38	17,4
≥ 3 germes	7	03,2
<b>Total</b>	<b>218</b>	<b>100</b>

### II.3.3.1.2. Impact des staphylocoques sur la santé de la mamelle chez la vache

A partir de 190 prélèvements de lait positifs, 228 isolats de bactéries seules ou associées ont été isolées. Elles se répartissent comme suit: 75 souches de staphylocoque à coagulase négative (32,9%), 65 souches de *S. aureus* (28,5%) et les 88 (38,6%) souches restantes étaient partagés entre des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif. Au regard de **Tableau 17**, il ressort que les staphylocoques (coagulase positive et coagulase négative) ont été incriminés seuls ou en association avec un autre germe dans 61,4% des cas de mammites dans cette investigation.

**Tableau 17 :** Fréquence d'isolement des bactéries des laits issus des quartiers mammitieux

Germes	SCN		<i>S. aureus</i>		ND		Total
	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	
<b>1 germe</b>	50	32,9	54**	35,5	48	31,6	152**
<b>2 germes</b>	25	32,9	11	14,4	40	52,6	76
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>32,9</b>	<b>65**</b>	<b>28,5</b>	<b>88</b>	<b>38,6</b>	<b>228**</b>

*Staphylococcus* coagulase négative (SCN), Non déterminé ou non identifié (ND) (mélange G+ et G-), \* deux souches différentes

### II.3.3.1.3. Prévalence de *S. aureus* en mammites des vaches laitières

Parmi les 31 cheptels, ayant présenté des cas de mammites, 23 (74,2%) ont montré au minimum une vache infectée par *S. aureus*. Ce dernier a été isolé dans 29,8% (65/218) des quartiers mammitieux chez 45 vaches. La fréquence d'isolement de *S. aureus* en fonction des vaches est donnée par **la formule n°4**. Deux quartiers ont montré une co-infection par deux souches distinctes de *S. aureus*. Dans un quartier l'antibiogramme a permis de distinguer deux profils de résistance, alors que deux types de colonies de formes distinctes ont été observés dans un autre quartier (**Tableau 18**).

**Tableau 18 :** Prévalences cheptel, individuelle et quartier de *S. aureus* responsable de mammites chez les vaches laitières

U.E	IIM	<i>S. aureus</i>	%	I.C. 95%	Pr=Pa/p (%)
Fermes	31	23	74,2	74,2 ± 15,7	21,8
Vaches	116	45	38,8	38,8 ± 09,1	23,3
Quartiers	218	65**	29,8	29,8 ± 06,2	20,8

Infection intramammaire (IIM), Précision relative (Pr), Précision absolue (Pa), Prévalence (p), \* deux types d'isolats dans un quartier

**Fréquence de *S. aureus* :**  $32x1Q + 7x2Q + 5x3Q + 1x4Q = 65$  quartiers (Formule 4)

#### II.2.3.1.4. Répartition de *S. aureus* dans les mammites cliniques et subcliniques

La culture bactérienne a intéressé 189 prélèvements de lait provenant de quartiers atteints de mammites subcliniques et 29 prélèvements issus de quartiers atteints de mammites cliniques. *Staphylococcus aureus* a été mis en cause dans 53 (28,04%) et 12 (41,37%) des quartiers ayant respectivement des mammites subcliniques et cliniques (**Tableau 19**).

**Tableau 19 :** Prévalence de *S. aureus* impliqué dans les mammites cliniques et subcliniques chez les vaches laitières

U.E	Dépistés	Mammites subcliniques				Mammites cliniques			
		Nb.	%	<i>S. aureus</i> +	%	Nb.	%	<i>S. aureus</i> +	%
Fermes	32	31	96,9	22	70,9	11	34,4	05	45,4
Vaches	222	102	45,9	39	17,5	14	06,3	06	02,7
Quartiers	888	189	21,3	53**	05,9	29	03,2	12	01,3

Unité épidémiologique (U.E) ; Prévalence (p) \*\* isolement de deux souches distinctes de *S. aureus*

#### II.3.3.2. Aspects descriptifs des mammites à *S. aureus* chez la vache

##### II.3.3.2.1. Prévalence des mammites à *S. aureus* chez les vaches laitières

Au regard du **tableau n°20** on note que, sur les 222 vaches en lactation concernées par cette étude, 45 (20,3% ± 5,4%) vaches ont présenté au moins un quartier atteint de mammite à *S. aureus*. Ainsi, 65 (07,3% ± 1,7%) quartiers atteints par *S. aureus* ont été recensés selon la distribution donnée par **la formule n°4**. Par ailleurs, *S. aureus* est incriminé dans 12 (1,3%) et 53 (5,9%) quartiers atteints respectivement de mammites cliniques et subcliniques (**Tableau 20**).

**Tableau 20 :** Prévalence cheptel, individuelle et quartier des mammites à *S. aureus* chez les vaches laitières

U.E	Dépistés	<i>S. aureus</i>	%	I.C. à 95%	Pr=Pa/p (%)
Fermes	32	23	71,9	71,9 ± 15,9	22,1
Vaches	222	45	20,3	20,3 ± 05,4	26,6
Quartiers	888	65**	07,3	07,3 ± 01,7	23,9

Unité épidémiologique (U.E), Précision relative (Pr), Précision absolue (Pa), Prévalence (p)

### II.3.3.2.2. Variations géographiques de la prévalence

Vu la grande disparité de nombre des échantillons collectés, les résultats des variations géographiques de la prévalence quartier des mammites à *S. aureus* ont été interprétés avec prudence. En tenant compte de ces variations d'échantillonnage, la prévalence pourrait varier de 1% à 13% dans les élevages de Blida.

**Tableau 21:** Variations géographique de la prévalence des mammites à *S. aureus*

Wilaya	Quartiers	<i>S. aureus</i> +	Taux (%)	I. C à 95%	Pr=Pa/p (%)
A	456	35	7,6	[5,1-10,1]	32,6
B	220	22 *	10	[06- 14]	40,4
C	140	05 *	3,5	[02- 10]	--
D	72	01	1,4	[01-13]	--
<b>Total</b>	<b>888</b>	<b>65 **</b>	<b>7,3</b>	<b>07,3 ± 1,7</b>	<b>23,9</b>

\* : Isolement de deux souches distinctes de *S. aureus*, A : Tizi-Ouzou, B : Boumerdès, C : Khenchela, D : Blida

### II.3.3.3. Analyse de risque de mammites à *S. aureus* dans les élevages

#### II.3.3.3.1. Description des facteurs retenus

L'étude des facteurs de variation de la prévalence des mammites à *S. aureus* chez la vache, a montré une prévalence de mammites à *S. aureus* significativement élevée chez les vaches allaitantes par rapport aux vaches laitières. De plus, bien qu'une fréquence de survenue des mammites soit significativement élevée chez les vaches de plus de sept mois de lactation, la prévalence de *S. aureus* reste similaire à celle enregistrée dans les autres mois de lactation (**Tableau 22**).

**Tableau 22:** Description des facteurs de risque potentiels associés aux mammites à l'échelle vache

Facteurs de risque	Catégories	Nb. vaches	IIM		Infection à <i>S. aureus</i>	
			Nb <sup>+</sup> (%)	Nb <sup>-</sup> (%)	Nb <sup>+</sup> (%)	Nb <sup>-</sup> (%)
Type d'élevage	Laitier	129	61(47,3) <sup>a</sup>	68 (52,7)	18 (13,9) <sup>a</sup>	111 (86,1)
	Allaitant	93	55(59,1) <sup>a</sup>	38 (40,9)	27 (29,0) <sup>b</sup>	66 (71,0)
Système d'élevage	Intensif	76	35 (46,0) <sup>a</sup>	41(54,0)	13 (17,1) <sup>a</sup>	63 (82,9)
	Semi-extensif	146	81 (55,5) <sup>a</sup>	65 (44,5)	32 (21,9) <sup>a</sup>	114 (78,1)
Séparation des veaux	Oui	118	52 (44,1) <sup>a</sup>	66 (53,9)	26 (22,0) <sup>a</sup>	92 (78,0)
	Non	104	64 (61,5) <sup>a</sup>	40 (38,5)	19 (18,3) <sup>a</sup>	85 (81,7)
Type de traite	Manuel	71	42 (59,1) <sup>a</sup>	29 (40,9)	24 (33,8) <sup>a</sup>	48 (66,2)
	Mécanique	151	74 (49,0) <sup>a</sup>	77 (51,0)	21 (13,9) <sup>a</sup>	130 (86,1)
Nombre de trayeurs	Un	56	34 (60,7) <sup>a</sup>	22 (39,3)	16 (28,5) <sup>a</sup>	40 (71,5)
	Deux	40	22 (55,0) <sup>a</sup>	18 (45,0)	11 (27,5) <sup>a</sup>	29 (72,5)
	Trois	126	60 (47,6) <sup>a</sup>	66 (52,4)	18 (14,3) <sup>a</sup>	108 (85,7)
Intrants récents	Oui	123	63 (51,2) <sup>a</sup>	60 (48,8)	22 (17,9) <sup>a</sup>	101(82,1)
	Non	99	53 (53,5) <sup>a</sup>	46 (46,5)	23 (23,2) <sup>a</sup>	76 (76,8)
Nombre de parités	1 <sup>ere</sup>	51	32 (62,7) <sup>a</sup>	19 (37,3)	9 (17,6) <sup>a</sup>	42 (82,4)
	2 <sup>eme</sup>	51	27 (52,9) <sup>a</sup>	24 (47,1)	10 (19,6) <sup>a</sup>	41 (80,4)
	3 <sup>eme</sup>	40	20 (50,0) <sup>a</sup>	20 (50,0)	7 (17,5) <sup>a</sup>	33 (82,5)
	4 <sup>eme</sup>	47	20 (42,5) <sup>a</sup>	27 (57,5)	8 (17,0) <sup>a</sup>	39 (83,0)
	≥ 5 <sup>eme</sup>	33	17 (51,5) <sup>a</sup>	16 (58,5)	11 (33,3) <sup>a</sup>	22 (66,7)
Stade de lactation	1-2 mois	36	22 (61,1) <sup>a</sup>	14 (38,9)	11 (30,5) <sup>a</sup>	25 (69,5)
	3-4 mois	76	34 (44,7) <sup>a</sup>	42 (55,3)	12 (15,8) <sup>a</sup>	42 (84,2)
	5-6 mois	75	34 (45,3) <sup>a</sup>	41 (54,7)	15 (20,0) <sup>a</sup>	60 (80,0)
	7-9 mois	35	26 (74,3) <sup>b</sup>	9 (25,7)	7 (20,0) <sup>a</sup>	28 (80,0)

La présence de deux lettres différentes indique une différence significative de la prévalence ( $P > 0,05$ ) ; **IIM** : infections intramammaires

### II.3.3.3.2. Facteurs de risque potentiels associés aux mammites

Le modèle multi-variable final de la régression logistique combinatoire montre une association de la survenue des mammites (clinique et subclinique) bovines et les différents facteurs de risque potentiels. Une variation significative de la prévalence des mammites a été observée en fonction du stade de lactation et de la séparation vache-veau. En effet, les vaches dont les veaux sont séparés de leurs mères ont un risque réduit d'être atteintes de mammites comparativement aux vaches issues des élevages sans séparation (OR=0,164 ;  $P < 0,001$  ; 95% IC=0,056 ; 0,477) et les vaches en troisième et quatrième mois de lactation sont moins sujettes aux mammites en comparaison aux autres (OR=0,371 ;  $P = 0,044$  ; 95% IC=0,141; 0,976) (**Tableau 23**).

**Tableau 23:** Dernière étape de la régression logistique combinatoire relativement aux mammites bovines (les facteurs étaient éliminés un par un jusqu'à la constitution de meilleur modèle)

	95% I.C pour OR					
	Estimateur	E.S.	Sig.	OR	Limite inférieure	Limite supérieure
<b>Facteurs</b>	2,146	0,635	<0,001***			
<b>Lactation 1-2 mois (référence)</b>				1		
<b>Lactation 3-4 mois</b>	-0,991	0,493	<b>0,044*</b>	0,371	0,141	0,976
<b>Lactation 5-6 mois</b>	-0,779	0,485	0,161	0,459	0,177	1,186
<b>Lactation 7-9 mois</b>	0,598	0,610	0,510	0,818	0, 550	6,012
<b>Séparation des veaux Non (référence)</b>				1		
<b>Séparation des veaux Oui</b>	-1,809	0,545	<b>&lt;0,001***</b>	1,164	0,056	0,477

E.S. : Erreur standard, Sig : significativité, OR : Odds Ratio

### II.3.3.3. Facteurs de risque potentiels associés aux mammites à *S. aureus*

La dernière étape de la régression logistique combinatoire sur les animaux ayant une infection intramammaire à *S. aureus* a indiqué que les facteurs intrinsèques et extrinsèques retenus dans notre analyse sont associés à l'infection. Ainsi, le risque d'être infecté par *S. aureus* diminue significativement quand les veaux étaient séparés des adultes (OR=0,208; P<0,001; 95% IC=0,084; 0,516). Un effet protecteur lié au stade de lactation a été observé chez les vaches en troisième et quatrième mois de lactation (OR=0,323; P=0,041; 95% IC=0,110; 0,955) (**Tableau 24**). Bien que l'infection à *S. aureus* ne montre pas d'association significative (P=0,08) au type d'élevage, ce dernier a été inclus dans le modèle pour éviter la détérioration de celui-ci. En effet, les élevages allaitants ont plus de risque (OR=2,072) de contracter la mammite à *S. aureus* que les vaches laitières. Ce constat vient d'appuyer l'effet protecteur de la séparation des veaux de leurs mères vis-à-vis de la mammite à *S. aureus* chez les vaches.

**Tableau 24:** Dernière étape de la régression logistique combinatoire relativement à l'infection par *S. aureus* (les facteurs étaient éliminés un par un jusqu'à la constitution de meilleur modèle)

Facteurs	95% I.C pour OR					
	Estimateur	E.S.	Sig.	OR	Limite inférieure	Limite supérieure
<b>Lactation 1-2 mois (référence)</b>				1		
<b>Lactation 3-4 mois</b>	-1,128	0,552	<b>0,041*</b>	0,323	0,110	0,955
<b>Lactation 5-6 mois</b>	-0,742	0,529	0,161	0,476	0,169	1,342
<b>Lactation 7-9 mois</b>	0,417	0,633	0,510	0,659	0, 190	2,277
<b>Elevage laitier (référence)</b>				1		
<b>Elevage allaitant</b>	0,728	0,416	0,080	2,072	0,916	4, 686
<b>Séparation des veaux Non (référence)</b>				1		
<b>Séparation des veaux Oui</b>	-1,569	0,463	<b>&lt;0,001***</b>	0,208	0,084	0,516

E.S. : Erreur standard, Sig : significativité, OR : Odds Ratio

### II.3.3.4. Portage nasal de *S. aureus* chez les professionnels

Seuls les professionnels ayant un contact étroit avec les animaux sont inclus dans notre étude. Quarante-neuf (38%) individus sont révélés porteurs nasals de *S. aureus*. Soit, 42 de sexe masculin et 7 de sexe féminin, avec une moyenne d'âge de 36,4 (19 à 74) ans et une durée moyenne d'activité professionnelle en contact avec les animaux de 12,5 (1 à 50) ans. Il convient de signaler qu'un professionnel s'est avéré porteur de deux types de souches de *S. aureus*. Le **tableau 25**, ci-dessous, ne montre pas de différence significative (P=0,219) de la fréquence de portage nasal de *S. aureus* en fonction des différentes catégories de contacts professionnels avec les animaux.

**Tableau 25:** Distribution de la prévalence de *S. aureus* en fonction de type de contact professionnel

Catégorie Contacte	Individus		Porteurs de <i>S. aureus</i>		Non porteurs		P
	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	
<b>Cat A</b>	<b>41<sup>ab</sup></b>	31,8	19*	46,3	22	53,7	
<b>Cat B</b>	63 <sup>a</sup>	48,8	22	34,9	41	65,1	<b>0,219</b>
<b>Cat C</b>	25 <sup>b</sup>	29,3	08	32,0	17	68,0	
<b>Total</b>	<b>129</b>	<b>100</b>	<b>49*</b>	<b>38,0</b>	<b>80</b>	<b>62,0</b>	

\* : Deux souches distinctes sur un même prélèvement ; **Cat A** : individus ayant un contact étroit et permanent avec les animaux de même élevage (éleveurs et zootechniciens) ; **Cat B** : Personnes ayant un contact étroit avec différentes exploitations (vétérinaires cliniciens) ; **Cat C** : les ouvriers des abattoirs

II.3.3.5. Isolement de *S. aureus* au niveau des fermes

Soixante-douze pour cent (23/32) des élevages visités présentaient une infection intramammaire due à *S. aureus*.

**Tableau 26:** Prévalence et fréquence d'isolement de *S. aureus* des cas laits mammiteux et en portage nasal chez les éleveurs

Fermes	Professionnels			Echantillon animal										
				Plan individuel						Plan quartier				
	Nb	Prv	SA+	T <sup>1</sup>	V	VL	M	MC	SA+	Nb	M	MC	AT	SA+
A01	1	1	1	16	9	7	1	--	--	28	2	--	--	--
A02	1	1	1	17	9	8	4	--	2	32	6	--	--	4
A03	2	1	1	14	8	8	1	--	--	32	2	--	--	--
A04	1	1	--	9	5	4	0	--	--	16	0	--	--	--
A05	1	1	--	20	8	8	6	--	2	32	14	--	--	5
A06	2	2	2	13	9	8	6	1	--	32	10	3	2	--
A07	1	1	1*	5	5	5	4	--	--	20	5	--	--	--
A08	1	1	--	10	6	5	4	--	3	20	5	--	1	3
A09	2	1	1	13	8	7	2	--	2	28	7	--	--	6
A10	2	2	2	13	6	5	4	1	2	20	6	1	--	2
A11	3	2	1	19	8	5	3	1	2	20	6	4	--	4
A12	2	1	--	20	9	8	6	--	1	32	9	--	1	2
A13	1	1	--	22	9	9	3	--	1	36	4	--	3	1
A14	1	1	1	24	8	8	3	1	--	32	5	1	--	--
A15	1	1	--	19	10	7	4	--	3	28	8	--	--	3
A16	2	--	--	7	5	5	4	1	2	20	10	2	--	3
A17	2	--	--	22	14	7	2	--	1	28	5	--	--	2
B01	1	1	1	20	10	9	5	1	2	36	7	2	--	2
B02	1	1	1	13	5	3	3	--	2	12	3	--	--	2
B03	1	--	--	9	5	3	3	1	2	12	6	4	--	5
B04	2	--	--	19	11	9	4	--	4	36	6	--	--	5
B05	2	1	1	32	9	8	4	--	3	32	5	--	--	3
B06	1	1	1	8	5	5	5	3	1	20	7	4	--	1
B07	2	1	1	23	15	11	1	--	--	44	1	--	1	--
B08	2	2	--	19	10	7	5	2	3	28	6	2	--	4*
C01	1	--	--	8	6	6	3	--	2	24	6	--	--	3
C02	2	--	--	9	8	8	1	--	--	32	2	--	--	--
C03	1	--	--	12	7	5	4	1	1	20	6	2	--	1
C04	2	--	--	13	10	10	8	--	2	40	30	--	--	2*
C05	2	--	--	9	6	6	6	1	1	24	18	4	--	1
D01	2	--	--	32	22	16	5	--	--	64	9	--	1	--
D02	1	--	--	7	5	2	2	--	1	8	2	--	--	1
<b>T<sup>1</sup></b>	<b>49</b>	<b>25</b>	<b>16*</b>	<b>496</b>	<b>270</b>	<b>222</b>	<b>116</b>	<b>14</b>	<b>45</b>	<b>888</b>	<b>218</b>	<b>29</b>	<b>11</b>	<b>65**</b>

Nb : Nombre, Prv : Prélèvements, SA : *S. aureus*, V : vaches, VL : vaches en lactation, M : Mammite, MC : Mammite clinique, AT : Atrophie

\* : quartiers ayant de souches distinctes de *S. aureus*

*Staphylococcus aureus* a été isolé dans 65 échantillons de lait issus des quartiers mammiteux de 45 vaches distinctes. Sur les 67 souches isolées, une fréquence d'implication d'une souche à six

a été notée chez les élevages ayant des mammites à *S. aureus*. Chez les éleveurs, 64 % (16/25) individus étaient révélés porteurs nasals de *S. aureus*. Les 17 souches de *S. aureus* issues du portage nasal professionnel dépendaient de 14 élevages distincts (**Tableau 26**).

### II.3.3.6. Origine géographique des souches de *S. aureus* isolées

Dans notre étude, 117 souches de *S. aureus* ont été isolées chez 49 personnes ayant un contact étroit avec les animaux et 65 laits mammitieux issus de 45 vaches. Les souches isolées étaient dérivées principalement des wilayas de Tizi-Ouzou, Boumerdès et Alger avec des fréquences de 51,2% (60/117), 24,8% (29/117) et 11,9% (14/117) respectivement. Le reste des souches (12%) est issu des wilayas de Khenchela, El-Bayadh et Blida (**Tableau 27**).

**Tableau 27** : Origine géographique des souches *S. aureus* isolées en mammitite et portage

Région	Wilaya	Animaux			Professionnels			Total
		Fermes	Vaches	Quartiers	Cat A	Cat B	Cat C	
Nord	A	11	21	35	11*	13	--	24*
centre	B	7	17	22*	5	1	--	6
	D	1	1	1	--	3	--	3
	E	--	--	--	5	1	8	14
Steppe	C	4	6	7*	--	0	--	0
	F	--	--	--	--	2	--	2
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>23</b>	<b>45</b>	<b>65**</b>	<b>21*</b>	<b>20</b>	<b>8</b>	<b>49*</b>

Tizi-Ouzou (A), Boumerdès (B), Khenchela (C), Blida (D), Alger (E), El-Bayadh (F), Catégorie (Cat)

### II.3.4. Résistance aux antibiotiques et typage moléculaire

#### II.3.4.1. Résistance aux antibiotiques

Au regard de **tableau n°29**, quatre souches humaines ont montré une résistance à la méticilline, alors que le reste des souches (humain 46 ; animal 67) sont sensibles. La résistance à la pénicilline est largement détectée et ce, en proportions qui ne diffèrent pas significativement entre les souches humaines (46/50, 92% incluant les 4 SARM) et animales (58/67, 86,5%). Trente-sept souches (humaine : 24/50, 48% ; bovine : 13/67, 19,4%) sont résistantes contre au moins un antibiotique non- $\beta$ -lactamine, toutefois des différences significatives ( $P < 0,05$ ) sont notées entre les souches humaines et animales. Les différences de résistance sont associées à la tétracycline, l'érythromycine, la clindamycine et la kanamycine respectivement (des niveaux élevés de résistance sont observés parmi les souches humaines).

**Tableau 28:** Fréquence de résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus* humaines et bovines

Agents antimicrobiens	Humain (n = 50)		Animal (n = 67)		Valeur de P
	Nb. des isolats	%	Nb. des isolats	%	
Pénicilline	46	92,0	58	86,5	<i>NS</i>
Oxacilline	4	8,0	0	0,0	
Céfoxitine	4	8,0	0	0,0	
Gentamycine	0	0,0	0	0,0	
Kanamycine	9	18,0	1	1,5	< 0,05
Erythromycine	16	32,0	3	4,5	< 0,05
Clindamycine	9	18,0	2	3,0	< 0,05
Pristinamycine	0	0,0	0	0,0	
Ofloxacine	0	0,0	0	0,0	
Vancomycine	0	0,0	0	0,0	
Teicoplanine	0	0,0	0	0,0	
Chloramphénicol	0	0,0	0	0,0	
Cotrimoxazole	0	0,0	0	0,0	
Fosfomycine	0	0,0	0	0,0	
Tétracycline	21	42,0	10	14,9	<0,05
Acide fusidique	1	2,0	1	1,5	<i>NS</i>
Rifampicine	0	0,0	0	0,0	
Mupirocine	0	0,0	nt	nt	nt

*NS* : non significatif ; nt : non testées

#### II.3.4.2. Profils de résistance aux antibiotiques

Tel que présenté dans le **tableau 29**, seulement dix souches de *S. aureus* (humain 2 ; 8 vaches) étaient sensibles à tous les antibiotiques testés, alors que les 107 isolats restants étaient résistants au moins à un des antibiotiques. Notre analyse par ailleurs, a révélé que 34/117 (29%) des isolats étaient résistants à plus de deux antibiotiques, mais en proportions qui diffèrent significativement ( $P < 0,05$ ) entre les souches humaines (46%) et les souches animales (16,4%). Parmi les quinze profils de résistance caractérisés, une diversité élevée est associée aux souches issues de portage nasal des professionnels. Quatre profils de résistance identiques ont été détectés chez les souches animales et humaines. Au regard des résistances des souches de mammites, le profil PEN était détecté chez 18/23 (78,2%) des fermes infectées alors que les autres profils sont rares, Au minimum deux profils de résistance étaient isolés dans 9 élevages. Plus de deux profils de résistance étaient retrouvés chez 4 vaches dont [PEN] et [PEN, ERY, CLI, TET] co-infectaient le un même quartier.

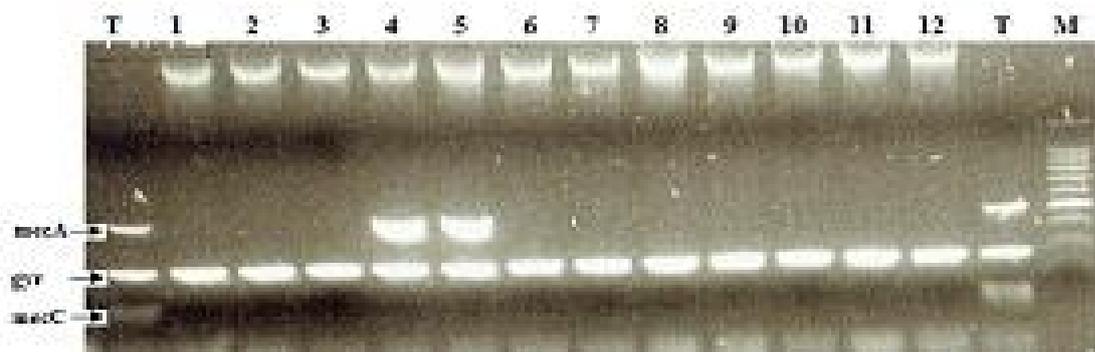
**Tableau 29** : Profils de résistance des souches *S. aureus* isolées des professionnels et de mammmites bovines

Profils de résistance	<i>mecA</i>	<i>mecC</i>	Total ( <i>n</i> = 117)	Isolats humains ( <i>n</i> = 50)	Isolats de mammmites ( <i>n</i> = 67)		
					Nb. des isolats	Nb. de fermes	Fermes
PEN, OXA, ERY, CLI, KAN, TET	+	-	2	2	0	0	--
PEN, OXA, ERY, CLI, TET	+	-	2	2	0	0	--
PEN, ERY, CLI, KAN, TET	-	-	3	3	0	0	--
PEN, ERY, CLI, TET	-	-	4	2	2	2	B8, D2
PEN, ERY, KAN, TET	-	-	3	3	0	0	--
PEN, ERY, FU	-	-	1	0	1	1	B2
PEN, ERY, TET	-	-	3	3	0	0	--
PEN, KAN, TET	-	-	1	1	0	0	--
PEN, FU	-	-	1	1	0	0	--
PEN, TET	-	-	12	4	8	5	A5, A11, A12, A16, C1
PEN, ERY	-	-	1	1	0	0	--
PEN	-	-	71	24	47	18	A2, A5, A9, A10, A11, A15, A16, A17, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B8, C3, C4, C5
TET	-	-	2	2	0	0	--
KAN	-	-	1	0	1	1	A9
SENSIBLE	-	-	10	2	8	6	A8, A13, A15, B1, B3, B8

\*PEN, pénicilline ; OXA, oxacilline ; ERY, érythromycine; CLI, clindamycine; KAN, kanamycine; TET, tétracycline; FU, acide fusidique

<sup>b</sup> A, Tizi-Ouzou; B, Boumerdès; C, Khenchela, D, Blida

Les souches humaines résistantes à la méticilline possédaient un *mec* complexe A, *SCCmec* IV et des résistances vis-à-vis de l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline. La résistance à la kanamycine est observée pour deux souches SARM.

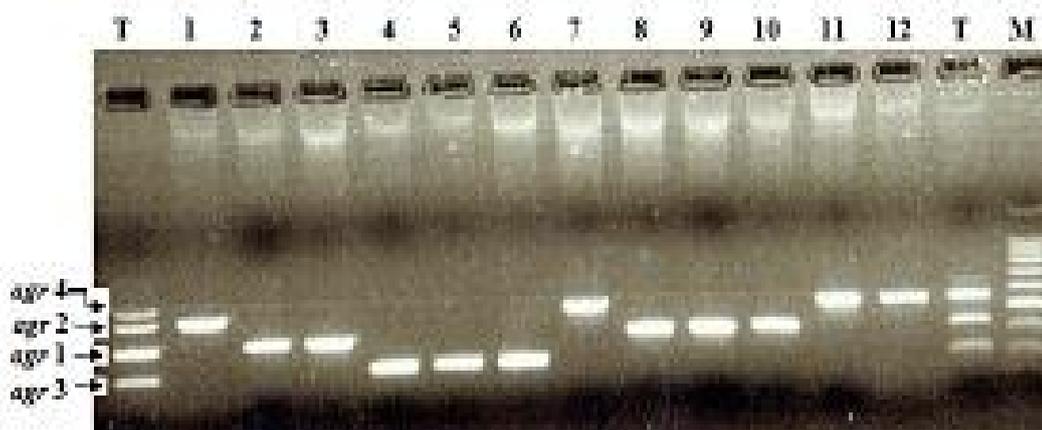


**Figure 25:** Electrophorèse sur gèle d’agarose des amplifiats de PCR des gènes *mecA*, *mecC* et *gyr* chez les souches *S. aureus* issues des professionnels. Voie M : 100 pb échelle ADN. Voie T : contrôle positif avec *mecA*, *mecC* et *gyr*.

**Note :** sur la figure toutes les souches sont confirmées *S. aureus* alors que les souches appartenant aux colonnes 4 et 5 sont porteuses de gènes *mecA*

### II.3.4.3. Allèles des gènes accessoires de régulation (*agr*)

L’analyse de polymorphisme de gène *agrD* a montré que les 117 souches *S. aureus* liées à l’environnement de bétail pourraient être assignées à l’un des quatre principaux groupes *agr* (**Figure, 26**). Quarante-et-onze (77,7%) avaient un allèle *agr* groupe1, 11 (11,9%) groupe 2, 10 (8,5%) groupe 3 et 2 (1,7%) groupe 4. L’allèle *agr* groupe 4 n’est pas retrouvé dans les souches bovines (**Tableau 30**).



**Figure 26:** Analyse des produits de PCR pour l’identification des groupes spécifiques d’*agr* à partir des souches *S. aureus* issues des professionnels. Voie M : 100 pb échelle ADN. Voie T : contrôle positif avec *agr1*, *agr2*, *agr3* et *agr4*.

**Tableau 30:** Fréquence des allèles *agr* chez les souches *S. aureus* isolées chez les professionnels et de mammites bovines

Allèles <i>agr</i>	Nb. des allèles <i>agr</i> (%)		Nb. des allèles <i>agr</i> (%)	
	Total	Isolats humains	Isolats animaux	Nbr. de fermes
<i>agr</i> 1	91 (77,7)	30 (60)	61 (91,0)	22 (95,6)
<i>agr</i> 2	14 (11,9)	09 (18)	05 (07,4)	05 (21,7)
<i>agr</i> 3	10 (08,5)	09 (18)	01 (01,4)	01 (04,3)
<i>agr</i> 4	02 (01,7)	02 (04)	00 (00,0)	00 (00,0)
Total	117 (100)	50 (100)	67 (100)	23 (100)

L'allèle *agr* groupe 1 est largement diagnostiqué et en proportions qui ne diffèrent pas significativement entre les souches humaines (30/50, 60%) et animales (61/67, 91%). L'allèle *agr* groupe 1 était perçu dans 22 des 23 (95,6%) fermes positives à *S. aureus*. Il coexistait avec d'autres groupes *agr* dans : cinq élevages, une mamelle, un même quartier (PEN, *agr* 1 et PEN, *agr* 2) et dans une même gîte nasale (PEN, *agr* 4 et PEN, ERY, CLI, KAN, TET, *agr* 1). Enfin, deux profils distincts de résistance [PEN] et [PEN, ERY, CLI, TET] portant l'allèle *agr*1 ont été isolés d'un seul et même quartier.

#### II.3.4.4. Typage de la protéine A (Typage de *spa*)

##### II.3.4.4.1. Composition en génotypes (types-de-*spa*)

Le typage-de-*spa* a été réalisé sur 117 souches de *S. aureus* issues des infections intramammaires des vaches et de portage nasal des professionnels ayant un contact étroit avec les animaux. Quarante-huit types-de-*spa* distincts et trois génotypes non typables ont été identifiés; ceci a donné un niveau de typabilité de 97,4%. Une diversité élevée des types-de-*spa* (n=35) était détectée parmi les 50 isolats de *S. aureus* issus des professionnels que des 67 isolats dérivés des bovins. Ces derniers ont montré 18 types-de-*spa* distincts. Parmi les 23 élevages présentant des cas de mammites à *S. aureus*, divers types-de-*spa* étaient isolés dans un maximum de cinq par troupeau. Plus d'un type-de-*spa* étaient détectés dans 11 fermes, 7 pis et dans un même quartier (t903 et t223). Le génotype t223 en effet, était responsable de mammites bovines dans 11 troupeaux. Enfin, les génotypes t223, t267, t127 et t903 ont été détectés dans le lait et en portage nasal chez les professionnels (**Tableau 31**).

Tableau 31 : Diversité des types-de-*spa* en fonction de leurs clusters

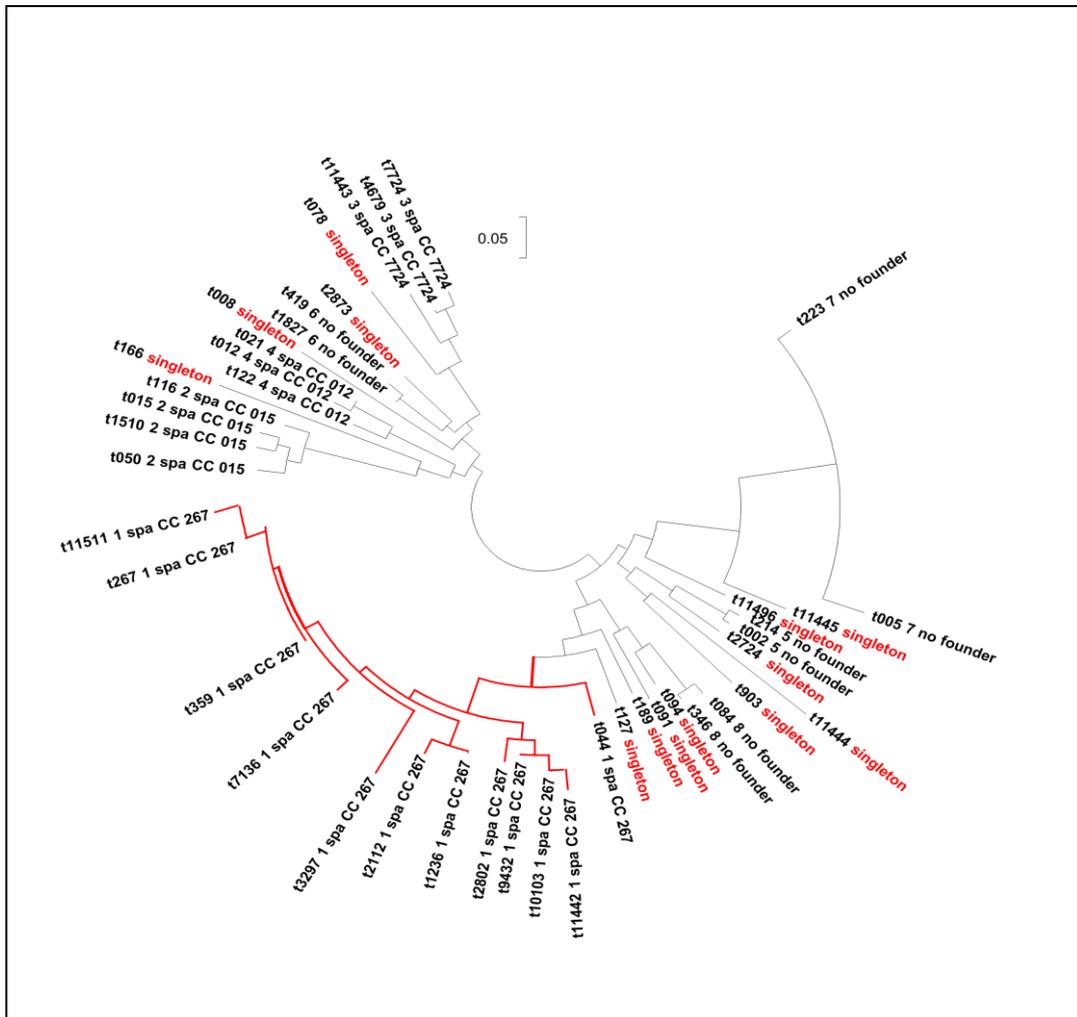
	<i>Cl/spa</i> CC	<i>spa</i> t	<i>spa repeats</i>	Mastitis isolates		Human isolates (No)
				No	No of herds	
	7/NA	1223	26-23-13-23-05-17-25-17-25-16-28	27	11	7
		1005	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28	0	0	2
	Singleton	111445	26-13-17-25-16-28	0	0	1
	Singleton	111496	26-23-34-33-34	1	1	0
	5/NA	1214	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16-16	0	0	1
		1002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	0	0	1
	Singleton	12724	26-17-34-20-17-12-17-16	0	0	1
	Singleton	111444	14-44-12-17-17-23-44-13-13	0	0	1
	8/NA	1903	26-22-19-17-17-20-17-12	1	1	1
		184	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23	0	0	2
	Singleton	1346	07-23-12-34-12-12-23-02-12-23	0	0	1
	Singleton	194	07-23-12-34-34-12-12-23	0	0	1
	Singleton	191	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23	0	0	1
	Singleton	1189	07-23-12-21-17-34	1	1	0
	Singleton	1127	07-23-21-16-34-33-13	1	0	1
	1/CC 267	144	07-23-12-34-34-33-34	0	0	2
		110103	26-23-21-17-34-34-34-33-34	0	0	3
		111442	26-23-21-17-34-34-34-34-34-33-34	0	0	1
		19432	26-23-21-17-34-34-34-33-34	0	0	1
		12802	07-23-21-17-34-34-34-33-34	0	0	1
		11236	26-23-12-21-17-34-34-34-33-34	4	2	0
		12112	26-23-12-21-17-34-34-34-33-34	1	1	0
		13297	14-12-21-17-34-34-34-33-34	3	2	0
		17136	07-23-12-21-21-17-34-34-33-34	7	3	0
		1359	07-23-12-21-17-34-34-33-34	6	5	0
		1267	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34	4	2	2
		111511	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34-34-33-34	1	1	0
			2/CC015	150	08-16-02-16-34-34-17-34-16-34	0
11510	08-16-02-16-34-13-17-34-16-13			0	0	1
115	08-16-02-16-34-13-17-34-16-34			0	0	1
1116	08-16-02-16-13-13-17-34-16-34			0	0	1
1166	04-44-33-31-12-16-34-16-12-25-22-34			0	0	1
	4/CC12	1122	08-16-02-16-02-25-17-24-24	0	0	1
		112	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24	0	0	1
		121	15-12-16-02-16-02-25-17-24	0	0	1
	Singleton	1008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	1	1	0
	6/NA	11827	15-12-17-24-24	0	0	1
		1419	15-12-17-24-24-24	0	0	1
		12873	04-20-17-31-24	2	2	0
	Singleton	178	04-21-12-41-20-17-12-12-17	2	1	1
	3/CC7724	111443	04-20-17-12-17-17-17-17-17	0	0	1
		14679	04-13-20-17-12-17-17	0	0	1
		17724	04-13-20-17-12-17-17-17	0	0	2
		1232	04-17-17	0	0	1
		1529	04-34	1	1	0
	Excluded	11109	07-33-34	1	1	0
		12152	08-21-17-34	0	0	1
		111495	04-17-24	1	1	0
	ND	NT		2	2	1
<b>Total</b>				<b>67</b>	<b>23</b>	<b>50</b>

ND: Non determined ; NT: Non typeable

#### II.3.4.4.2. Regroupement des souches de *S. aureus* selon les types-de-*spa*

Toutes les souches *spa* typables avaient de 2 à 13 répétitions. Le code numérique des types-de-*spa* a été assigné suivant l'interprétation des motifs de répétition. Or, les types-de-*spa* similaires ont été assortis dans un cluster ; chaque cluster montrait le rapport évolutif entre les souches de *S. aureus*. Cinq types-de-*spa* ayant moins de 4 motifs de répétition ont été exclus. Ainsi, les

isolats ont été groupés dans huit clusters et dix-huit singletons suivant leurs types-de-*spa* (Figure 27).



**Figure 27:** Arbre phylogénétique des souches animale et humaine

Huit clusters de types-de-*spa* ont été détectés parmi les isolats humains. Les isolats de mammite étaient concentrés dans deux clusters distincts. La majorité des isolats animaux étaient groupés dans les *spa* clusters 1 *spa*-CC 267 et 7 no folder, qui englobaient également des isolats issus du portage nasal des professionnels (Tableau 31, Figure 27).

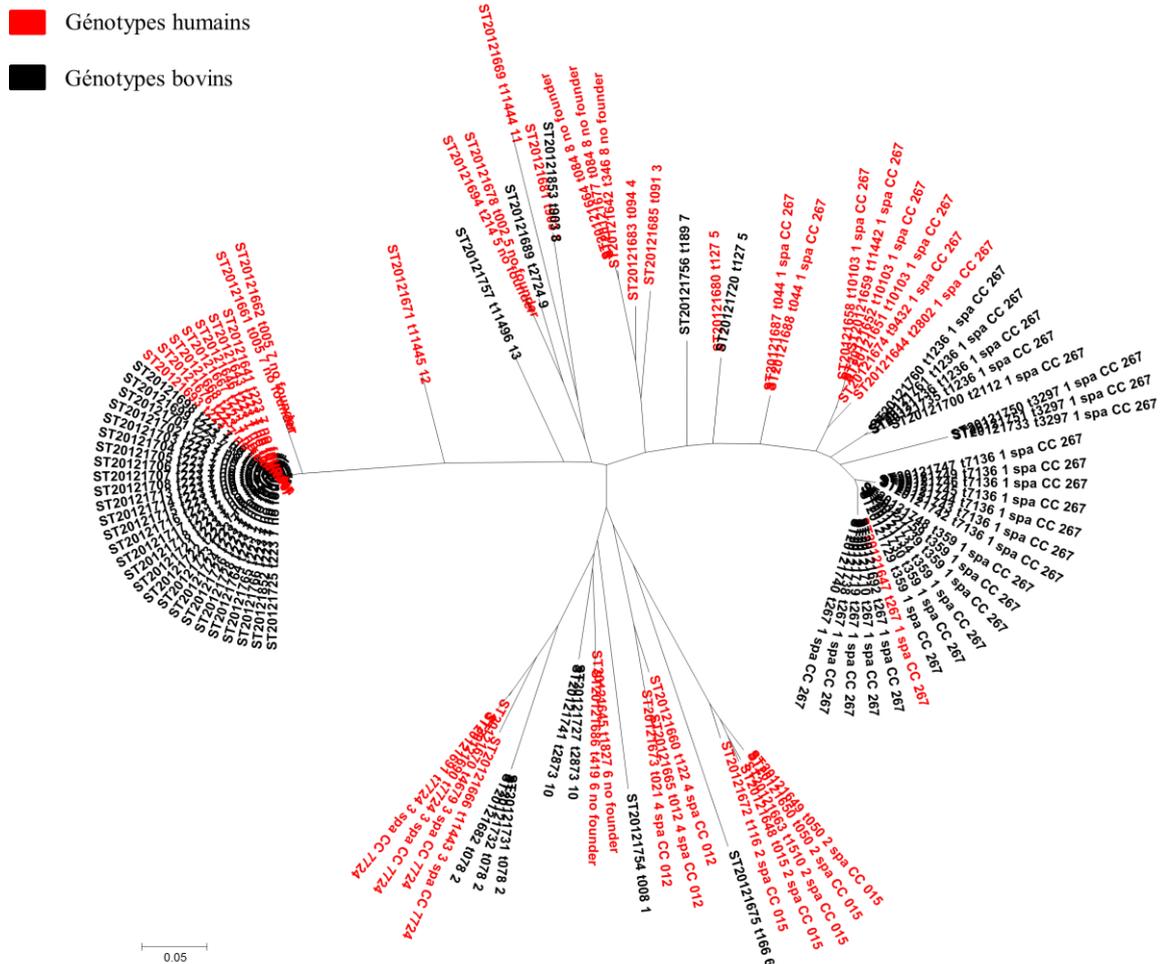


Figure 28 : Illustration de dispersion des types-de-*spa* humains par rapport aux génotypes bovins

### II.3.4.5. Typage par les puces à ADN

#### II.3.4.5.1. Regroupement des génotypes

L'analyse aux puces à ADN de plusieurs génotypes issus de mammites bovines a établi l'identité des clusters CC97 et CC22 dominants parmi les isolats animaux ; les types-de-*spa* restants appartenaient à CC479, CC25, CC1, CC5, CC8, CC188 et CC705.

Il est à noter que CC22 ait été associé principalement au génotype t223 au moment où le CC97 est formé de 10 types-de-*spa* distincts. Enfin, les génotypes t359 et t7136 appartenant à CC97, t223 (CC22) et t2873 (CC479) ont été isolés chez les vaches aussi bien en mammites cliniques que subcliniques (Tableaux 31, 32).

**Tableau 32 :** Caractérisation des souches *S. aureus* isolées de lait de vaches ayant une IIM

CC/ puces à ADN	<i>spa</i> t	<i>spa</i> -CC	Mammites			Professionnels	
			Nb	Clin/Subclin	Ferme d'origine	Nb	Zone
CC97	t267	1	4	0/4	A9, B2	2	A, F
	t359	1	6	1/5	A5, A9, A11, B8, D2	0	-
	t11511	1	1	0/1	C1	0	-
	t1236	1	4	0/4	A8, C1	0	-
	t2112	1	1	0/1	A16	0	-
	t3297	1	3	0/3	A5, A12	0	-
	t7136	1	7	2/5	A9, A10, A11	0	-
	t11496	Singleton	1	0/1	A17	0	-
	t1109	Exclue	1	0/1	B1	0	-
	NT	ND	1	0/1	A15	0	-
NT	ND	1	0/1	A8	0	-	
CC22	t223	7	27	8/19	A2, A5, A16, B3, B4, B5, B6, B8, C3, C4, C5	7	A, A10, A11, B2, B6, B7, D
CC479	t11495	Exclue	1	0/1	A13	0	-
	t2873	Singleton	2	1/1	A9, B8	0	-
CC25	t078	Singleton	2	0/2	A5	1	F
CC01	t127	Singleton	1	0/1	B1	1	E
CC05	t903	Singleton	1	0/1	C4	1	E
CC08	t008	Singleton	1	0/1	A15	0	-
CC188	t189	Singleton	1	0/1	A17	0	-
CC705	t529	Exclue	1	0/1	A15	0	-
<b>Total</b>	<b>20</b>	//	<b>67</b>	<b>12/55</b>	<b>23</b>	<b>12</b>	//

### II.3.4.5.2. Spécificité d'espèce et gènes de virulence

Le gène *sak* codant pour une staphylokinase était détecté chez les génotypes t223, t127, t903, t008, t189 appartenant respectivement à CC22, CC1, CC5, CC8, CC188 (**Tableau 33**). En termes de potentiel entérotoxigènes, on note la présence d'au moins un gène de staphylo-entérotoxines chez 8 (40%) génotypes (types-de-*spa*) appartenant à sept clusters distincts. **Jarraud et al. (2001)** ont montré que *seg* et *sei* coexistent sur un cluster de gène d'entérotoxines (*egc*) avec trois autres gènes, *sem*, *sen* et *seo*. En effet, les gènes codant les super-antigènes d'*egc* (SAGs) étaient les plus prédominants et détectés dans 5 sur 8 types-de-*spa* distincts. Quatre de ces génotypes ont présenté l'opéron *egc* comprenant *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, et *seu*. Les deux restants ont montré un *egc*-like opéron, qui a inclus le gène *sed*.

A l'exception d'un seul génotype, tous les types-de-*spa* appartenant au complexe clonal CC97 étaient exempts de gènes codant pour les staphylo-entérotoxines. Le défaut des gènes codants pour les staphylo-entérotoxines a été noté également sur les génotypes t189 et t903 appartenant respectivement aux complexes clonaux CC188 et CC05.

**Tableau 33** : Facteurs de virulence et origine des souches selon l'analyse par les puces à ADN

CC-puces	<i>spa</i> t	M/P	<i>MecA</i> M/P	<i>Luk F-P83</i> M/P	<i>LukM</i> M/P	<i>LukD</i> M/P	<i>LukE</i> M/P	<i>PVL</i> M/P	<i>sak</i> M/P	<i>chp</i> M/P	<i>Scn</i> M/P	<i>tst1(H)</i> M/P	SE gene profile
*CC80	t044	0/2	2	-	-	0/2	0/2	0/2	0/1	-	0/1	-	Neg
*CC22	t005	0/2	2	-	-	0/2	0/2	-	0/2	0/2	0/2	-	<i>egc</i>
CC97	t267	1/1	-	-	-	1/1	1/1	-	0/1	-	0/1	-	-
	t359	3/0	-	-	-	3/0	3/0	-	-	-	-	-	-
	t11511	1/0	-	-	-	1/0	1/0	-	-	-	-	-	-
	t1236	1/0	-	-	-	1/0	1/0	-	-	-	-	-	-
	t2112	1/0	-	-	-	1/0	1/0	-	-	-	-	-	-
	t3297	1/0	-	-	-	1/0	1/0	-	-	-	-	-	-
	t7136	2/0	-	-	-	2/0	2/0	-	-	-	-	-	-
	t11496	1/0	-	-	-	1/0	1/0	-	-	-	-	-	-
	t1109	1/0	-	-	-	1/0	1/0	-	-	-	-	-	-
	NT	1/0	-	-	-	1/0	1/0	-	-	-	-	-	-
	NT	1/0	-	-	-	1/0	1/0	-	1/0	-	1/0	-	<i>Sec,sel</i>
CC22	t223	6/3	-	-	-	6/3	6/3	-	6/3	6/3	6/3	6/3	<i>egc</i>
CC479	t11495	1/0	-	1/0	1/0	1/0	1/0	-	-	-	-	-	<i>Sed, [egc]</i>
	t2873	2/0	-	2/0	2/0	2/0	2/0	-	-	-	-	-	<i>egc / Sed, [egc]</i>
CC25	t078	1/0	-	-	-	1/0	1/0	1/0	-	-	-	-	<i>egc</i>
CC01	t127	1/1	-	-	-	1/1	1/1	-	1/1	-	1/1	-	<i>Sea, seb, seh, ser, seq / sea, seh, ser, seq</i>
CC05	t903	1/1	-	-	-	1/1	1/1	-	1/1	-	1/1	-	-
CC08	t008	1/0	-	-	-	1/0	1/0	-	1/0	-	1/0	-	<i>Sea</i>
CC188	t189	1/0	-	-	-	1/0	1/0	-	1/0	-	1/0	-	-
CC705	t529	1/0	-	1/0	1/0	1/0	1/0	-	-	-	-	-	<i>egc</i>
CC30	t419	0/1	-	-	-	-	-	-	0/1	0/1	0/1	0/1	-

M: Nombre de souches de mammité; P: Nombre de souches humaines, NT: Non typable, \*: SARM

Les gènes, *sec* et *sel* ont été détectés sur une seule souche appartenant au CC97. Cette dernière porte en plus les gènes *sak* et *scn*. Les génotypes appartenant à CC479 et CC705 (CC151) ont montré les gènes *LukF-P83* et *LukM* tandis que t078 (CC25) exposait les gènes *LukF-LukF-PV* et *LukS-LukS-PV* (Tableau 33).



# *Discussion*

## II.4. Discussion

### II.4.1. Protocole d'étude et biais de conception

#### II.4.1.1. Constitution de l'échantillon et biais de conception

Notre enquête a concerné 32 élevages bovins et 129 professionnels coopératifs ayant un contact étroit avec les animaux. Au cours de l'étude, une attention particulière est portée à la minimisation des informations subjectives liées à l'analyse des échantillons, l'enregistrement des données et enfin leurs traitement statistique. Bien que tous nos élevages aient été choisis en fonction de la disponibilité et de la coopération des éleveurs, une des premières embûches que nous avons eues lors de la mise en place de protocole de l'étude était d'assurer une homogénéité des échantillons en fonctions des paramètres retenus. Ainsi, plus de 51% des vaches laitières de notre enquête, étaient élevées à Tizi-Ouzou, au moment où, 79,8% (103/129) des personnes contacts étaient originaires de Tizi-Ouzou et d'Alger avec 42,6% et 37,2% respectivement. Ainsi, bien qu'une spécificité géographique des clones ait été rapportée de part le monde, nos recherches ont montré jusqu'ici, qu'il n'y a aucune étude visant à caractériser les souches de *S. aureus* animales et humaines dans l'environnement agricole en Algérie. Notre enquête ne donne qu'un aperçu sur les clones majeurs circulant dans l'environnement agricole en Algérie. Cependant, nos données ne pourraient pas définir avec précision le caractère spécificité géographique intra-départementale des clones de *S. aureus* sévissant dans le milieu de l'élevage.

**Chez les vaches**, l'hétérogénéité des échantillons issues des quatre wilayas associée à la grande disparité des effectifs de vaches en lactation dans les élevages (2 à 16 vaches en lactation/élevage), pourraient influencer sur les précisions relatives des prévalences départementales et intra-cheptel des mammites dans notre enquête.

**Chez les professionnels**, les écouvillonnages nasals étaient réalisés, de telle sorte à identifier un nombre de souches de *S. aureus* comparable à celui isolé en mammites bovines.

La présence de biais de non réponse pourrait être suspectée chez les trayeurs. Pour des raisons purement psychologiques, un taux de non participation de 48,9% a été enregistré. Le refus systématique de participation de 18 trayeurs a été enregistré dans 11 élevages disposant de 140 têtes bovines alors qu'un refus partiel de participation à l'enquête a été rencontré chez les trayeurs de six autres élevages. Enfin, il convient de signaler que les trayeurs de tous les élevages de Khenchela et Blida ont refusé catégoriquement de coopérer par un écouvillon nasal.

Pour limiter certains effets du biais lié au refus de participation des trayeurs, il nous a été indispensable de faire des écouvillons nasals chez les professionnels ayant un contact étroit avec les animaux au niveau de la station expérimentale de l'institut technique de l'élevage de Baba Ali. Bien que cette méthode permette de maîtriser le risque d'imprécision, elle ne résout toutefois pas le risque de non représentativité lié au refus. Ceci s'explique par le fait que la liste complémentaire à laquelle on a eue recours n'est pas tirée au sort.

### II.4.1.2. Critères d'inclusion et qualité de données

Chez les bovins, seul l'aspect qualitatif a été retenu lors de l'interprétation du CMT, or pour étudier l'intensité de l'inflammation en mammites subcliniques dues à *Staphylococcus aureus*, le recours au comptage de cellules somatiques pourrait être d'une utilité supérieure.

Il existe aussi des désavantages liés au fait que cette étude est une enquête transversale. En effet, l'absence de suivi des infections intra-mammaires dans le temps par des prises d'échantillon de lait répétées a fait en sorte qu'il était impossible de savoir le moment exact où les mammites à *S. aureus* ont eu lieu ainsi que le moment où celles-ci étaient guéries. Il aurait été intéressant de pouvoir quantifier parmi les vaches la persistance des infections et l'apparition de nouvelles IIM suite à une première IIM.

Bien que l'atrophie des quartiers de la mamelle soit une indication d'une infection intra-mammaire, les conditions de l'atrophie n'ont pas pu être élucidées dans notre enquête. Ainsi, on n'a pas pu déterminer avec certitude le lieu, ni le moment de la survenue de l'atrophie. En l'absence de l'exploration du portage de *S. aureus* dans les quartiers atrophiés et vu le faible risque de transfert de *S. aureus* d'un quartier atrophié à un quartier sain, pour éviter tout biais de confusion, les quartiers atrophiés étaient considérés stériles dans notre modèle de régression logistique.

Chez les professionnels, compte tenu des moyens existants nous nous sommes limités à l'estimation de la prévalence du portage. En effet, un patient classé comme porteur dans une étude transversale pourrait être un porteur persistant ou intermittent. Cette distinction est importante parce que les porteurs persistants ont des charges supérieures de *S. aureus* et un risque plus élevé de contracter l'infection (**Nouwen et al., 2005**). De même, les non-porteurs dans une étude transversale peuvent effectivement être porteurs intermittents. Vu l'absence de consensus général sur le nombre de cultures qui doivent être effectuées et le nombre de cultures devront être positives pour définir la persistance, des définitions adéquates internationalement

acceptées sont nécessaires. Enfin, la définition consensuelle des règles de culture permet l'amélioration de la qualité des recherches sur les déterminants et les risques liés au portage nasal de *S. aureus*.

### II.4.2. Enquête sur les mammites bovines en élevages

#### II.4.2.1. Prévalence et importance des mammites

Les infections intra-mammaires sont classiquement groupées en mammites contagieuses et environnementales. Le réservoir des germes contagieux est la mamelle infectée, sans traitement elle peut persister et se pérenniser dans les élevages. Sur les plans, individuel et quartier des prévalences respectivement de 52,2% et 24,5% ont été notées dans notre étude. Or, la fréquence, parfois la gravité médicale, le coût des traitements mais aussi les répercussions sur la production laitière en quantité et en qualité et l'impact réglementaire sur la vente des produits en filière lait cru sont autant d'éléments affectant l'économie du troupeau (**Halasa *et al.*, 2007**). Ainsi, presque 97% de nos élevages visités, présentent au moins un cas de mammite. Ce taux est nettement supérieur aux prévalences cheptel de 49,3% au Zimbabwe et 53,3% en Algérie rapportées par **Katsande *et al.* en 2013** et **Saidi *et al.* en 2010** respectivement. Par ailleurs, une baisse de production minimale de plus de 25% est de règle chez 4,5% des vaches ayant des quartiers non fonctionnels. Ces derniers représentent en effet un taux de 1,3% des quartiers dépistés dans notre étude. Ce pourcentage est jugé en accord avec les 1,5% et 1,69% rapportés en Ethiopie par **Abéra *et al.* (2010)** et **Tsegaye *et al.* (2015)** respectivement.

#### II.4.2.2. Caractérisation de la prévalence des mammites

Les données relatives à la prévalence des mammites chez la vache varient d'une étude à une autre (**Tableau 35**). Cette variation de la prévalence de la mammite bovine entre les études pourrait être attribuée à la différence dans la gestion des fermes, la race, la saison de l'étude, l'environnement de l'élevage ou les tests de diagnostic utilisés

**Tableau 34** : Comparaison des prévalences de mammites chez les vaches laitières selon les études

Enquête	Echantillons		IIM (%)		IIM cliniques (%)		IIM subcliniques (%)		Auteur
	Vaches	Quartier	V	Q	V	Q	V	Q	
Algérie	222	888	52,2	24,5	6,3	3,2	45,9	21,3	Akkou <i>et al.</i> ,
Ethiopie	385	1540	53,2	30,3	9,1	9,7	44,1	20,6	Tsegaye <i>et al.</i> 2015
Zimbabwe	584	--	21,1	--	4,8	--	16,3	--	Katsande <i>et al.</i> , 2013.
Algérie	140	560	--	--	--	--	28,6	28,8	Saidi <i>et al.</i> , 2013
Egypte	233	929	42,9	29,1	9,9	5,8	33,0	23,5	Elbably <i>et al.</i> , 2013
Ethiopie	384	--	52,9	--	9,4	--	43,5	--	G/Michael <i>et al.</i> 2013
Ethiopie	300	1200	46,7	29,0	10,0	3,9	36,7	23,5	Abéra <i>et al.</i> , 2010
Ethiopie	974	--	34,9	--	11,9	--	23,0	--	Biffa <i>et al.</i> , 2005

Q : quartier, V : Vache, IIM : infections intramammaires

Tel que rapporté dans les études précédentes, les mammites subcliniques sont plus fréquentes dans les élevages bovins que les mammites cliniques. En termes de prévalence on a enregistré sur le plan individuel 6,3% de cas cliniques et 45,9% de mammites subcliniques. Sur le plan quartier, on a enregistré des taux de : 3,2% et 21,3% pour les mammites cliniques et subcliniques respectivement.

#### II.4.2.2.1. Mammites subcliniques

En fonction de la prévalence individuelle et de la fréquence quartier de la survenue des cas de mammites subcliniques, nos résultats sont similaires à ceux décrits par Tsegaye *et al.* (2015) en Ethiopie, mais discordants avec ceux rapportés par Saidi *et al.* (2013) en Algérie. Ce dernier d'ailleurs décèle dans une enquête sur 140 vaches en lactation dépistées au California Mastitis Test (CMT), une faible prévalence individuelle associée à une haute fréquence quartier de la survenue des mammites subcliniques. Concernant la fréquence, il a été rapporté que les quartiers postérieurs constituaient un facteur de risque des mammites subcliniques (Barkema *et al.*, 1997; Schepers *et al.*, 1997). Dans notre étude, bien qu'une légère supériorité de fréquence de 51,9% (98/189) ait été enregistrée sur les quartiers postérieurs, nos résultats ne montrent pas de différence significative entre les différents quartiers. Ces données sont en accord avec celles rapportées dans l'Est Algérien par Bouaziz *en* (2005) sur 187 laits mammitieux subcliniques, 54% sont issus des quartiers postérieurs.

#### II.4.2.2.2. Mammites cliniques

Sur 222 vaches en lactation, 29 quartiers appartenant à 14 sujets ont présenté des signes cliniques d'une mammite. Ceci a permis de calculer une prévalence individuelle de 6,3% de cas cliniques dans notre étude. En ce sens, suivant les études transversales se limitant à une seule visite par élevage, une variation de prévalence individuelle des mammites cliniques de 4% à 12% a été

observée dans le continent africain (**Biffa et al., 2005 ; Katsande et al., 2013**). Sur les 29 quartiers ayant une mammites clinique, 68% étaient situés du côté postérieur. Ce résultat est semblable à celui rapporté par **Bouaziz en (2005)** dans une enquête menée dans 35 élevages appartenant aux wilayas de Constantine et de Skikda, où parmi les 252 quartiers ayant une mammites clinique 65% étaient des postérieurs. Il convient de signaler que la prévalence quartier des mammites cliniques dans notre enquête est relativement faible comparativement à celles rapportées en Ethiopie (**Abéra et al., 2010 ; Tsegaye et al. 2015**) et en Egypte (**Elbably et al., 2013**). Enfin, la caractérisation de l'impact des mammites cliniques ainsi que les facteurs prédisposant leurs survenues ne peuvent être bien élucidés que via des enquêtes verticales.

Dans le Nord-est algérien, sur 450 vaches de race Holstein suivies régulièrement chaque mois pendant deux ans, **Bouazid et al. (2011)** rapportent une incidence cumulée de mammites cliniques de 15,1%, au moment où **Bouaziz en (2005)** rapporte une incidence annuelle de mammites cliniques de 32,6% sur 730 vaches en lactation dans la même région.

Vu l'importance des pertes pouvant découler des mammites cliniques, des actions visant à traiter les vaches malades associées à celles devant limiter le risque d'apparition des mammites cliniques dans les cheptels sont requises. Ainsi il est recommandé un enregistrement standard et systématique par les éleveurs, des cas de mammites au niveau des élevages.

### II.4.3. Impact de *Staphylococcus aureus* dans l'environnement de l'élevage

#### II.4.3.1. Portage nasal chez les professionnels

En termes de colonisation chez l'homme, la prévalence et la fréquence d'isolement de *S. aureus* chez les professionnels ayant un contact étroit avec les animaux étaient relativement élevées dans notre étude. La prévalence enregistrée en portage nasal (38%) est similaire aux taux de 36% décrits en Suisse chez les éleveurs de bovins (**Sakwinska et al., 2011**). Elle est cependant, clairement supérieure à celle rapportée dans l'ouest de l'Algérie sur des personnes en bonne santé de la population générale (**Ruimy et al., 2009**). Dans ces études, les variations liées aux types de populations, aux zones géographiques, aux procédures d'échantillonnage et aux méthodes utilisées pourraient expliquer la différence observée.

### II.4.3.2. Caractérisation des mammites à *S. aureus* chez la vache

#### II.4.3.2.1. Culture bactérienne du lait mammitiqueux

Dans notre étude, 9,6% des prélèvements (clinique : 13,9% (4/29) et subclinique : 9,0% (17/189)) étaient bactériologiquement stériles. Ce résultat est similaire à 11% enregistré sur 235 échantillons de lait mammitiqueux rapporté par **Boufaïda-Asnoune** en **2012** au nord-est de l'Algérie. Le pourcentage des échantillons de lait mammitiqueux stériles dans notre enquête est cependant différent des 21,6% et 5% rapportés respectivement à l'Est de l'Algérie par **Bouaziz** en **2005** et au nord-centre de l'Algérie par **Saidi et al.** (**2013**).

Différentes hypothèses explicatives peuvent être formulées à propos des cultures négatives. En plus de l'insuffisance des techniques de bactériologie pour l'isolement des germes comme les mycoplasmes (**Dinsmore et al., 1992**), la lyse bactérienne naturelle indispensable pour la libération des endotoxines responsables des symptômes de mammites cliniques aiguës à entérobactéries conduit souvent à un résultat bactériologiquement négatif. Le traitement préalable des mammites cliniques peut induire une guérison symptomatique et une stérilité bactériologique vraie ou apparente. Au regard du comptage des cellules somatiques cependant, **Borm et al. (2006)** et **Roy et al. (2007)** ne rapportent aucune différence significative entre les groupes de taures traitées et non traitées.

La culture bactérienne négative observée dans les prélèvements de lait de mammites subcliniques pourrait être liée en plus des facteurs précédemment cités, aux facteurs ayant un impact sur la variation du comptage de cellules somatiques tels que le stade de lactation, l'âge, la saison, le stress, la régie et la variation diurne. **Schepers et al. (1997)** ont rapporté des niveaux physiologiquement élevés de cellules somatiques au début et en fin de la lactation chez les vaches. A ce stade de lactation, bien que la mamelle soit saine, un dépistage par le CMT sera révélé positif.

#### II.4.3.2.2. Fréquence d'isolement de *S. aureus* dans les cas de mammites

*Staphylococcus aureus* est une bactérie très robuste dans l'environnement, pouvant survivre dans des conditions extrêmes de température et d'humidité. Elle est décrite comme une cause majeure des infections intra-mammaires chez les vaches laitières avec de fortes prévalences dans les exploitations de moins de trente vaches (**Kalmus et al., 2011**). Dans l'ensemble, *S. aureus* est souvent considéré comme l'un des agents étiologiques les plus couramment incriminés en mammitique clinique et subclinique chez les vaches laitières. Il est en effet, impliqué dans 74 %

(23/31) des troupeaux (5 à 25 vaches) atteints de mammites dans notre enquête. Sur le plan quartier, il a été isolé parmi 29,8% (65/218) des cas de mammite bovine avec une proportion élevée (41% : 12/29) parmi les cas cliniques. Plusieurs études provinciales algériennes ont montré une forte fréquence d'implication de *S. aureus* dans les mammites bovines. A Oran, *S. aureus* est décrit comme étant responsable de 38,9% des cas mammites cliniques et subcliniques chez les vaches (**Benhamed et Kihal, 2013**). Par ailleurs, des taux d'implication de *S. aureus* de 30,3% et 40% dans les cas de mammites subcliniques ont été enregistrés respectivement dans les régions Est et centre de l'Algérie (**Boufaïda-Asnoune et al., 2012 ; Saidi et al., 2013**). Toutefois, la comparaison entre les résultats de ces différentes études doit se faire avec prudence car les méthodes de l'échantillonnage et les techniques de culture bactérienne peuvent différer.

#### **II.4.3.2.3. Prévalence des mammites à *S. aureus***

A l'échelle troupeau, la prévalence apparente des mammites à *S. aureus* (71,8% : 23/32) rapportée dans notre investigation est similaire à celle décrite dans une récente étude menée au Canada (**Olde Riekerink et al., 2010**), mais supérieure aux prévalences troupeaux rapportées aux Etats-Unis et au Mexique (**Jayarao et al., 2004; Miranda-Morales et al., 2008**). Notons que la prévalence individuelle (PI=20,2% ; 45/222) des mammites à *S. aureus* dans les élevages dépistés, est proche de celle rapportée en Hongrie (**Janosi et Baltay, 2004**), mais supérieure à celles décrites en Finlande, en Suisse et en Norvège (**Pitkälä et al., 2004 ; Moret-Stalder et al., 2009 ; Mørk et al., 2012**). La prévalence relativement élevée des mammites à *S. aureus* dans les troupeaux bovins laitiers algériens pourrait être liée aussi bien au défaut de sensibilisation des producteurs de lait sur l'importance des mammites subcliniques, qu'à l'absence d'une législation stricte imposant un contrôle régulier de la qualité du lait. En plus des règles d'hygiène qui sont défectueuses, aucun contrôle sanitaire de routine ne se fait sur les glandes mammaires des vaches appartenant aux troupeaux étudiés, soit par un dépistage mensuel au CMT, par le comptage des cellules somatiques des laits de mélange, ni par des mesures quotidiennes de la conductivité électrique du lait.

#### **II.4.3.2.4. Analyse de risque d'apparition des mammites à *S. aureus***

Nos résultats montrent que le risque d'apparition des mammites à *S. aureus* est supérieur pendant les deux premiers mois de lactation chez les vaches allaitantes élevées en promiscuité étroite avec leurs veaux.

La prévalence élevée des mammites au début de lactation dans notre enquête est en accord avec celles rapportées en Ethiopie respectivement par **Kerro et Tarreke (2003)** et **Abéra et al.**

(2010). L'absence de traitement pendant la période de tarissement associée au stress de part peuvent générer des taux élevés au début de lactation. En effet, **Radostits *et al.* (2000)** ont suggéré que la sensibilité de la glande mammaire aux nouvelles infections est plus élevée au début et à la fin de la période sèche. Celle-ci pourrait être due à l'absence de lavage et de trempage des trayons à l'origine de l'augmentation de la présence d'agents pathogènes potentiels sur la peau des trayons (**Radostits *et al.*, 2000**). Par ailleurs, la baisse significative des prévalences enregistrées pendant le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> mois qui coïncident avec la phase des productions importantes, pourrait justifier les efforts thérapeutique et prophylactique ayant pour objectifs respectifs de contrer les infections de début de lactation et de prévenir les nouvelles infections. Enfin, l'effet protecteur de la séparation des veaux de leurs mères et le risque élevé associé à l'allaitement sur l'apparition des mammites à *S. aureus* observés dans notre enquête pourraient définir l'importance de la formation de bouchon muqueux au niveau de canal de trayon dans la protection de la mamelle.

### II.4.4. Caractérisation de l'impact de *Staphylococcus aureus*

#### II.4.4.1. Résistance aux antibiotiques des souches animales et humaines

##### II.4.4.1.1. Résistance à la méticilline

Les phénotypes et les génotypes résistants à la méticilline étaient systématiquement recherchés parmi nos souches. Ainsi, la caractérisation phénotypique était déterminée par la recherche de résistance à la céfoxitine et l'oxacilline, alors que la caractérisation des génotypes était en rapport avec les gènes *mecA* et *mecC* respectivement. Dans cette étude, seulement quatre personnes en bonne santé (3,1%) étaient colonisées par des souches SARM alors que les isolats dérivés de mammites étaient tous sensibles à la méticilline. Aucune discordance n'a été observée entre les données phénotypiques de la sensibilité aux antibiotiques réalisée par la méthode de diffusion sur gélose et le diagnostic par PCR des gènes *mecA* et *mecC*. Ainsi, les quatre souches de SARM sont porteuses du gène *mecA*; deux souches ont été confirmées au centre de référence des staphylocoques comme CC80, *SCCmec IV*, *agr3*, PVL + et deux autres comme CC22, *SCCmec IV*, *agr1*.

##### II.4.4.1.2. Fréquence de SARM en mammites bovines

Semblablement aux enquêtes ayant décrit de faibles (<5%) prévalences de SARM dans les élevages bovins laitiers, nous notons une prévalence nulle de la résistance à la méticilline chez les souches de *S. aureus* impliquées dans les infections intra-mammaires de la vache. En effet,

sur 97 échantillons de lait quartier de mammites cliniques, aucune souche de SARM n'a été isolée à Kampala en Uganda (**Kateete et al., 2013**). Au plan individuel, parmi les 441 vaches dépistées au niveau d'un abattoir au Pays-Bas, **van Duijkeren et al. (2014)** observaient 3,9% de colonisation de la peau de pis par le SARM. Enfin, une prévalence cheptel de SARM de 4% a été rapportée dans une enquête ciblant 50 troupeaux de bovins laitiers dans l'état de Minnesota aux USA (**Haran et al., 2012**). A l'opposé, de nouveaux rapports belges présentent l'implication des SARM en portage nasal chez les bovins dans 19,8% des fermes, et en mammites bovines dans 10% des exploitations investiguées (**Nemeghaire et al., 2014**). Une autre étude menée en Chine a indiqué que 15,5% des isolats de mammites bovines étaient des SARM ; 38,2% des souches de SARM montraient en plus, une résistance à plus de 8 classes d'antibiotiques (**Wang et al., 2015**). En Algérie, **Saidi et al.,** en 2014 ont pu décrire les gènes *mecA* chez 10 souches de *S. aureus* isolées des cas de mammites bovines. La spécificité d'hôte par contre, n'a pas été étudiée sur ces dernières. Enfin, la forte pression de sélection exercée à différentes échelles, l'absence de restrictions sur les mouvements de cheptel associé au défaut de dépistage du portage de SARM chez les génisses importées peuvent conditionner les variations de prévalence de SARM en mammites bovines.

### II.4.4.1.3. Fréquence de SARM en portage chez les professionnels

Une méta-analyse portant sur 33 publications internationales, a montré une prévalence de colonisation par le SARM de 14,2 % (intervalle de confiance à 95 %, 9,1% -20,1 %) chez les personnes en contact avec le bétail. De ces derniers, de fortes prévalences étaient observées chez les personnes en provenance d'Europe et les éleveurs (**Liu et al., 2015**). Selon **Ye et al. (2015)**, le contact professionnel avec les animaux de rente est associé à 5,31 fois plus de risque de colonisation par les SARM que les non contacts. Il a été même rapporté que le personnel vétérinaire en contact avec les grands animaux soit significativement plus colonisé (OR : 2,9) que ceux ayant un contact avec les petits animaux ou sans contact avec les animaux malades (**Hanselman et al., 2006**). Contrairement aux fortes prévalences d'infections humaines à SARM signalées aussi bien dans les hôpitaux qu'en communauté en Algérie (**Antri et al., 2011**), nous rapportons dans cette investigation une faible prévalence de SARM en portage nasal chez les professionnels en contact étroit avec les animaux. Cette prévalence est jugée faible par rapport à celles décrites précédemment chez les professionnels de l'élevage (**Hanselman et al., 2006 ; Wulf et al., 2007 ; Dahms et al., 2014**). Ainsi, des taux de colonisation par le SARM de 6,5% et 12,5% ont été rapportés respectivement chez le personnel vétérinaire participant au forum de médecine vétérinaire interne du collège annuel américain tenu à Baltimore, Maryland, USA le 3-

5 juin 2005 (**Hanselman et al., 2006**) et en portages nasal et pharyngé chez les participants à une conférence internationale sur la santé du porc au Danemark (**Wulf et al., 2007**). A Mecklembourg-Poméranie occidentale dans le nord-Allemagne, le dépistage (nez et gorge) de 78 fermiers exerçant dans des exploitations porcines, bovines et aviaires a montré 25,6% de porteurs de SARM. Ces derniers étaient tous des employés des fermes porcines et ont montré des souches Livestock associated methicillino-résistante *Staphylococcus aureus* CC398 (LA-MRSA CC398) résistantes à la tétracycline (**Dahms et al., 2014**). En Algérie, l'absence de l'élevage de porc et de veau de boucherie, le non usage des antibiotiques comme facteurs de croissance en élevages bovins, le niveau de colonisation des animaux par le SARM et la durée d'exposition des professionnels aux animaux colonisés sont autant de facteurs qui peuvent expliquer la prévalence faible dans notre étude.

#### **II.4.4.1.4. Résistance aux autres antibiotiques**

Les niveaux de résistance aux antibiotiques observés sur les isolats de mammites bovines et des professionnels ayant un contact étroit avec les animaux étaient relativement variables. La seule exception est la résistance à la première ligne thérapeutique à la pénicilline G, qui atteint 86,5% et 92% chez les souches bovines et humaines respectivement. Cette résistance généralisée vis-à-vis de la pénicilline G en Algérie pourrait être attribuée à l'utilisation fréquente et à long terme de la pénicilline en thérapeutique. En effet, les différences dans les prévalences de la résistance à la pénicilline, des souches de *S. aureus* responsables de mammites bovines entre les pays, pourrait être dues à la différence de gestion des options de contrôle des mammites à *S. aureus*. Elle pourrait être liée également aux différents modes d'utilisation des antibiotiques pour traiter les mammites. Enfin, les pays ayant une politique d'utilisation prudente des antibiotiques dans les pratiques vétérinaires ont montré des niveaux inférieurs de résistance par rapport aux autres pays (**Kalmus et al., 2011**). A l'exception de la tétracycline et de la pénicilline G, la résistance de nos souches de *S. aureus* aux autres antibiotiques reste faible (<5%). La résistance aux antibiotiques des souches isolées de mammites bovines est nettement ( $P < 0,05$ ) plus faible que celle observée sur les isolats humains.

#### **II.4.4.1.5. Pression de sélection et transfert horizontal de gènes chez *S. aureus***

L'importance de transfert génétique horizontal (TGH) des éléments génétiques mobiles (EGM) comme une composante de l'évolution de *S. aureus* a été reconnue dans plusieurs études. Ces dernières se focalisent souvent sur l'acquisition des déterminants de la résistance aux antibiotiques tels que SCC*mec* et le transposon *vanA* (**Katayama et al., 2000 ; Chang et al.,**

2003 ; Weigel *et al.*, 2003), ou sur des preuves de TGH sur le génome entier entre lignées ou des espèces qui façonnent le profil de virulence et la résistance d'une souche donnée (Baba *et al.*, 2002 ; Holden *et al.*, 2004 ; Gill *et al.*, 2005 ; An Diep *et al.*, 2006). Les gènes de résistance chez *S. aureus* sont habituellement codés par des plasmides. Ces derniers sautent via les mécanismes de transfert horizontal des gènes conduisant à l'apparition de souches hautement résistantes dans les populations de *S. aureus* (Werckenthin *et al.*, 2001). Malgré les taux similaires d'acquisition et de perte des souches rapportés chez les individus colonisés et les non colonisés par *S. aureus* (Miller *et al.*, 2014), l'exposition fréquente à la flore des contacts étroits pourrait entraîner la colonisation ou l'infection par des clones-mixtes de *S. aureus*. En Algérie, la caractérisation moléculaire de 267 souches isolées du portage a démontré principalement que les mêmes clones étaient responsables d'infection et de colonisation (Antri, 2014). Vu les différents profils de résistance aux antibiotiques qui partagent les mêmes niches écologiques, la résistance relativement élevée aux antibiotiques des souches humaines pourrait constituer une étape importante, potentielle et un risque pour l'émergence puis la propagation de souches hautement résistantes chez les bovins. Il a été rapporté que la spécificité de groupes des récepteurs auto-inducteurs d'*agr* pourrait influencer sur l'écologie de l'hôte et ce, par l'augmentation ou l'inhibition des capacités de *S. aureus* à coloniser en présence des souches résidentes de staphylocoques (Ji *et al.*, 1997).

### II.4.4.2. Typage des gènes accessoires de régulation (*agr*)

Le système des gènes accessoires de régulation (*accessory gene regulator*) a été identifié comme système de stimulation de type densité cellulaire (*quorum sensing*) chez *S. aureus*. Le polymorphisme au niveau de la séquence en acides-aminés du peptide auto-inducteur et de son récepteur *agrC* permet de différencier 4 allèles (*agr1-4*) (Thoendel *et al.*, 2010). Dans la présente étude, le groupe spécifique *agr1* dominant à la fois chez les souches issues de portage des professionnels et celles responsables de mammites bovines avec 60% et 91%, respectivement. De point de vue des mammites bovines, des proportions distinctes des groupes *agr* ont été observées dans des études précédentes (Kumar *et al.*, 2011 ; Benhamed et Kihal, 2013). En effet, la forte prévalence des souches porteuses de l'allèle *agr1* dans notre étude pourrait très probablement refléter l'aspect contagieux des mammites à *S. aureus* chez les vaches.

### II.4.4.3. Typage de *spa* et diversité clonale

La protéine A de *Staphylococcus aureus* est un facteur de virulence qui joue un rôle capital dans l'immunité humorale. Le typage de *spa* a montré une grande diversité de génotypes parmi les

souches provenant des professionnels que celles incriminées dans les infections intra-mammaires de la vache. Une étude menée en Suisse rapporte que les isolats de mammite bovine sont concentrés en seulement quelques sous-groupes alors que, les souches isolées chez les éleveurs étaient très diverses et la composition en génotype des *S. aureus* issus des éleveurs et des non éleveurs était similaire (Sakwinska *et al.*, 2011a).

Le typage par les puces à ADN, a permis de distinguer neuf complexes clonaux parmi les isolats responsables de mammites chez la vache. De ces derniers CC97 et CC22 occupent 44,7%, et 40% respectivement, tandis que le reste est partagé par CC479, CC705, CC1, CC5, CC8, CC25 et CC188. Le complexe clonal CC22 était représenté exclusivement par le génotype t223, alors que le CC97 couvre plusieurs types-de-*spa*, dont la majorité d'entre eux (t267, t359, t1109, t1236, t2112, t3297, t7136, t11497 et t11511) sont étroitement liés les uns aux autres. Parmi les génotypes précités, t267 a été décrits chez 86% (43/50) des souches de *S. aureus* isolées de mammites (Benhamed, 2014). Les génotypes t267 et t359 étaient décrits au Japon et au Brésil, au moment où t1109 et t267 étaient rapportés exclusivement au Japon et au Danemark respectivement (Aires-de-Sousa *et al.*, 2007 ; Hata *et al.*, 2010; Hasman *et al.*, 2010). Par ailleurs, les génotypes t127, t02 et t08 étaient également signalés dans la mammite bovine en Corée et en Suisse (Hwang *et al.*, 2010).

#### II.4.4.4. Gamme de *Staphylococcus aureus* chez ruminants

Les souches appartenant à CC97 adapté à l'environnement de l'élevage, ont été isolées du lait de vache dans le monde entier. Elles sont devenues des lignées majeures au Chili, aux États-Unis, au Brésil, au Japon, au Pays-Bas, en Suisse (De Buyser *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005; Aires-de-Sousa *et al.*, 2007; Rabello *et al.*, 2007; Ikawaty *et al.*, 2009; Sakwinska *et al.*, 2011a) et en Algérie. Les génotypes appartenant à CC705 et CC479, associés principalement aux mammites des ruminants, demeurent dominants dans les élevages bovins au Pays-Bas et en Suisse (Sung *et al.*, 2008; Ikawaty *et al.*, 2009 ; Sakwinska *et al.*, 2011a), mais rares dans notre étude. En rapport avec la virulence et la spécificité des souches responsables de mammites, des études récentes ont pu déterminer l'association de *LukF-P83/lukM* aux CC151 (CC705), CC479, CC133 et quelques génotypes de CC97 (Hata *et al.*, 2010 ; Schlotter *et al.*, 2012).

Un seul génotype appartenant à CC705 était décrit dans notre étude au moment où les clones de CC705 sont devenus la lignée majoritaire au Japon, au Pays-Bas et au Royaume-Uni (Smith *et al.*, 2005a ; Ikawaty *et al.*, 2009). Il a été montré que les isolats de mammites bovines t529 appartenant au CC705 aient un phénotype d'agglutination au latex négatif (Pastorex négatif)

(Stutz *et al.*, 2011). L'analyse au *pastorex* de toutes les souches catalase positive pourrait biaiser le diagnostic des souches de CC705. En effet, les changements génétiques du *spa*, *clfA* et *fnbA*, ainsi que la perte de *fnbB* qui peuvent compromettre les fonctions de SpA, ClfA, FnbA en FnbB dans les réactions d'agglutination au latex, donnant un diagnostic de *Staphylococcus coagulase* négative (Stutz *et al.*, 2011) pourraient générer un résultat négatif au *pastorex*.

#### **II.4.4.5. Changement de l'hôte homme-bovin**

Dans notre étude, les CC22 résistants à la méticilline ont été diagnostiqués seulement en portage nasal chez deux professionnels ayant un contact étroit avec les animaux. Il est connu que les souches de CC22 représentent des génotypes humains qui ont donné naissance à la lignée majeure de SARM-Epidémique (SARM-E-15 au Royaume-Uni) responsable des infections hospitalières et communautaires (Knight *et al.*, 2012). A notre connaissance, les souches de CC22 ont été décrites aussi bien en portage qu'en infection chez les espèces canines et félines (Loeffler *et al.*, 2010; Vincze *et al.*, 2014), mais n'ont pas été rapportées en infections intramammaires chez les ruminants.

En termes de portage chez les professionnels, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans une enquête menée à l'Est de l'Algérie, où le CC22 représente plus de 18% des personnes colonisées par *S. aureus* en population ordinaire (Ruimy *et al.*, 2009). Dans notre étude, le génotype t223 (CC22) décrit précédemment dans les infections humaines en Algérie (Bekhoucha *et al.*, 2009), a été détecté aussi bien chez les vaches élevées dans onze troupeaux distincts originaires de trois wilayas qu'en portage nasal chez sept professionnels issus de trois wilayas d'Algérie. Dans une même ferme, il s'avère que les isolats provenant des cas de mammites bovine et des professionnels colonisés sont identiques. Les complexes clonaux CC1, CC5 et CC8, universellement associés à l'infection staphylococcique humaine, sont décelés d'une part en mammites bovines et chez les professionnels de l'autre. Ceci, plaide en faveur d'une comparaison génotypique approfondie des souches animales et humaines. Enfin, vu la forte association de SARM CC80 aux infections communautaires et hospitalière (Antri *et al.*, 2011), l'isolement en portage nasal chez les professionnels de l'élevage de deux souches de SARM communautaire CC80 PVL plus pourrait constituer un risque majeur pour la santé de la mamelle chez les vaches.

#### II.4.4.6. Transfert anthropo-zoonotique des génotypes de *S. aureus*

La variation des génotypes isolés chez sept vaches et la coexistence de deux génotypes (t903 et t223) dans un même quartier ont permis de supposer que les infections intra-mammaires à *S. aureus* ne sont pas entièrement et automatiquement le résultat d'une transmission d'une vache à l'autre. Des sources extra-mammaires de *S. aureus* incluant la peau de vache, les sites du corps et l'environnement de l'élevage ont été précédemment mis en cause (**Zadoks et al., 2011**). En effet, **Smith et al. (2005b)** ont diagnostiqué des souches identiques sur les mains des trayeurs, le lait et sur la peau des trayons.

Selon **Resch et al. (2013)**, plus de 99% des gènes définissant la spécificité de l'espèce sont portés sur des éléments génétiques mobiles (EGM) chez les souches humaines. En termes de virulences, un groupe de gènes codant pour des protéines adaptées à l'évasion immunitaire de l'hôte et qui ciblent spécifiquement la réponse immunitaire humaine étaient détectés aussi bien dans nos souches responsables d'infection intra-mammaire chez les bovins que celles impliquées dans le portage nasal chez les professionnels.

Le gène (*sak*) codant pour une staphylokinase, un activateur de plasminogène qui distingue plus de 80% des isolats humains, mais faisant habituellement défaut dans les souches bovines (**Monecke et al., 2007; Sung et al., 2008; Schlotter et al., 2012**), a été détecté parallèlement à un gène *hly* tronqué dans les souches t223, t127, t903, t008 et t189 appartenant aux CC22, CC1, CC5, CC8 et CC188 respectivement. Ces résultats, suggèrent que plusieurs souches de *S. aureus* impliquées dans les infections intramammaires chez les vaches étaient d'origine humaine. En mammite bovine, la présence du gène *hly* codant pour une phospholipase C est jugé fournir un avantage sélectif supérieur que la staphylokinase (**Goerke et al., 2006; Monecke et al., 2007**). Tel que décrit antérieurement par **Goerke et al. (2006)**, nos résultats montrent que l'insertion des phages *sea*, *sak*, *scn* et *chp* dans diverses combinaisons inactive le gène *hly*. Le génotype t223 un variant par un seul-locus de t005, est porteur du cluster de gènes d'évasion adaptés à l'immunité de l'homme (*sak*, *chp* et *scn*) et une *tst1* humaine. Ce génotype (t223) est fréquemment isolé aussi bien dans les prélèvements du lait que des écouvillons nasals. Il a été même détecté dans des cas de mammite bovine et en portage nasal chez un trayeur dans une même ferme, ceci suggère une transmission directe de génotype t223 des éleveurs aux pis de vaches lors de la traite. Les gènes *sak* et *scn* ont été même observés chez une souche de SASM-CC97. Avec l'acquisition de ces facteurs de virulence, le CC97 dont on sait qu'il est adapté à l'environnement des animaux pourrait être incriminé dans les infections humaines. En effet, l'infection humaine

par *S. aureus* du CC97 a été rapportée dans au moins 35 pays de monde, alors que la fréquence d'implication des génotypes de CC97 résistants à la méticilline a augmenté de 11 fois en cinq ans au Danemark (**Spoor *et al.*, 2005**). Dans la présente étude, les phages de conversion des  $\beta$ -toxines ( $\phi$ Sa3) associés aux *S. aureus* humains, et comportant généralement un cluster de gènes d'évasion immunitaires (CEI) étaient défectueux chez les SARM CC80 isolés en portage chez les professionnels. Ce constat pourrait faire penser à une éventuelle étape de transfert de CC80 de l'homme vers les bovins.

#### II.4.4.7. Toxines et profils de résistance

##### II.4.4.7.1. Mammites à *S. aureus* et risque pour le consommateur

Les souches de *S. aureus* entérotoxigènes, bien qu'elles puissent abriter de multiples allèles, portent des quantités variables de gènes codant pour les entérotoxines staphylococciques. Les gènes codant pour les entérotoxines staphylococciques (ES) sont situés sur des plasmides (*sed* et *sej*), des phages (*sea*, *see* et *sep*) et les chromosomes (*seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo* et *seq*) (**Kuroda *et al.*, 2001**). Parmi les génotypes de CC97, seul la souche porteuse des gènes *sak* et *scn* était porteuse des gènes *sec* et *sel*, cela suppose le faible rôle des staphylo-entérotoxines dans la pathogénie des infections intra-mammaire chez les vaches. La production des staphylo-entérotoxines dans le lait évoque cependant, une préoccupation majeure en hygiène des denrées alimentaire d'origine animale. Or, l'importance des pseudo-entérotoxines super-antigéniques nouvellement découvertes en intoxications alimentaires reste à élucider. Cette dernière est compliquée par le fait que la productivité des souches porteuses d'un nouveau gène tel que *seh* est connue pour être influencée par l'aération et le pH, tandis que l'expression des allèles *seg* et *sei* semblent être fortement régulée au niveau de la traduction des gènes (**Su *et al.*, 1995**; **Omoë *et al.*, 2002**).

##### II.4.4.7.2. Staphylo-entérotoxines chez les souches supposées humaines

**De Buyser *et al.* (2001)** rapportent que la consommation de lait cru-contaminé et/ou les produits laitiers préparés à partir de lait cru contaminé par *S. aureus* ont été fréquemment impliqués dans les intoxications alimentaires staphylococciques. L'isolement des souches de *S. aureus* entérotoxigènes dans les échantillons de lait de mammites subcliniques dans notre étude, évoque un danger majeur pour le consommateur. Des efforts pour prévenir la contamination associés à une conservation efficace sous froid du lait de tank jusqu'à la pasteurisation contribuent largement à minimiser le risque d'intoxications alimentaires par les entérotoxines

staphylococciques à partir des produits laitiers. Cependant s'il est exploité cru dans la production, un lait de tank contaminé pourrait être dangereux pour le consommateur. Le risque est accentué particulièrement dans les cas où les cultures de démarrage, la contamination par *S. aureus* est significativement élevée, et/ou lorsque l'immunité est faible chez les consommateurs.

### II.4.4.7.3. Résistance aux antibiotiques et contagiosité des mammites à *S. aureus*

En mammites bovines, *S. aureus* est également connu pour être un germe contagieux. Il se propage au sein des fermes d'une vache à l'autre au cours du processus de traite via les machines contaminées, les équipements et/ou les mains des trayeurs. Les profils de résistance aux antibiotiques se présentent comme des marqueurs épidémiologiques, rapportant des informations précieuses pour une décision dans les stratégies thérapeutiques. La résistance à la pénicilline G a été observée chez 86,6% des isolats de mammites bovines et dans presque 92% des *S. aureus* impliqués dans le portage nasal chez les professionnels en contact étroit avec les animaux. La généralisation de la résistance à la pénicilline G en Algérie, pourrait être associée à l'utilisation abusive et irraisonnée de cette molécule en traitement des infections humaines et des mammites chez les vaches laitières. L'affiliation de presque 85% des souches d'origine mammaire aux complexes clonaux CC22 et CC97 dans notre étude, pourrait plaider en faveur de l'hypothèse que la résistance à la pénicilline est clonale chez les isolats de mammite (**Sakwinska *et al.*, 2011b**). De même, la présence de ces agents pathogènes chez les animaux de rente ou dans le lait cru soulève la question de la transmissibilité potentielle de clones spécifiques hautement résistants ou de déterminants de la résistance antimicrobienne, ainsi que les voies possibles de transmission de l'animal à l'homme ou vice-versa.



*Conclusions*  
NE CROYONS QUE CE QUE NOUS ANALYSONS  
*et recommandations*

### CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

#### Conclusions

Une collaboration active entre les vétérinaires et les médecins, s'avère de plus en plus nécessaire en raison de la recrudescence des infections animales d'origine humaine. Le présent travail constitue une première approche dans l'étude de *S. aureus* impliqué en infections intramammaires chez la vache et en portage nasal chez les professionnels ayant un contact étroit avec les animaux.

A la lumière de nos résultats, il s'avère que les mammites demeurent l'une des pathologies dominantes qui sévissent dans les élevages bovins. La prospection de 222 vaches en lactation au sein de 32 élevages reflète le fardeau que représentent les infections intra-mammaires pour les éleveurs algériens. On enregistre en effet, à l'échelle troupeau, individu et quartier des prévalences de 96,8%, 52,2% et 24,5% respectivement. Or, l'analyse bactériologique des échantillons de lait mammitieux montre, que presque le tiers des quartiers atteints étaient infectés par *S. aureus*. En conséquence, l'impact économique se justifie par le déficit apparent causé par l'atrophie des quartiers (1,2%), de l'atteinte clinique (3,2% des quartiers), en plus de fardeau des pertes occultes liées aux mammites subcliniques (21,3% des quartiers) et à la contagiosité des germes tel que *S. aureus*, ayant pour réservoir les quartiers infectés.

*Staphylococcus aureus* est une bactérie très robuste dans l'environnement, 38% des professionnels dépistés ici, le portent à l'état asymptomatique dans leurs fosses nasales. La présente étude le décrit en outre, comme étant une cause majeure des infections intra-mammaires chez la vache, avec un haut risque d'atteinte pendant les deux premiers mois de lactation, chez les vaches allaitantes élevées en promiscuité étroite avec leurs veaux. L'étude des profils de sensibilité aux antibiotiques a révélé une résistance quasi-totale de *S. aureus* vis-à-vis de la pénicilline G ; ceci nous laisse prévoir de nombreux échecs thérapeutiques en médecine vétérinaire. Quatre personnes en bonne santé (3,1%) étaient colonisées par le SARM alors que les isolats dérivés de mammites bovines étaient tous sensibles à la méticilline. L'isolement de clone épidémique SARM-AC CC80 en portage chez les professionnels fait craindre une éventuelle dissémination chez les bovins. De même, la résistance aux antibiotiques non- $\beta$ -lactamines des souches isolées chez les professionnels était nettement ( $P < 0,05$ ) supérieure à celle observée sur les isolats de mammites. Dans cette étude, le typage *agr* de *S. aureus* a permis de classer 91% des souches bovines et 60% des souches humaines dans le groupe spécifique *agr1*.

Or, la coexistence de différents profils de résistance aux antibiotiques dotés d'un système *agr* identique, dans une même niche écologique, pourrait constituer une étape importante, potentielle et un risque pour l'émergence puis la propagation de souches hautement résistantes chez les bovins.

La caractérisation moléculaire nous a fourni un aperçu unique de l'évolution adaptative à une nouvelle hôte de *S. aureus*, et l'impact de l'activité humaine sur l'adaptation d'un agent pathogène bactérien majeur. Le génotype t223 (CC22) décrit précédemment dans les infections humaines, a été détecté aussi bien chez les vaches élevées dans onze fermes distinctes qu'en portage nasal chez sept professionnels. Les gènes *sak*, *scn* et *chp* marqueurs spécifiques de souches humaines et une *tst1* humaine ont été révélés chez les génotypes t223 humains et t223 bovins. Toutefois un génotype de CC97 sévissant dans les élevages porte le cluster de gènes adaptés à l'évasion humaine *sak* et *chp*. À la lumière des résultats présentés ici, il est important que l'industrie agricole considère l'impact du transfert anthro-po-zoonotique des agents pathogènes pour agir en conséquence. La base moléculaire de l'adaptation à l'hôte a été élucidée, fournissant une assise solide pour les études futures de l'évolution des pathogènes, le développement des produits thérapeutiques vétérinaires et des stratégies de contrôle.

Au regard des mammites, bien que les lignées CC479, CC705, CC1, CC5, CC8, CC25 et CC188 soient décrites, la majorité des génotypes de *S. aureus* se rattachent principalement aux lignées CC97 et CC22. Ainsi, de multiples types-de-*spa* constituent le CC97, alors que seulement t223 compose le CC22. Par ailleurs, la diversité intra-cheptel, inter-quartier et même intra-quartier des génotypes observée, laisse conclure que les infections intra-mammaires à *S. aureus* ne sont pas entièrement et automatiquement le résultat d'une transmission d'une vache à l'autre. Des sources extra-mammaires de *S. aureus* incluant la peau de vache, les sites du corps et l'environnement de l'élevage sont supposées.

### Recommandations

Nous pouvons exploiter nos résultats pour, d'un côté et dans un premier temps, parvenir à limiter les facteurs prédisposant au risque zoonotique (anthro-po-zoonotique et zoo-anthro-po-zoonotique) de *S. aureus* multi-résistants chez les professionnels en contact avec les animaux, et d'un autre côté diminuer l'incidence des mammites chez les vaches.

Sous collaboration des médecins et des vétérinaires, plus d'attention devrait être portée pour mettre en application un programme d'épidémiolo-gie-surveillance approprié vis-à-vis des infections à

SARM. Ceci dépend aussi, de la volonté des pouvoirs publics à doter l'action d'épidémiologie d'un support législatif conforme et à créer les moyens financiers et techniques requis pour la prophylaxie. En termes de zoonose, il est recommandé de dépister le SARM régulièrement chez les professionnels ayant un contact étroit avec les animaux ainsi que leurs membres de famille. Les positifs à SARM doivent alors, être décontaminés par des bains à la chlorhexidine ou des traitements à la mupirocine. De plus, l'éducation des professionnels de bétail sur les risques zoonotiques et les intoxications alimentaires, ne fait qu'augmenter la prise de conscience à l'encontre de la limitation du risque de diffusion de clones très virulent et hautement résistants. Par ailleurs, la protection du territoire national, passe inévitablement par un dépistage systématique vis-à-vis de SARM zoonotique CC398 chez les animaux importés avec une attention particulière pour ceux provenant d'Europe. En cas de positivité, des mesures nécessaires et adéquates doivent être appliquées en conséquence. Enfin, l'identification appropriée du cheptel national et la restriction des mouvements des animaux sont requises à l'échelle nationale.

Les conclusions de notre travail ont montré que les mammites à réservoirs mammaires restent un sérieux problème tant dans les infections cliniques que subcliniques. Pour en réduire l'incidence et la prévalence, la mise en place de plans de lutte contre les mammites se justifie donc pleinement. Il faut agir à deux niveaux : limiter les nouvelles infections et diminuer les taux des infections existantes. Ainsi il est recommandé de :

- Dépister via CMT à intervalle régulier toutes les vaches en lactation pour traire les positives en fin de séquence.
- Assurer un contrôle annuel et une maintenance régulière de la machine à traire.
- Instaurer un traitement précoce et adapté aux mammites cliniques ainsi qu'une couverture antibiotique systématique au cours de la période sèche.
- Réformer les vaches présentant des mammites récidivantes rebelles aux traitements.
- Dépister les porteurs sains à *S. aureus*, décontaminer les porteurs de SARM et respecter les règles d'hygiène

Enfin, des mesures de désinfection des trayons et des bonnes pratiques quotidiennes de la traite doivent être bien suivies afin de diminuer le risque de survenue des mammites staphylococciques chez la vache. En plus de l'hygiène des mains des trayeurs et de la machine à traire, le lavage des trayons avant chaque traite et l'essuyage des quartiers lavés doivent être régulièrement effectués. Une fois la traite est réalisée, il est donc nécessaire de désinfecter les trayons en trempant ces derniers dans une solution antiseptique. Le trempage des trayons a pour but de réduire la

population microbienne de surface et d'obstruer le canal du trayon qui reste ouvert pendant presque une heure après la fin de la traite. En définitive, des mesures visant à limiter les risques extrinsèques relatifs à l'alimentation, aux infections intercurrentes ainsi qu'à tous les facteurs pouvant porter atteinte au bien être animal doivent être pris en considération pour assurer une production laitière optimale.

Vu le gain qu'apportent les techniques moléculaires en terme de pertinence diagnostique, il sera possible de poursuivre cette recherche et de répondre à d'autres questions épidémiologiques. Pour instaurer des mesures prophylactiques adéquates vis-à-vis de SARM, la surveillance moléculaire de la dynamique des clones de *Staphylococcus aureus* est requise aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Ainsi, l'étude de la spécificité d'hôte de *Staphylococcus aureus* chez différentes espèces animales est à recommander. La durée de l'étude ne permet pas de suivre l'évolution du portage chez les professionnels. En effet, la discrimination entre les porteurs permanents et les porteurs intermittents chez les professionnels ayant un contact étroit avec les animaux nécessite des enquêtes de longue haleine. Ces dernières sont en effet, nécessaires pour la surveillance moléculaire des clones responsables de mammites chez les animaux de rente. De plus, il n'en demeure pas moins intéressant de la compléter par d'autres investigations visant les infections intramammaires dues aux autres germes. Enfin, en vue de hiérarchiser les facteurs de risque majeurs des infections intramammaires à *Staphylococcus aureus*, il semble nécessaire de poursuivre l'étude en retenant un nombre important de facteurs de risque.



*Références bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**A**

**Abera M, Demie B, Aragaw K, Regassa F & A Regassa, 2010.** Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town, Ethiopia. *J Vet Med Anim Health*, **2(3)**:29-34.

**Aires-de-Sousa M, Parente CE, Vieira-da-Motta O, Bonna IC, Silva DA & H de Lencastre, 2007.** Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl Environ Microbiol*, **73**:3845-3849.

**Akers RM, 2002.** Lactation and the mammary gland. 1st ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa.

**Amir LH, Garland SM & J Lumley, 2006.** A case-control study of mastitis: nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *BMC Familial Practice* 11, 57

**An Diep B, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF & F Perdreau-Remington, 2006.** Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, **367(9512)**:731-739.

**Anaya-Lopez JL, Contreras-Guzman OE, Carabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, Lopez-Meza JE, Valdez-Alarcon JJ & A Ochoa-Zarzosa, 2006.** Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res Vet Sci*, **81**:358-361.

**Andreoletti O, Budka H, Buncic S, Colin P, Collins ID, De Koeijer A, Griffin J, Havelaar A, Hope J, Klein G, Kruse H, Magnino S, Martínez López A, McLauchlin J, Nguyen-The Ch, Noeckler K, Noerrung B, Maradona MP, Roberts T, Vågsholm I & E Vanopdenbosch, 2009.** Assessment of the public health significance of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *EFSA J*, **993**:1-73.

**Antri K, 2014.** Caractérisation moléculaire des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline responsables d'infections et de portage. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en

sciences biologiques, option: microbiologie de l'environnement. Université science et technique Houari- Boumediène d'Alger, Algérie. 134p

**Antri K, Rouzic N, Boubekri I, Dauwalder O, Beloufa A, Ziane H, Djennane F, Neggazi M, Benhabyles B, Bes M, Tazir M, Etienne J & N Ramadani-Bougoussa, 2010.** Forte prévalence des infections communautaires et nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et portant le gène de la leucocidine de Panton-Valentine dans l'Algérois. *Path Biol*, **58**:e15-e20

**Antri K, Rouzic N, Dauwalder O, , Boubekri I, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Tazir M, Ramadani-Bougoussa & J Etienne, 2011.** High prevalence of community and hospital acquired infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin gene in Algiers. *Path Biol*, **58**:e15-e20.

## B

**Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto, K. & K Hiramatsu, 2002.** Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *The Lancet*, **359**:1819-1827.

**Barkema H & R Olde Riekerink, 2008.** Le CCS, le moment idéal pour l'échantillonnage. Le producteur de lait québécois. Septembre 2008:14-15.

**Barkema HW, Schukken YH & RN Zadoks, 2006.** Invited review: the role of cow' pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci*, **89**:1877-1895.

**Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, Galligan DT, Beibor ML & A Brand, 1997.** Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. *J Dairy Sci*, **80**:1592-1599.

**Barrio MB, Rainard P & G Prevost, 2006.** LukM/LukF<sup>+</sup>-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbs Infect*, **8**:2068-2074.

**Bates D, Maechler M, Bolker B & S Walker, 2015.** Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Software*, **67(1)**:1-48.

**Bekkhoucha SN, Cady A, Gautier P, Itim F & P-Y Donnio, 2009.** A portrait of *Staphylococcus aureus* from the other side of the Mediterranean Sea: molecular characteristics of isolates from Western Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **28**:553-555.

**Ben Zakour NL, Sturdevant DE, Even S, Guinane CM, Barbey C, Alves PD, Cochet MF, Gautier M, Otto M, Fitzgerald JR & Y Le Loir, 2008.** Genome wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core of genome. *J bacteriol*, **190**:6302-6317.

**Benhamed N, 2014.** Evaluation de la qualité microbiologique et sanitaire du lait cru dans la région d'Oran, Algérie : Etude du profil moléculaire virulent des *Staphylococcus aureus* impliquées dans les mammites bovines. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat Troisième cycle, option: contrôle microbiologique et hygiène alimentaire. Université d'Oran, Faculté des sciences de la nature et de la vie, département de biologie, Algérie. 112p.

**Benhamed N & M Kihal, 2013.** Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* agents of dairy cows' mastitis in Algeria. *J Appl Sci Res*, **9**:86-93.

**Biffa D, Debela E & F Beyene, 2005.** Prevalence and risk factors of mastitis in lactating dairy cows in southern Ethiopia. *Intern J Appl Res Vet Med*, **3(3)**:189-198.

**Blanc SD, Kuhn G & G Zanetti, 2010.** Critères et méthodes de différenciation des souches In : Le Loire Y, Gautier M (Eds), *Staphylococcus aureus*, Lavoisier, Paris, pp. 22-39.

**Boisset S & F Vandenesch, 2010.** Les facteurs de virulence autres que les entérotoxines In : Le Loire Y, Gautier M (Eds), *Staphylococcus aureus*, Lavoisier, Paris, pp. 244-276.

**Borm AA, Fox LK, Leslie KE, Hogan JS, Andrew SM, Moyes KM, Oliver SP, Schukken YH, Hancock DD, Gaskins CT, Owens WE & C Norman, 2006.** Effects of pre-partum intramammary antibiotic therapy on udder health, milk production, and reproductive performance in dairy heifers. *J Dairy Sci*, **89**:2090-2098.

**Botrel MA, Haenni M, Morignat E, Sulpice P, Madec JY & D Calavas, 2010.** Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France. *Foodborne Path Dis*, **7**: 479-487.

**Bouaziz, 2005.** Contribution à l'étude des infections intramammaires de la vache laitière dans l'Est Algérien. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat d'Etat, option: Pathologies de la

reproduction. Université Mentouri de Constantine, Faculté des sciences, département des sciences vétérinaires, Algérie. 213p.

**Boufaïda Asnoune Z, Butel MJ & R Ouzrout, 2012.** Prévalence des principales bactéries responsables de mammites subcliniques des vaches laitières au nord-est de l'Algérie. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, **65**:5-9.

**Bouزيد R, Hocine A, Maïfia F, Rezig F, Ouzrout R & K Touati, 2011.** Prévalence des mammites en élevage bovin laitier dans le Nord-Est algérien. *Liv Res Rur Dev*, **23**: Article #73.

**Brisabois A, Lafarge V, Brouillaud A, De Buyser ML, Collette C, Garin-Bastuji B & MF Thorel, 1997.** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : Situation en France et en Europe. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, **16**:452-471.

**Burn Y, Bes M & F Vandenech, 2007.** *Staphylococcus*. Précis de bactériologie Clinique 43:796-828©ESKA.

## C

**Catry B, Van Duijkeren E, Pomba MC, Greko C, Moreno MA, Pyorala S, Ruzauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Ungemach F, Torneke K, Munoz-Madero C, Torren-Edo J, Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM), 2010.** Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol Infect*, **138**:626-644.

**Cauda R & J Garau, 2009.** New insights concerning methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *Clin Microbiol Infect*, **15**:109e11.

**Cha JO, Lee JK, Jung YH, Yoo JI, Park YK, Kim BS & YS Lee, 2006.** Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J Appl Microbiol*, **101**:864-871.

**Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK & The Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team, 2003.** Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med*, **348** (14):1342-1347.

**Choi CS, Yin CS, Bakar AA, Sakwewi Z, Naing NN, Jamal F & N Othman, 2006.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthy adults, *J Microbiol Immunol Infect*, **39**:458-464.

**Clark NC, Weigel LM, Patel JB & FC Tenover, 2005.** Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob Agents Ch*, **49**(1):470-472.

**CLSI, 2007.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

**Collen D, Van, HB, Schlott B, Hartzmann M, Guhrs KH & HR Lijnen, 1993.** Mechanisms of activation of mammalian plasma fibrinolytic system with streptokinase and with recombinant staphylokinase. *Eur J Biochem*, **216**:307-314.

**Corrigan RM, Rigby D, Handley P & TJ Foster, 2007.** The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiol*, **153**(8):2435-2446.

**Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I & JR Penades, 2001.** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*, **183**(9):2888-2896.

**Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I & JR Penades, 2004.** Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **72**:2177-2185.

## D

**Dahms C, Hübner N-O, Cuny C & A Kramer, 2013.** Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in farm workers and the livestock environment in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *Acta Vet Scand*, **56**:53.

**De Buyer ML, 2008.** Entérotoxines staphylococciques dans le lait cru et les fromages au lait cru. *Bulletin GTV*, **43**:37-42.

**De Buyser ML, Dufur B, Maire M & V Lafarge, 2001.** Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol*, **67**:1-17.

**Delbès C, 2010.** Habitat In : Le Loire Y, Gautier M (Eds), *Staphylococcus aureus*, Lavoisier, Paris, pp. 58-64.

**Delmas G, Gallay A, Espié A, Haeghebaert S, Pihier N, Weill FX, De Valk H, Vaillant V & JC Désenclos, 2006.** Les toxi-infections collectives en France entre 1996 et 2005. *BEH*, **51-52**:418-422.

**Dinsmore RP, English PB, Gonzales RN & PM Sears, 1992.** Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical bovine mastitis. *J Dairy Sci*, **75**:2706-2712.

**Djoudi F, Bonura C, Benallaoua S, Touati A, Touati D, Aleo A, Cala C, Fasciana T & C Mammina, 2013.** Panton-Valentine leukocidin positive sequence type 80 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a staphylococcal cassette chromosome *mec* type IVc is dominant in neonates and children in an Algiers hospital. *New Microb*, **36**:49-56.

## E

**Elbably MA, Emeash HH & NM Asmaa, 2013.** Risk factors associated with mastitis occurrence in dairy herds in Benisuef, Egypt. *World's Vet J*, **3(1)**:05-10.

## F

**Fan J, Shu M, Zhang G, Zhou W, Jiang Y, Zhu Y, Chen G, Peacock SJ, Wan C, Pan W & EJ Feil, 2009.** Biogeography and virulence of *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, **4(7)**:e6216.

**Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE & NPJ Day, 2003.** How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol*, **185(11)**:3307-3316.

**Ferens WA & GA Bohach, 2000.** Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigènes and internalization by host cells. *J Lab Clin Med*, **135**:225-230.

**Feßler A, Scott C, Kadlec K, Ehricht R, Monecke S & S Schwarz, 2010.** Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother*, **65**:619-625.

**Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR & JM Musser, 2001b.** Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *P Nat Acad Sci USA*, **98**(15):8821-8826.

**Foster TJ, 2005.** Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Micro*, **3**(12):948-958.

**Fournier C, Kuhnert P, Frey J, Miserez R, Kirchhofer M, Kaufmann T, Steiner A & HU Graber, 2008.** Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res Vet Sci*, **85**:439-448.

**Fox LK & JM Gay, 1993.** Contagious mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **9**: 475-487.

**Freney J, 2007.** Précis de bactériologie clinique. Paris: Éd. Eska.

## G

**G/Michael L, Deressa B, Begna F & A Mekuria, 2013.** Study on prevalence of bovine mastitis in lactating cows and associated risk factors in and around Areka town, Southern of Ethiopia. *Afr J Microbiol Res*, **7**(43):5051-5056.

**García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Masckell DJ & MA Holmes, 2011.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*, **11**:595-603.

**Garzoni Ch & WL Kelley, 2009.** *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends in Microbiol*, **17**(2):59-65.

**Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, DeBoy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli SV, Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, Dimitrov G, Jiang L, Qin H,**

**Weidman J, Tran K, Kang K, Hance IR, Nelson KE & CA Fraser, 2005.** Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol*, **187**(7):2426-2438.

**Goerke C, Pantucek R, Holtfreter S, Schulte B, Zink M, Grumann D, Broker BM, Doskar J & C Wolz, 2009.** Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J Bacteriol*, **191**(11):3462-8.

**Goerke C, Wirtz C, Flückiger U & C Wolz, 2006.** Extensive phage dynamics in *Staphylococcus aureus* contributes to adaptation to the human host during infection. *Mol Microbiol*, **61**:1673-1685.

**Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schuberth HJ, Brunner RM, Kata SR & HM Seyfert, 2004.** Mastitis increase mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diag Lab Immunol*, **11**:174-185.

**Gould IM, 2007.** MRSA Bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents*, 30 suppl 1, S66-77.

**Graber HU, Naskova J, Studer E, Kaufmann T, Kirchhofer M, Brech-bühl M, Schaeren W, Steiner A & C Fournier, 2009.** Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. *J Dairy Sci*, **92**:1442-1451.

**Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Lew D & T Foster, 1995.** Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol Microbiol*, **17**(6):1143-1152.

**Guinane CM, Ben Zakour NL, Tormo-Mas MA, Weinert LA, Lowder BV, Cartwright RA, Smyth DS, Smyth CJ, Lindsay JA, Gould KA, Witney A, Hinds J, Bollback JP, Rambaut A, Penades JR & JR Fitzgerald, 2010.** Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis ruminant host adaptation. *Genome Biol Evol*, **2**:205-213.

**Guinane CM, Sturdevant DE, Herron-Olson L, Otto M, Smyth DS, Villaruz AE, Kapur V, Hartigan PJ, Smyth CJ & JR Fitzgerald, 2008.** Pathogenomic analysis of the common Bovine *Staphylococcus aureus* clone (ET3): Emergence of a virulent subtype with potential risk to public health. *J Infect Dis*, **197**(2):205-213.

## H

**Halasa T, Huijps K, Osterds O & H Hogeveen, 2007.** Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet Quarter*, **29(1)**:18-31.

**Halasa T, Nielen M, De Roos AP, Van HR, de JG, Lam TJ, van WT, Hogeveen H & HR Van, 2009.** Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. *J Dairy Sci*, **92**:599-606.

**Hanselman BA, Kruth SA, Rousseau J, Low DE, Willey BM, McGeer A & JS Weese, 2006.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel. *Emerg Infect Dis*, **12(12)**:1933-1938.

**Haran KP, Godden SM, Boxrud D, Jawahir S, Bender JB & S Sreevatsan, 2012.** Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. *J Clin Microb*, **50(3)**:688-695.

**Harmon RJ, 1994.** Symposium: mastitis and genetic evaluation for somatic cell count. *J Dairy Sci*, **77**:2103-2112.

**Harmon RJ, 2001.** Somatic cell counts: a primer. Pages 3-9 in Proc. 40st Annu. Mtg. Natl. Mastitis Counc., Reno, Nevada. Natl. Mastitis Counc., Madison, WI.

**Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D & U Vogel, 2003.** Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol*, **41**:5442-5448.

**Hashimoto M, Tawaratsumia K, Kariya H, Kiyohara A, Suda Y, Krikae F, Krikae T & F Gotz, 2006.** Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, **177**:3162-3169.

**Hasman H, Moodley A, Guardabassi L, Stegger M, Skov RL & FM Aarestrup, 2010.** *Spa* type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. *Vet Microbiol*, **141**:326-331.

- Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Uchida I, Tanaka K & M Eguchi, 2010.** Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from Humans. *J Clin Microbiol*, **48**:2130-2139.
- Hebert A, Sayasith K, Sénéchal S, Dubreuil P & J Lagacé, 2000.** Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine Mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett*, **193**:57-62.
- Heilmann C, Niemann S, Sinha B, Herrmann M, Kehrel BE & G Peters, 2004.** *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (Fnbp)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnbpA but not by FnbpB. *J Infect Dis*, **190**:321-329.
- Hennekine JA & ML Buyser, 2010.** Toxigénèse de *S. aureus* dans les aliments : les toxico-infections alimentaires à staphylocoques in : Le Loire Y, Gautier M (Eds), *Staphylococcus aureus*, Lavoisier, Paris, pp. 244-276.
- Hensen SM, Pavicic MJ, Lohuis JA, de Hoog JA & B Poutrel, 2000.** Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J Dairy Sci*, **83**:1966-1975.
- Holden MT & JA Lindsay, 2008.** Whole Genomes: Sequence, Microarray and Systems Biology. In: *Staphylococcus: Molecular Genetics*. J. A. Lindsay (ed). Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Holden MTG, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NPJ, Enright MC, Foster TJ, Moore CE, Hurst L, Atkin R, Barron A, Bason N, Bentley SD, Chillingworth C, Chillingworth T, Churcher C, Clark L, Corton C, Cronin A, Doggett J, Dowd L, Feltwell T, Hance Z, Harris B, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, James KD, Lennard N, Line A, Mayes R, Moule S, Mungall K, Ormond D, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Sanders M, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG, Spratt BG & J Parkhill, 2004.** Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *P Nat Acad Sci USA*, **101**(26):9786-9791.
- Howden BP, Davies K, Johnson P D R, Stinear TP & M Lindsay Grayson, 2010.** Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, **23**(1):99-139.

Hwang SY, Park YK, Koo HC & YH Park, 2010. *spa* typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. *J Vet Sci*, **11**:125-131.

## I

Ikawaty R, Brouwer EC, Jansen MD, van Duijkeren E, Mevius D, Verhoef J & AC Fluit, 2009. Characterization of Dutch *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis using a multiple locus variable number tandem repeat analysis. *Vet Microbiol*, **136**:277-284.

Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H & K Hiramatsu, 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**: 2637-2651.

Janosi S & Z Baltay, 2004. Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk result of the California Mastitis Test and bacteriological status of the udder in dairy cows. *Acta Vet Hung*, **52**:173-183.

Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J & F Vandenesch, 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun*, **70**:631-41.

Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M & G Lina, 2001. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, **166**: 669-677.

Jayarao BM, Pillai SR, Sawant AA, Wolfgang DR & NV Hegde, 2004. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *J Dairy Sci*, **87**:3561-3573.

Ji G, Beavis R & RP Novick, 1997. Bacterial interference caused by auto-inducing peptide variants. *Science*, **276**:2027-2030.

Jorgensen HJ, Mathisen T, Lovseth A, Omoe K, Qvale KS & S Loncarevic, 2005. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol Lett*, **252**: 267-272.

## K

**Kaito C, Omae Y, Matsumoto Y, Nagata M, Yamaguchi H, Aoto T, Ito T, Hiramatsu K & K Sekimizu, 2008.** A novel gene, *fudoh*, in the *SCCmec* region suppresses the colonys preading ability and virulence of *Staphylococcus aureus*. *PLoSONE3*, e3921

**Kalmus P, Aasmäe B, Kärssin A, Orro T & K Kask, 2011.** Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet Scand*, **53**:7 pages.

**Katayama Y, Ito T & K Hiramatsu, 2000.** A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Ch*, **44**(6):1549-1555.

**Kateete DP, Kabugo U, Baluku H, Nyakarahuka L, Kyobe S, Okee M, Najjuka CF & ML Joloba, 2013.** Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from Milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. *Plos-One* **8**(5):e63413.

**Katsande S, Matope G, Ndengu M & DM Pfukenyi, 2013.** Prevalence of mastitis in dairy cows from smallholder farms in Zimbabwe. *Onderstepoort J Vet Res*, **80**(1), Art. #523, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.4102/ojvr.v80i1.523>

**Kerouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A & ML De Buyser, 2007.** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol*, **115**: 369-375.

**Kerro OD & F Tareke, 2003.** Bovine mastitis in selected areas of Southern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*, **35**:197-205.

**Khan SA, 2005.** Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid*, **53**:126-136.

**Kim C, Milheiriço C, Gardete S, Holmes MA, Holden MT, de Lencastre H & A Tomasz, 2012.** Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the b-lactam-resistant phenotype. *J Biol Chem*, **287**:36854-63.

**Kluytmans J, van Belkum A & H Verbrugh, 1997.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*, **10**(3):505-20.

**Knight GM, Budd EL, Whitney L, Thornley A, Al-Ghusein H, Planche T & JA Lindsay, 2012.** Shift in dominant hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) clones over time. *J Antimicrob Chemother*, **67**:2514-2522.

**Kock R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torne A, Witte W & AW Friedrich, 2010.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill*, **15**:19688.

**Koser CU, Ellington MJ, Cartwright EJ, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M et al., 2012.** Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PloS Pathog*, **8**:e1002824

**Kumar R, Yadav BR & RS Singh, 2011.** Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. *J Bio Sci*, **36**:175-188.

**Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H & K Hiramatsu, 2001.** Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**:1225-1240.

**Kwan T, Liu J, DuBow M, Gros P & J Pelletier, 2005.** The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *P Nat Acad Sci USA*, **102** (14):5174-5179.

## L

**Lebarbenchon C, Brown SP, Poulin R, Gauthier-Clerc M & F Thomas, 2008.** Evolution of pathogens in a man-made world. *Mol Ecol*, **17**(1):475-484.

**Lee SM, Ender M, Adhikari R, Smith JM, Berger-Bächli B & GM Cook, 2007.** Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by way of continuous culture. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**:1497-1499.

**Leyral G & E Vierling, 2007.** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. Doin Editions, 290p.

**Lindsay JA & MTG Holden, 2004.** *Staphylococcus aureus*: Superbug, super-genome?. *Trends Microbiol*, **12**:378-385.

**Lindsay JA & MTG Holden, 2006.** Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct Integr Genomics*, **6**(3):186-201.

**Lindsay JA, 2008.** *S. aureus* Evolution: Lineages and Mobile Genetic Elements (MGEs). In: *Staphylococcus: Molecular Genetics*. J. A. Lindsay (ed). Norfolk, UK: Caister Academic Press.

**Lindsay JA, 2010.** Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, **300**:98-103.

**Lindsay JA, Moore CE, Day NP, Peacock SJ, Witney AA, Stabler RA, Husain SE, Butcher PD & J Hinds, 2006.** Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *J Bacteriol*, **188**(2):669-676.

**Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N & RP Novick, 1998.** The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **29**(2):527-543.

**Liu W, Liu Z, Yao Z, Fan Y, Ye X & S Chen, 2015.** The prevalence and influencing factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in people in contact with livestock: A systematic review. *Amer J Infect control*, **43**:469-75.

**Loeffler A, Pfeiffer DU, Lloyd H, Smith DH, Soares-Magalhaes R & JA Lindsay, 2010.** Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in UK veterinary staff and owners of infected pets: new risk groups. *J Hosp Infect*, **74**:282-288.

## M

- Malik S, Vranken P, Silio M, Ratard R & R Van Dyke, 2009.** Prevalence of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization outside the healthcare environment. *Epidemiol Infect*, **137**:1237-41.
- Massey RC, Horsburgh MJ, Lina G, Höök M & M Recker, 2006.** The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission? *Nat Rev Microbiol*, **4(12)**:953-8.
- McCarthy AJ, Lindsay JA & A Loeffler, 2012.** Are all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) equal in all hosts? Epidemiological and genetic comparison between animal and human MRSA. *Vet Dermatol*, **23**:267-274.
- McCarthy NL, Sullivan PS, Gaynes R & D Rimland, 2010.** Health care-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a comparison of definitions. *Am J Infect Control*, **38**:600-606.
- McLauchlin J, Narayanan GL, Mithani V & G O'Neill, 2000.** The detection of enterotoxines and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J Food Prot*, **63**:479-488
- McShan WM & JJ Ferretti, 2007.** Prophages and their contribution to host cell phenotype. In: *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. S. McGrath & D. van Sinderen (eds). Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Melles DC, Tenover FC, Kuehnert MJ, Witsenboer H, Peeters JK, Verbrugh HA & A van Belkum, 2008.** Overlapping population structures of nasal isolates of *Staphylococcus aureus* from healthy Dutch and American individuals. *J Clin Microbiol*, **46(1)**:235-241.
- Mellmann A, Friedrich AW, Rosenkotter N, Rothgänger J, Karch H, Reintjes R & D Harmsen, 2006.** Automated DNA sequence-based early warning system for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks. *PLoS Med*, **3**:e33.
- Metzker ML, 2010.** Sequencing technologies-the next generation. *Nat Rev Genet*, **11**:31-46.
- Miller RR, Walker AS, Godwin H, Fung R, Votintseva A, Bowden R, Mant D, Peto TE, Crook DW & K Knox, 2014.** Dynamics of acquisition and loss of carriage of *Staphylococcus aureus* strains in the community: The effect of clonal complex. *J Infect*, **68**: 426-439.

**Miranda-Morales RE, Rojas-Trejo V, Segura-Candelas R, Sanchez-Gonzalez EM, Castor MG & FJ Trigo-Tavera, 2008.** Prevalence of pathogens associated with bovine mastitis in bulk tank milk in Mexico. *Ann N Y Acad Sci*, **1149**:300-302.

**Monecke S, Berger-Bächli B, Coombs C, Holmes A, Kay I, Kearns A, Linde HJ, ÓBrien F, Slickers P & R Ehricht, 2007.** Comparative genomics and DNA-array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leukocidin. *Clin Microbiol Infect*, **13**:236-249.

**Moodley A, Stegger M, Bagcigil AF, Baptiste KE, Loeffler A, Lloyd DH, Williams NJ, Leonard N, Abbott Y, Skov R & L Guardabassi, 2006.** spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. *J Antimicrob Ch*, **58**(6):1118-1123.

**Moore PCL & JA Lindsay, 2001.** Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J Clin Microbiol*, **39**:2760-2767.

**Moret-Stalder S, Fournier C, Miserez R, Albin S, Dohér MG, Reist M, Schaeren W, Kirchhofer M, Graber HU, Steiner A & T Kaufmann, 2009.** Prevalence study of *Staphylococcus aureus* in quarter milk samples of dairy cows in the Canton of Bern, Switzerland. *Prev Vet Med*, **88**:72-76.

**Mørk T, Kvitle B & HJ Jørgensen, 2012.** Reservoirs of *Staphylococcus aureus* in meat sheep and dairy cattle. *Vet Microbiol*, **155**:81-87.

**Mwangi MM, Wu SW, Zhou Y, Sieradzki K, de Lencastre H, Richardson P, Bruce D, Rubin E, Myers E, Siggia ED & A Tomasz, 2007.** Tracking the *in vivo* evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**:9451-9456.

## N

**Nemeghaire S, Argudin MA, Haesebrouck F & P Butaye, 2014.** Epidemiology and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage isolates from bovines. *BMC Vet Res*, **10**:153.

**NMC, 1990.** Microbiological procedures for the diagnosis of udder infection-3rd Edition. National Mastitis Council, Arlington, VA, USA.

**Nouwen JL, Fieren MW, Snijders S, Verbrugh HA & A van Belkun, 2005.** Persistent (not intermittent) nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is the determinant of CPD-related infections. *Kidney Int*, **67**:1084-92.

**Nouwen JL, Ott A, Kluytmans-Vandenbergh MF, Boelens HA, Hofman A, van Belkum A & HA Verbrugh, 2004.** Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a culture rule. *Clin Infect Dis*, **39**:806-11.

**Nübel U, Roumagnac P, Feldkamp M, Song JH, Ko KS, Huang YC, Coombs G, Ip M, Westh H, Skov R, Struelens MJ, Goering RV, Strommenger B, Weller A, Witte W & M Achtman, 2008.** Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**:14130-14135.

## O

**O'Neill AJ, Larsen AR, Skov R, Henriksen AS & I Chopra, 2007.** Characterization of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **45**:1505-1510.

**Ochman H, Lawrence JG & EA Groisman, 2000.** Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, **405**(6784):299-304.

**Olde Riekerink RG, Barkema HW, Scholl DT, Poole DE & DF Kelton, 2010.** Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Prev Vet Med*, **97**:20-28.

**Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S & K Shinagawa, 2002.** Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J Clin Microbiol*, **40**:857-862.

**Oppliger A, Moreillon Ph, Charrière N, Giddey M, Morisset D & O Sakwinska, 2012.** Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains acquired by pig farmers from pigs. *Appl Envir Microbiol*, **78**: 8010-8014.

**Ouchenane Z, Smati F, Rolain JM & D Raoult, 2011.** Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Algeria. *Path Biol*, **59**:e129-e132.

**Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE, Bravo-Patino A & VM Baizabal-Aguirre, 2007.** Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect*, **54**:399-409.

## P

**Pearce-Duvet JMC, 2006.** The origin of human pathogens: evaluating the role of agriculture and domestic animals in the evolution of human disease. *Biol Rev*, **81**(3):369-382.

**Pellerin JL, 2010.** Infections à *Staphylococcus aureus* chez l'animal (hors mammites) In : Le Loire Y, Gautier M (Eds), *Staphylococcus aureus*, Lavoisier, Paris, pp. 203-210.

**Pellerin J-L, Gautier M & Y Le Loir, 2010.** Identification de l'espèce au sein du genre In : Le Loire Y, Gautier M (Eds), *Staphylococcus aureus*, Lavoisier, Paris, pp. 01-22.

**Pereira PM, Filipe SR, Tomasz A & MG Pinho, 2007.** Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**:3627-3633.

**Peton V & Y Le Loir, 2014.** *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect genetics Evol*, **21**:602-615.

**Piccinini R, Tassi R, Dapra V, Pilla R, Fenner J, Carter B & MF Anjum, 2012.** Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J Dairy Res*, **79**:249-255.

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

**Prévost G, Mourey L, Collin DA & G Menestrina, 2001.** Staphylococcal pore-forming toxins. *Curr Top Microbial Immunol*, **257**:53-83.

## Q

**Quinn PJ, Carter ME, Markey B & GR Carter, 1994.** Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, London, UK, pp: 95-101.

## R

**R Core Team, 2015.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

**Rabello RF, Moreira BM, Lopes RM, Teixeira LM, Riley LW & AC Castro, 2007.** Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J Med Microbiol*, **56**:1505-1511.

**Radostits OM, Gay GC, Blood DC & KW Hinchillif, 2000.** Mastitis In: Veterinary Medicine, 9th Edition, Harcourt Limited, London pp. 603-700.

**Rainard P & F Gilbert, 2010.** Les mammites dues à *Staphylococcus aureus* In : Le Loire Y, Gautier M (Eds), *Staphylococcus aureus*, Lavoisier, Paris, pp. 211-232.

**Rainard P, 2007.** *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/F' is secreted and stimulates neutralizing antibody response in the course of intramammary infection. *Vet Res*, **138**:685-696.

**Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, Froey F, Reverdy ME, Lina G, Vandenesch F, Tazir M & J Etienne, 2006.** Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying Panto-Valentine leuкеucidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, **50(3)**:1083-1085.

**Resch G, François P, Morisset D, Stojanov M, Bonetti EJ, Schrenzel J, Sakwinska O & Ph Moreillon, 2013.** Human-to-Bovine jump of *Staphylococcus aureus* CC8 is associated with the loss of a  $\beta$ -hemolysin converting prophage and the acquisition of a new staphylococcal cassette chromosome. *PLoS ONE*, **8(3)**: doi: 10.1371/journal.pone.0058187;

**Rooijackers SH, Ruyken M, Roos A, Daha MR, Presanis JS, Sim RB, van Wamel WJ, van Kassel KP & JA van Strijp, 2005.** Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol*, **6**: 920-927

**Rosec JP & O Gigaud, 2002.** Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int J Food Microbiol*, **77**:61-70.

**Rosec JP, Guirraud JP, Dalet C & N Richard, 1997.** Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int Food Microbiol*, **35**:213-221.

**Roy J-P, Du Tremblay D, DesCôteaux L, Messier S, Scholl D & É Bouchard, 2007.** Effect of precalving intramammary treatment with pirlimycin in nulliparous holstein heifers. *Can J Vet Res*, **71**:283-291.

**Ruimy R, Armand-Lefevre L, Barbier F, Ruppé E, Coccojaru R, Mesli Y, Maiga A, Benkalfat M, Benchouk S, Hassaine H, Dufourcq J-B, NarethCh, Sarthou J-L, Andremont A & EJ Feil, 2009.** Comparisons between geographically diverse samples of carried *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **191**:5577-5583.

**Ruzin A, Lindsay J & RP Novick, 2001.** Molecular genetics of SaPI1 - a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **41**(2):365-377.

## S

**Saidi R, Cantekin Z, Khelef Dj, Ergün Y, Solmaz H & R Kaidi, 2014.** Antibiotic susceptibility and molecular identification of antibiotic resistance genes of staphylococci isolated from bovine mastitis in Algeria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **21**(4): 513-520.

**Saidi R, Khelef Dj & R Kaidi, 2013.** Subclinical mastitis in cattle in Algeria: frequency of occurrence and bacteriological isolates. *J South Afri Vet Associa*, **84**: Art 929, 5 pages.

**Sakwinska O, Giddey M, Moreillon M, Morisset D, Waldvogel A & Ph Moreillon, 2011a.** *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. *Appl Environ Microbiol*, **77**:5908-5915.

**Sakwinska O, Morisset D, Madec J-Y, Waldvogel A, Moreillon Ph & M Haenni, 2011b.** Link between genotype and antimicrobial resistance in bovine mastitis-related *Staphylococcus aureus* strains, determined by comparing Swiss and French isolates from the Rhône Valley. *Appl Environ Microbiol*, **77**:3428-3432.

**Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S & G Hascelik, 2005.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Ch*, **56**:519-523.

**Sanchini A & A Pantosti, 2011.** MRSA: new troubles from the animal farm. *Future Microbiol*, **6(10)**:1113-1115.

**Schepers AJ, Lam TJGM, Schukken YH, Wilmink JBM & WJA Hankamp, 1997.** Estimation of variance components in somatic cell counts to determine threshold for uninfected quarters. *J Dairy Sci*, **80**:542-547.

**Schijffelen MJ, Boel CH, van Strijp JA & AC Fluit, 2010.** Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics*, **11**:376.

**Schlotter K, Ehricht R, Hotzel H, Monecke S, Pfeiffer M & K Donat, 2012.** Leukocidin genes *lukF-P83* and *lukM* are associated with *Staphylococcus aureus* clonal complexes 151, 479 and 133 isolated from bovine udder infections in Thuringia, Germany. *Vet Res*, **43**:42. doi:10.1186/1297-9716-43-42.

**Schmidt KA, Manna AC, Gill S & AL Cheung, 2001.** SarT, a repressor of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **69(8)**:4749-4758.

**Scott PR, Penny CD & AI Macrae, 2011.** Cattle Medicine. Manson Publishing Ltd ISBN: 978-1-84076-127-6: pp216-235.

**Sears PM & KK McCarthy, 2003.** Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin Food Anim*, **19**:171-185.

**Seo KS, Lee SU, Parck YH, Davis WC, Fox LK & GA Bohach, 2007.** Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immune-suppression by bovine CD4+ and CD8+T cells. *Infect Immun*, **75**:260-269

**SFM, 2007.** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: recommandations. Société Française de Microbiologie, Soussy CJ.

**Sharif A & G Muhammad, 2009.** Mastitis control in dairy animals. *Pak Vet J*, **29(3)**:145-148.

**Shepherd MA, Fleming VM, Connor TR, Corander J, Feil EJ, Fraser C & WP Hanage, 2013.** Historical zoonoses and other change in host tropism of *Staphylococcus aureus*, identified by phylogenetic analysis of a population dataset. *PlosOne*, **8**:e62369.

**Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehricht R & DC Coleman, 2011.** Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**:3765-3773.

**Smith AJ, Jackson MS & J Bagg, 2001.** The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol*, **50**:940-946.

**Smith BP, 2009.** Large animal internal medicine. 4th ed. Mosby Elsevier. St. Louis, Mo.

**Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE & CG Dowson, 2005b.** Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*, **43**: 4731-4736.

**Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, Kruze JV, Bradley AJ, Zadoks RN & CG Dowson, 2005a.** Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*, **43**: 4737-4743.

**Smith TC & N Pearson, 2011.** The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **11**(4):327-339.

**Smyth DS, Feil EJ, Meaney WJ, Hartigan PJ, Tollersrud T, Fitzgerald JR, Enright MC & CJ Smyth, 2009.** Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, **58**(10):1343-1353.

**Spoor LE, McAdam PR, Weinert LA, Rambaut A, Hasman H, Aarestrup FM, Kearns AM, Larsen AR, Skov RL & JR Fitzgeralda, 2005.** Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio* **4**(4):e00356-13. doi:10.1128/mBio.00356-13.

**Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M & R Tellam, 2005.** Lipopolysaccharide and lipoteichoic induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine*, **31**:72-86.

**Stutz K, Stephan R & T Tasara, 2011.** *SpA*, *ClfA*, and *FnbA* genetic variations lead to *Staphaurex* test-negative phenotypes in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*, **49**:638-646.

**Su YC & AC Wong, 1995.** Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl Environ Microbiol*, **61**:1438-1443.

**Subedi A, Ubeda C, Adhikari RP, Penades JR & RP Novick, 2007.** Sequence analysis reveals genetic exchanges and intraspecific spread of SaPI2, a pathogenicity island involved in menstrual toxic shock. *Microbiol*, **153**(10):3235-3245.

**Sung JM, Lloyd DH & JA Lindsay, 2008.** *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiol*, **154**:1949-1959.

## T

**Tenover F, McDougal L, Goering R, Killgore G, Projan SJ, Patel JB & PM Dunman, 2006.** Characterisation of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J Clin Microbiol*, **44**:108-118.

**Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE & AR Horswill, 2010.** Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev*, **111**:117-151.

**Toma B, Dufour B, Sanaa M, Bénet JJ, Shaw A, Moutou F & A Louza, 2001.** Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies transmissibles majeures. 2nd ed. Paris : Jouve, 696 p

**Tormo MA, Ferrer MD, Maiques E, Ubeda C, Selva L, Lasa I, Calvete JJ, Novick RP & JR Penades, 2008.** *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *J Bacteriol*, **190**(7):2434-2440.

**Tsegaye B, Tekuash R & Y Abdurhaman, 2015.** Prevalence and potential risk factors of bovine mastitis in selected dairy farms of Dire Dawa Town, Eastern Ethiopia. *Appl J Hygiene*, **4**(1):06-11.

## U

Úbeda C, Barry P, Penades JR & RP Novick, 2007a. A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. *P Nat Acad Sci USA*, **104**(36):14182-14188.

Úbeda C, Maiques E, Knecht E, Lasa Í, Novick RP & JR Penadés, 2005. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol*, **56**(3):836-84.

Úbeda C, Maiques E, Tormo MÁ, Campoy S, Lasa Í, Barbé J, Novick RP & JR Penadés, 2007b. SaPI operon I is required for SaPI packaging and is controlled by LexA. *Mol Microbiol*, **65**(1):41-50.

## V

van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, Wertheim HFL & HA Verbrugh, 2009. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genetics Evol*, **9**:32-47.

van Duijkeren E, Hengeveld PD, Albers M, Pluister G, Jacobs P, Heres L & AW van de Giessen, 2014. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* in dairy cattle. *Vet Microbiol*, **171**:364-367.

van Wamel WJB, Rooijackers SHM, Ruyken M, van Kessel KPM & JAG van Strijp, 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol*, **188**(4):1310-1315.

Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F & P Butaye, 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiol Infect*, **138**:606-625.

Vincze S, Brandenburg AG, Espelagec W, Stamm I, Wielera LH, Kopp PA, Lübke-Beckera A & B Walther, 2014. Risk factors for MRSA infection in companion animals: Results from a case-control study within Germany. *Inter J Med Microbiol*, **304**:787-793.

Vincze S, Stamm I, Monecke S, Kopp PA, Semmler T, Wieler LH, Lubke-Becker A & B Walther, 2013. Molecular analysis of human and canine *Staphylococcus aureus* strains reveals

distinct extended-host-spectrum genotypes independent of their methicillin resistance. *Appl Environ Microbiol*, **79**:655-662.

## W

**Waldron DE & JA Lindsay, 2006.** Saul: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *Staphylococcus aureus* isolates of different lineages. *J Bacteriol*, **188**(15): 5578-5585.

**Walther B, Monecke S, Ruscher C, Friedrich AW, Ehricht R, Slickers P, Soba A, Wleklinski C-G, Wieler LH & A Lubke-Becker, 2009.** Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **47**(3):704-710.

**Wang D, Wang Z, Yan Z, Wu J, Ali T, Li J, Lv Y & B Han, 2015.** Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infect Gen Evol*, **31**:9-16.

**Watson K, Carville K, Bowman J, Jacoby P, Riley TV, Leach AJ & D Lehmann, 2006.** Upper respiratory tract bacterial carriage in aboriginal and non aboriginal children in a semi-arid area of western Australia. *Ped Infect dis J*, **25**:782-790.

**Weigel L, Clewell D, Gill S, Clark N, McDougal L, Flannagan S, Kolonay J, Shetty J, Killgore G & F Tenover, 2003.** Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, **302**(5650):1569-1571.

**Wellnitz O & RM Bruckmaier, 2012.** Review: The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J*, **192**: 148-152.

**Werckenthin C, Cardoso M, Martel JL & S Schwartz, 2001.** Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to Bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet Res*, **32**:341-362.

**Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA & JL Nouwen, 2005.** The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*, **5**:751-762.

**Wulf MWH, Sørum M, van Nes A, Skov R, Melchers WJG, Klaassen CHW & A Voss, 2007.** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. *Clin Microbiol Infect*, **14**:29-34.

## Y

**Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V & PM Schlievert, 2002.** Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem*, **277**(15): 13138-13147.

**Ye X, Liu W, Fan Y, Wang X, Zhou J, Yao Z & S Chen, 2015.** Frequency-risk and duration-risk relations between occupational livestock contact and methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* carriage among workers in Guangdong, China. *Am J Infect Cont*, **43**:676-81.

## Z

**Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J & YH Schukken, 2011.** Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mam Gland Biol Neo*, **16**:357-372.

**Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Dapra V & R Piccinini, 2006.** Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Path*, **40**:177-183.

A close-up photograph of a hand holding a pen, writing on a document. The image is slightly blurred and has a soft, warm light. The word "Annexes" is overlaid in a red, cursive font.

# *Annexes*

## ANNEXES

Annexe I : Fiche de renseignement des fermes (Mammites à *S. aureus*)

## I-Informations générales

1-Lieu ....., le...../...../2012 Lot-souchier n°:.....

2-Exploitation :..... Age :.....

3-Vétérinaire traitant01 :..... Mob :.....

4-Vétérinaire traitant02 :..... Mob :.....

5-Nombre de professionnels :..... Nombre de trayeurs :.....

6-Animaux élevés : Bovins  Ovins  Caprins Oiseaux  Canins  Équins 7-Nombre de têtes bovines:..... N<sup>bre</sup> d'enclos Bv :.....8-Mode d'élevage : Intensif  Semi-extensif  Extensif 9-Type de stabulation : Libre  Entravée 

## 10-Tableau :

Catégories	Vaches	Vaches en lactation	Taureaux	Génisses	Veaux
Nombre de têtes	.....	.....	.....	.....	.....

11-Type d'élevage : Laitier  Viandeux  Mixte 

## II-Usage des antibiotiques et apparition des résistances

1-Acquisition d'intrants récents (<1an) : Non  Oui  Nombre :.....

Origine :.....

2-Nombre d'interventions vétérinaires par année :.....

3-Mammites cliniques récentes (<1an) : Non  Oui  Nombre :.....4-Les mammites cliniques sont-elles traitées : Oui  Non 5-Mammites rebelles au traitement ATB : Non  Oui  Nombre :.....6-Dépistage des mammites subcliniques : Oui  Non



**Annexe II : Fiches individuelles des mammites cliniques et subcliniques**

**Fiche individuelle de dépistage des mammites subcliniques au California Mastitis Test (CMT)**

0 : (-) ; 1 : (±) ; 2 : (+) ; 3 : (++) ; 4 : (+++) : Score de la réaction

Quartiers : Antérieur Gauche (AG) ; Antérieur Droit (AD) ; Postérieur Gauche (PG) ; Postérieur droit (PD)

N° de vache	N° de lactation	Mois de lactation	CMT				Observations ou commentaires
			AG	AD	PG	PD	

**Fiche clinique (Mammite bovine)**

1-N° de lactation de la vache : ..... Mois de lactation : .....

**2-État de la mamelle**

Trayon			Quartier malade		
Blessures	Oui	Non	AG	Oui	Non
			AD	Oui	Non
Gerçures	Oui	Non	PG	Oui	Non
			PD	Oui	Non

3-Jour d'apparition : .....

4-La mammite est-elle traitée : Non  Oui  Depuis quand : .....

5-Quel type de traitement : Injecteurs intramammaires

Traitement général

Pommade dermique

**6-Examen du lait / Examen clinique**

Jour de la visite	Examen du lait	Examen clinique	
		Général	Local
	Normal	Abattement	Congestion
	Petits grumeaux	Fièvre	Douleur
	Grands grumeaux	Anorexie	Chaleur
	Séro-hémorragique	Diarrhée	

**Annexe III : Dépistage des mammites subcliniques**

Test de CMT (Schalm test): Il s'effectue avant la traite et implique le contrôle de tous les quartiers. Les mamelles sales doivent être nettoyées.

*Technique de réalisation de TEST de CMT: California Mastitis Test*

Procédure	Interprétation des résultats		
<p>&amp;- Traire pour chaque quartier quelques jets (sans écume!) de lait dans la palette du test.</p> <p>&amp;- Incliner la palette de manière à ne laisser que 2 à 3 mL de lait par récipient (niveau marqué)</p>			<p><b>négatif (-)</b> (pas de réaction) jusqu'à env. 250'000 cellules Le mélange lait-solution du test conserve la même fluidité</p>
<p>&amp;- Ajouter une quantité équivalente de solution test dans chaque récipient.</p>			<p><b>légèrement positif ou + &lt; 1.5 millions de cellules / mL</b> Formation de stries visibles uniquement lorsque la palette est en mouvement</p>
<p>&amp;- Mélanger par rotation horizontale pendant 30 secondes de lait et la solution test.</p> <p>&amp;- Évaluer la fluidité du mélange en inclinant la palette.</p>			<p><b>moyennement positif ou ++ &lt; 5 millions de cellules / mL</b> Formation nette d'une couche visqueuse. Possible de faire couler le mélange par portions.</p>
<p>&amp;- Interpréter les résultats</p>			<p><b>fortement positif ou +++</b> &gt; 5 millions de cellules / mL Formation d'une couche de gelée restant collée. Plus possible de faire couler le mélange par portions.</p>

Vue la subjectivité de différentiation entre le degré de la lyse cellulaire, on prend on compte uniquement l'aspect qualitatif de test.

**ANNEXE IV :**

**LETTRE D'INFORMATION AU PROFESSIONNEL**

**Caractérisation de *Staphylococcus aureus* isolé de mammites et impact sur les personnes à risque**

Service de Microbiologie – CHU Mustapha Bacha

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

**Madame, Monsieur,**

Vous allez participer à une étude épidémiologique entrant en compte dans la réalisation d'un travail de recherche universitaire réalisé par **Dr Akkou Madjid**, doctorant à l'école nationale supérieure vétérinaire d'Alger. La présente lettre vise à vous apporter l'ensemble des informations relatives à l'étude elle-même, à son déroulement et à votre participation.

**Présentation**

---

Les infections dues à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) provoquent deux fois plus de mortalité que celles dues à *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM). En Algérie la situation ne vaut pas mieux, car la fréquence des infections à SARM a atteint 42% en 2007 aussi bien en communauté qu'en milieu hospitalier.

Partant de ce constat, le but de cette étude est de caractériser la spécificité d'hôte et le risque zoonotique des souches de *Staphylococcus aureus*.

**Déroulement de l'étude et participation du professionnel**

---

Dans l'étude vous serez interrogés parallèlement à un écouvillonnage nasal pour nous fournir les renseignements requis pour notre enquête.

Votre collaboration et votre implication sont requises et doivent être des plus sincères et des plus pertinentes. En effet, les conséquences des infections à SARM sont nombreuses, aussi en satisfaisant à ces conditions d'exigence vos réponses pourront elles servir à une meilleure maîtrise des infections à SARM chez l'homme et l'animal.

Nous vous remercions de votre participation et de votre attention future et nous nous tenons à tout moment à votre entière disposition pour de plus amples informations.

**Dr Akkou Madjid**

**Doctorant à l'ENSV d'Alger**

[akkou-13@hotmail.com](mailto:akkou-13@hotmail.com)

**Formulaire de consentement**

**Titre de l'étude : Caractérisation de *Staphylococcus aureus* isolé de mammites et impact sur les personnes à risque**

Dr Akkou Madjid

Le but de cette étude est de caractériser la spécificité d'hôte et le risque zoonotique des souches de *Staphylococcus aureus* impliquées en portage chez les personnes ayant un contact étroit avec les animaux.

1. Je soussigné, ..... déclare avoir lu le document d'information et accepte de participer à l'étude de **Dr Akkou Madjid**.
2. J'ai reçu une explication concernant la nature, le but, la durée de l'étude et j'ai été informé de ce qu'on attend de ma part. On m'a remis une copie de ce formulaire de consentement éclairé, signé et daté, précédé d'un résumé de l'objectif de la recherche.
3. Je suis libre de participer ou non, de remplir le questionnaire, complètement ou non, d'abandonner ma participation à l'étude à tout moment sans qu'il soit nécessaire de justifier ma décision et sans que cela n'entraîne le moindre désavantage pour moi.
4. Les catégories de données qui seront utilisées dans le cadre de cette étude sont :
  - les réponses que j'ai données aux questionnaires de l'enquête
  - les résultats que j'obtiendrai aux différents tests pratiqués
5. J'accepte que ces données fassent l'objet de traitements ultérieurs à des fins scientifiques, en relation directe avec les objectifs de la recherche ci-dessus mentionnés. Mon nom, les réponses aux questionnaires et mes informations personnelles seront gardés confidentiels. Les responsables scientifiques de cette étude et les personnes qui traiteront les données s'engagent à respecter cette confidentialité de données.
6. J'accepte que les résultats de cette étude, qui seront toujours anonymisés, soient diffusés à des fins scientifiques et en respectant les règles déontologiques de la communauté scientifique.
7. Je peux à tout moment demander la consultation des données à caractère personnel collectées ou leur rectification sans frais. Ces données seront conservées durant le temps nécessaire à leur analyse et ce, jusqu'à un maximum de dix années. Le responsable du traitement de ces données, **Dr Akkou Madjid** peut être contacté à l'adresse suivante : [akkou-13@hotmail.com](mailto:akkou-13@hotmail.com)
8. Je consens de mon plein gré à participer à cette étude.

Nous vous remercions d'apposer la mention « lu et approuvé ».

\_\_\_\_\_  
*Signature du sujet/professionnel*  
*(jour/mois/année)*

\_\_\_\_\_  
*Date*

Je confirme que j'ai expliqué la nature, le but et la durée de l'étude à l'étudiant(e) mentionné ci-dessus.  
Le sujet confirme son accord de participation par sa signature personnelle datée.

\_\_\_\_\_  
*Signature de la personne qui procure l'information*

\_\_\_\_\_  
*Date (jour/mois/année)*

\_\_\_\_\_  
*Nom en lettres capitales de la personne qui procure l'information*



**Annexe VI : Test de sensibilité aux antibiotiques et interprétation**

**Tableau 1 :** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition de l'antibiogramme selon le CLSI

Classe d'ATB	Antibiotiques	Charge du disque	Diamètres critiques		
			Résistant	Intermédiaire	Sensible
<b>β-lactamines</b>	Pénicilline	10 UI	≤28	--	≥29
	Oxacilline*	5µg	--	--	≥20
	Céfoxitine	30µg	≤19	--	≥20
<b>Aminosides</b>	Gentamicine	10µg	≤12	13-14	≥15
	Kanamycine	30µg	≤14	15-16	≥17
<b>Macrolides</b>	Érythromycine	15µg	≤13	14-22	≥23
	Clindamycine *	2UI	≤14	15-20	≥21
	Pristinamycine*	15µg	< 19	20-21	≥22
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine	30µg	--	--	≥15
	Teicoplanine	30µg	≤10	11-13	≥14
<b>Quinolones</b>	Ofloxacin	5µg	≤14		≥18
<b>Autres</b>	Cotrimoxazole	1.25/23.75µg	≤10	11-15	≥16
	Rifampicine	15µg	≤16	17-19	≥20
	Tétracycline	30µg	≤14	15-18	≥19
	Fosfomycine	30µg	≤12	13-17	≥18
	Acide fusidique*	10µg	<15	--	>22
	Mupirocine**	5 µg	<13	--	≥14

\*Ces zones critiques correspondent aux valeurs de la SFM : société Française de microbiologie.

\*\* Ces zones critiques ont été établis selon (Finaly *et al.*,1997).

**Annexe VII: Mélanges réactionnels (MIX)**

**Tableau 1 :** Mix pour amplification des gènes *mec A*, *mec C* et *gyr A*

Réactifs	Quantité en µL pour un essai
Tampon 10 X sans MgCl <sub>2</sub>	4
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	4
Amorces solution employ 2pico moles/µL	2
DNTP	4
Eau PPI	15
Taq polymérase	0,3

**Tableau 2: Mix pour amplification des gènes *agr I*, *agr II*, *agr III* et *agr IV***

Réactifs	Quantité en $\mu\text{L}$ pour un essai
Tampon 10 X sans $\text{MgCl}_2$	5
$\text{MgCl}_2$ 50 mM	4
Amorces : <i>agr I</i> , <i>agr II</i> , <i>agr III</i> , <i>agr IV</i> , Pan <i>agr</i>	2
DNTP	4
Eau PPI	22
Taq polymérase	0,4 ou 0,5 selon les lots

**Tableau 3: Mix pour amplification du gène *spa***

Réactifs	Quantité en $\mu\text{L}$ pour un essai
Tampon 10 X sans $\text{MgCl}_2$	5
$\text{MgCl}_2$ 50 mM	1,5
Amorces <i>spa</i> :	1
DNTP	5
Eau PPI	31
Taq polymérase	0,4 à 0,5



## RESEARCH ARTICLE

### Phenotypic and Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Bovine Mastitis and Nasal Carriage of Workers in Contact to Animals in Algeria

Madjid Akkou<sup>1,2\*</sup>, Kenza Antri<sup>3</sup>, Mohamed-Azzedine Bachtarzi<sup>4</sup>, Michèle Bes<sup>5,6</sup>, Anne Tristan<sup>5,6</sup>, Olivier Dauwalder<sup>5,6</sup>, Rachid Kaidi<sup>7</sup>, Hélène Meugnier<sup>5,6</sup>, Mohamed Tazir<sup>4</sup>, Jérôme Etienne<sup>5,6</sup>, Frédéric Laurent<sup>5,6</sup> and Nadjia Ramdani-Bougoussa<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, 16000, Alger, Algérie; <sup>2</sup>Institut des Sciences Vétérinaires, Université Blida1, 09000, Blida, Algérie; <sup>3</sup>Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, USTHB, 16000, Alger, Algérie; <sup>4</sup>Service de Microbiologie, CHU Mustapha-Bacha, 16000, Algérie; <sup>5</sup>Inserm U851, IFR 128, CNR des Staphylocoques, Université Lyon 1, 69008, Lyon, France; <sup>6</sup>Centre de biologie Est, Hospices Civils de Lyon, 69500 Bron, France; <sup>7</sup>Laboratoire des Biotechnologies de la Reproduction, Institut Vétérinaire Blida, 09000, Algérie

\*Corresponding author: akkou.m@gmail.com

#### ARTICLE HISTORY (15-309)

Received: June 17, 2015  
Revised: October 23, 2015  
Accepted: December 06, 2015  
Published online: February 06, 2016

#### Key words:

*agr*  
Drug resistance  
Livestock workers  
Mastitis  
*S. aureus*

#### ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a major bovine mastitis pathogen responsible for heavy economic losses in dairy industry. Identification of epidemiological aspects associated with bovine mastitis may be helpful in treatment and management decisions. Due to high concern of zoonotic infections, we describe here, the distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *S. aureus* from both cows with mastitis and nasal carriage of workers in contact to animals. Up to 38% workers were nasal carriers. Besides, *S. aureus* was isolated among 74% dairy herds suffering from mastitis, within 29.8% of mastitic quarter-milk samples. The isolates were tested for antimicrobial resistance, *gyr*, *mecA*, *mecC* and *agr* alleles. The gene *gyr* was detected in all *S. aureus* strains, 91 (77.7%) belonged to *agr* specificity group I, 11.9% affiliated to group II, 10 (8.5%) were *agr*III, and 1.7% human derived isolates to the group IV. *agr* I was dominant in both human and animal isolates with 60 and 91%, respectively. Four human isolates harbored *mecA* gene, while no *mecA* or *mecC* genes were found in bovine derived isolates. Overall, 92% human isolates and 86.5% of cows' derived strains were resistant to penicillin G. The resistance against non beta-lactam antibiotics was considerably greater in human than cows' derived isolates, while different patterns of resistance share the same ecological niches. The high association of penicillin resistance to *S. aureus* in bovine mastitis highlights periodic surveillance of antibiotic resistance in livestock.

©2015 PVJ. All rights reserved

**To Cite This Article:** Akkou M, Antri K, Bachtarzi MA, Bes M, Tristan A, Dauwalder O, Kaidi R, Meugnier H, Tazir M, Etienne J, Laurent F and Ramdani-Bougoussa N, 2016. Phenotypic and genotypic characterization of *staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis and nasal carriage of workers in contact to animals in Algeria. Pak Vet J, 36(2): 184-188.

#### INTRODUCTION

The evolution of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains is a serious cause of concern either for human and veterinary medicine (Antri *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015; Cengiz *et al.*, 2015). *S. aureus* is a persistent resident of the human nose in 20% of the healthy population, and intermittently carried by another 30% (Wertheim *et al.*, 2005). In humans, infections due to methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) are associated with a two-fold higher mortality rate compared to methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) (Cauda and Garau, 2009). In Algeria, the situation is no better in that,

since the frequency of MRSA infections reached 42% in 2007 both in community and hospital settings (Antri *et al.*, 2011). The genetic determinant of methicillin resistance (the *mecA* gene) is located in the staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*). The *mecA* gene encodes a modified penicillin binding protein (PBP) known as PBP2a, with a low affinity for b-lactams (Kim *et al.*, 2012). In 2011, a new variant (*mec*<sub>CLGA251</sub>) with 70% identity to *mecA* was described in MRSA isolates (Garcia-Alvarez *et al.*, 2011). The *mecC* (*mec*<sub>ALG251</sub>) gene encodes a PBP with 63% identity at the amino acid level with PBP2a, showing more affinity for oxacillin than for cefoxitin (Kim *et al.*, 2012; Mikail and Keskin, 2015).

The increasing evidence that MRSA can be transmitted in both directions, from human to animals and vice versa (Oppliger *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2015) is of special alarm, since *S. aureus* is responsible for about, one-third of clinical and subclinical mastitis in dairy cows (Botrel *et al.*, 2010). The accessory gene regulator (*agr*) was identified as a quorum sensing system in *S. aureus*. RNAIII is the major effector of *agr* system. It acts as a small RNA regulating the expression of many virulence factors, including most of those encoding cell-wall-associated and extra-cellular proteins (Thoendel *et al.*, 2010). The main reservoir of *S. aureus* is the infected quarter of udder, and transmission between cows usually occurs during milking process (Fox and Gay, 1993). Multi-resistant phenotypes and MRSA in intra-mammary dissemination have increasingly been described in cows and often produce incurable severe intra-herd infections (Feßler *et al.*, 2010). The present study aimed to describe the antimicrobial resistance patterns and molecular typing of *S. aureus* isolates involved in bovine mastitis and in carriage of workers in close contact to animals.

## MATERIALS AND METHODS

**Mastitis and milk sampling:** Cows' udders were examined by visual inspection and palpation for the presence of any lesion, pain, heat and swelling. Milk from each quarter was withdrawn and checked for any change in color and consistency. California Mastitis Test (CMT) was carried out on lactating cows according to procedures described by Quinn *et al.* (1994) to determine subclinical mastitis. Moreover, milk samples were collected from mastitic quarters according to the National Mastitis Council (NMC, 1990).

**Human nasal swabs:** After being informed about the importance and scientific benefits of our investigation, cooperative workers provided written informed consent for sampling. Nasal swabs were taken from the two nostrils and transported in the Amies transport medium (Pasteur Institute of Algeria) to laboratory for further procedures. Professional's related data were kept strictly confidential and were served only to the purpose of this study.

**Bacteriological examination of samples:** From each tube, 0.01mL of milk was inoculated in parallel onto heart and brain broth (BHIB), selective *chromogenic* medium *S. aureus*-select TM (Oxoid, Paris, France), nutritive agar medium supplemented with 5% of blood sheep, and Baird-Parker medium supplemented with 5% of egg yolk and 0.5% tellurite of potassium. In case of a negative primary culture, plates were inoculated from the enriched BHIB. A quarter was considered positive when growth of 100cfu/mL was detected from a sample. Samples yielding over than 2 bacterial species were considered to be contaminated (NMC, 1990). Nasal swabs were enriched overnight at 37°C onto BHIB than inoculated on selective *chromogenic* medium *S. aureus*-select TM and nutritive agar medium supplemented with 5% of blood sheep respectively. All plates were examined after 48h of incubation at 37°C.

***S. aureus* isolation and antimicrobial susceptibility testing:** The suspected colonies were isolated and identified by catalase, *Staphaurex* (*Pastaurex* *Staph*+,

Bio-rad, La-Coquette, France) and coagulase tests. Susceptibility to penicillin, oxacillin, cefoxitin, gentamicin, kanamycin, erythromycin, clindamycin, ofloxacin, teicoplanin, vancomycin, cotrimoxazole, tetracycline, rifampicin, fosfomycin, chloramphenicol and mupirocin for human isolates was determined by the disk diffusion method, as recommended by CLSI (2007). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie interpretative criteria were used for pristinamycin and fusidic acid SFM (2007). Cefoxitin-resistant and/or oxacillin-resistant phenotypes were supposed to be MRSA.

**DNA extraction, *mec A*, *mec C* and *agr* groups typing:** Genomic DNA was prepared using DNeasy tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), after enzymatic lysis with lysis buffer and lysis enhancer. *gyr* amplification using multiplex PCR with *gyr-1* 5'-AGTACATCGTCGTATAC TATATGG-3' and *gyr-2* 5'-ATCACGTAACAGTTCAA GTGTG-3' primers, was used to confirm the quality of each DNA extract and the absence of PCR inhibitors. The primers: *agr1* 5'-GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT-3', *agr2* 5'-TATTACTAATTGAAAAGTGCCATAG C-3', *agr3* 5'-GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATA CC-CAG-3', *agr4* 5'-CGATAATGCCGTAATACCCG-3' and pan *agr* 5'-ATGCACATGGTGCACATGC-3' were used to determine *agr* alleles. In addition, methicillin resistance gene *mecA* and *mecC* were identified by PCR, using *mecA-1* 5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3, *mecA-2* 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3 and *mec*<sub>ALGA251</sub> MultiFP 5'-GAAAAAAGGCTTAGAACGCCCT C-3', *mec*<sub>ALGA251</sub> MultiRP 5'-GAAGATCTTTTCCGTT TTCAGC-3' primers respectively as described elsewhere (Antri *et al.*, 2011; Garcia-Alvarez *et al.*, 2011). Based on the Array Tube platform (CLONDIAG, Jena, Germany), MRSA isolates were genotyped, using the StaphyType test (Alere, Technologies GnbH, Jena, Germany) following the manufacturer's instruction. Genotypes with *mecA* or *mecC* genes were considered MRSA.

**Statistical analysis:** Chi-square ( $\chi^2$ ) tests, with Yates' continuity correction when needed and nonparametric tests allowing independence analysis between random variables were used. P<0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Descriptive data

**Cows:** Among 31 Algerian mastitis-positive herds, 218 quarter-milk samples were collected from 14 cows with clinical mastitis and 102 cows with CMT-positive subclinical mastitis. *S. aureus* was isolated from 65 samples of 45 cows. One quarter was affected in 32 cows, two in 7 cows, three in 5 and four quarters in one cow. One to six strains were isolated from each *S. aureus*-positive herd. Growth of *S. aureus* was observed on 29.8% milk samples (41.1% clinical cases; 28% subclinical quarters). For two subclinical quarters, two distinct strains of *S. aureus* were found. Thus, 67 isolates were collected from 65 quarters of 45 cows in 23 different herds (Table 1).

**Human:** Only workers that were directly in contact with animals were included in the study, which resulted in the sampling of 129 persons. Forty-nine (38%) workers were

**Table 1:** Isolation and identification of *S. aureus* from human and bovine mastitis samples in Algeria

Characteristics	Humans		Animals	
	No.	%	No.	%
<b>Identification</b>				
No. subjects	129	100	218	100
Prevalence	49	37.98	65	29.81
No. of isolates	50	38.75	67	30.73
<i>gyr</i> typing	50	38.75	67	30.73

**Table 2:** Antimicrobial resistance frequencies of Human and bovine related *S. aureus* isolates.

Antimicrobial agents	Human isolates (n=50)		Animal isolates (n=67)		P value
	No.	%	No.	%	
Penicillin	46	92.0	58	86.5	NS
Oxacillin	4	8.0	0	0.0	
Cefoxitin	4	8.0	0	0.0	
Gentamycin	0	0.0	0	0.0	
Kanamycin	9	18.0	1	1.5	<0.05
Erythromycin	16	32.0	3	4.5	<0.05
Clindamycin	9	18.0	2	3.0	<0.05
Pristinamycin	0	0.0	0	0.0	
Ofloxacin	0	0.0	0	0.0	
Vancomycin	0	0.0	0	0.0	
Teicoplanin	0	0.0	0	0.0	
Chloramphenicol	0	0.0	0	0.0	
Cotrimoxazole	0	0.0	0	0.0	
Fosfomycin	0	0.0	0	0.0	
Tetracycline	21	42.0	10	14.9	<0.05
Fusidic acid	1	2.0	1	1.5	NS
Rifampicin	0	0.0	0	0.0	
Mupirocin	0	0.0	--	--	--

NS, not significant

nasal carriers for *S. aureus*. From these latter, 42 were male and 7 were female, with a mean age of 36.4 (19 to 74) years and, a mean professional activity in close contact to animals of 12.5 (1 to 50) years (Table 1).

**Antibiotic susceptibility testing:** Four human related strains were found methicillin-resistant (*mecA* positive strains), while the remaining isolates were *mecA* and *mecC* negative strains (Fig.1).

Penicillin resistance was consistently detected and in proportions that did not significantly differ between human (46/50, 92%; including 4 MRSA,  $P>0.05$ ) and animals (58/67, 86.5%). Thirty-seven isolates (human 24/50, 48%; animal 13/67, 19.4%) were resistant to at least one of the non- $\beta$ -lactam antibiotics tested; however significant differences ( $P<0.05$ ) in this respect between species were noted. The differences (Table 2) were observed for resistance to tetracycline, erythromycin, clindamycin and kanamycin (the highest resistance was in human isolates).

**Antibiotic susceptibility patterns:** Antibiotic resistance determination revealed that 34/117 isolates (29%) were resistant to two or more antibiotics, but in proportion that significantly ( $P<0.05$ ) differ between human (46%) and animals (16.4%). Of the fifteen characterized patterns of resistance, a high diversity of profiles was detected among the human than bovine derived isolates, while four patterns were isolated either from human and animal samples. All the human MRSA derived isolates showed a *mec* complex A, *SCCmec* IV and resistance to erythromycin, clindamycin and tetracycline. Also, of the 4 MRSA isolates, two were resistant to kanamycin. From the animal methicillin-susceptible isolates, at least two different patterns of resistance were recovered from 9

farms. Moreover multiple patterns were incriminated in 4 udders, while PEN and PEN, ERY, CLI, TET shared the same quarter. Except for the pattern PEN which was detected in 18/23 (78.2%) of infected farms; the others were revealed within a maximum of three herds (Table 3).

***agr* specificity groups:** The representative data of the PCR products for the identification of *agr* specific groups for representative *S. aureus* (Fig. 2). Analysis of *agrD* gene polymorphism showed that all 117 *S. aureus* strains could be assigned to one of the four major *agr* specificity groups. Ninety-one (77.7%) belonged to *agr* specificity group I, 11 (11.9%) belonged to group II, 10 (8.5%) to group III, and 2 (1.7%) human derived isolates to the group IV (Table 4). *agr* specificity group I was constantly detected in proportions that did not differ between human (30/50, 60%) and animals (61/67, 91%). Moreover, *agr* specificity group I was recovered from 22 of the 23 (95.6%) *S. aureus*-positive farms, and co-existed with different *agr* specificity groups in five farms. Different *agr* specificity groups were also recovered from one quarter (PEN, *agr* I and PEN, *agr* II), and from one human nasal swab (PEN, *agr* IV and PEN, ERY, CLI, KAN, TET, *agr* I). In addition, two different patterns of resistance PEN, and PEN, ERY, CLI, TET with *agr* specificity group I co-existed on the same quarter.

## DISCUSSION

*Staphylococcus aureus* is an environmentally very robust bacterium surviving wide extremes of temperature and moisture; it is a major cause of intra-mammary infections in dairy cattle, and highly prevalent in farms with fewer than thirty cows (Kalmus *et al.*, 2011; He *et al.*, 2014; Javed *et al.*, 2015). In this report, *S. aureus* was isolated among 74% of herds (5 to 25 cows) suffering from mastitis. The apparent *S. aureus* herd prevalence reported herein is similar to those reported in a recently published Canadian study (Olde Riekerink *et al.*, 2010), but higher than those reported in the USA and in Mexico (Jayarao *et al.*, 2004; Miranda-Morales *et al.*, 2008). Overall, *S. aureus* is still considered one of the most common etiological agents associated with clinical and subclinical mastitis in lactating cows. It was blamed in 29.8% of bovine mastitis within higher proportion (41%) among the clinical cases in this investigation.

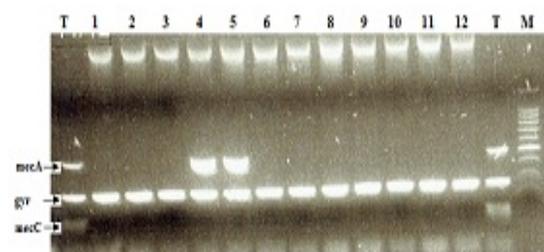
Several Algerian provincial studies showed high frequencies of *S. aureus* in bovine mastitis; it was responsible for 38.9% of bovine clinical and subclinical mastitis in Oran (Benhamed and Kihal, 2013). *Staphylococcus aureus* was also in charge for 30.3% and 40% of subclinical mastitis in eastern and centre provinces respectively (Saidi *et al.*, 2013; Boufaïda-Asnune *et al.*, 2012). However, comparison between results from different prevalence studies must be performed with caution since sample selection and bacterial cultivation techniques may differ.

From human colonization standpoint, prevalence and frequency of *S. aureus* isolation from workers in close contact to animals were relatively high (38% nasal carriers) and similar to the 36% rate reported in Switzerland on farm workers (Sakwinska *et al.*, 2011). Our prevalence however, was higher than that reported in western Algeria on healthy people of general population

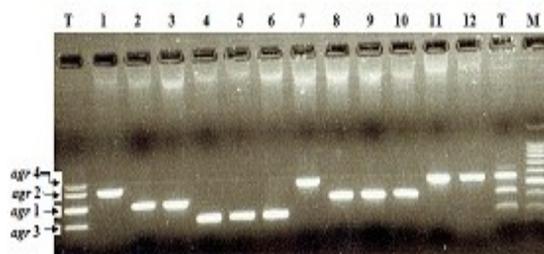
**Table 3:** Antibiotic resistance profiles of *S. aureus* isolated from professionals and bovine mastitis

Resistance profile	mecA	mecC	Total isolates (n=117)	Human isolates (n=50)	Mastitis isolates (n=67)		
					No.	No. of farms	Farms
PEN, OXA, ERY, CLI, KAN, TET	+	-	2	2	0	0	--
PEN, OXA, ERY, CLI, TET	+	-	2	2	0	0	--
PEN, ERY, CLI, KAN, TET	-	-	3	3	0	0	--
PEN, ERY, CLI, TET	-	-	4	2	2	2	B8, D2
PEN, ERY, KAN, TET	-	-	3	3	0	0	--
PEN, ERY, FU	-	-	1	0	1	1	B2
PEN, ERY, TET	-	-	3	3	0	0	--
PEN, KAN, TET	-	-	1	1	0	0	--
PEN, FU	-	-	1	1	0	0	--
PEN, TET	-	-	12	4	8	5	A5, A11, A12, A16, C1
PEN, ERY	-	-	1	1	0	0	--
PEN	-	-	71	24	47	18	A2, A5, A9, A10, A11, A15, A16, A17, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B8, C3, C4, C5
TET	-	-	2	2	0	0	--
KAN	-	-	1	0	1	1	A9
SENSIBLE	-	-	10	2	8	6	A8, A13, A15, B1, B3, B8

<sup>a</sup>PEN, penicillin ; OXA, oxacillin ; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; KAN, kanamycin; TET, tetracycline; FU, Fusidic acid; <sup>b</sup>A, Tizi-Ouzou; B, Boumerdès; C, Khenchela, D, Blida



**Fig. 1:** Agarose gel electrophoresis of PCR triple amplification of *mecA*, *mecC* and *gyr* genes for professional derived *S. aureus*. Lane M: 100bp DNA ladder. Lane T: positive control with *mecA* (533 bp), *mecC* (138 bp), and *gyr* (280 bp).



**Fig. 2:** Analysis of PCR products for the identification of *agr* specific groups from professionals derived *S. aureus*. Lane M: 100 bp DNA ladder. Lane T: positive control with *agr I* (440 bp), *agr II* (550 bp), *agr III* (300 bp), and *agr IV* (650 bp).

**Table 4:** Frequency of *agr* specificity groups among the *S. aureus* strains tested

<i>agr</i> specificity groups	No. of <i>agr</i> specificity groups (%)		No. of <i>agr</i> specificity groups (%)	
	Total	Human isolates	Animal isolates	No. Farms
I	91 (77.7)	30 (60)	61 (91.0)	22 (95.6)
II	14 (11.9)	09 (18)	05 (07.4)	05 (21.7)
III	10 (08.5)	09 (18)	01 (01.4)	01 (04.3)
IV	02 (01.7)	02 (04)	00 (00.0)	00 (00.0)
Total	117 (100)	50 (100)	67 (100)	23 (100)

(Ruimy *et al.*, 2009). Variations in these studies related to populations, geographic areas, sampling procedure and methodologies might explain the difference observed.

The levels of antimicrobial resistance among isolates from bovine mastitis, farmers, and veterinarians were relatively different. The only exception was resistance to first-line-treatment penicillin G, which reached 86.5% and 92% in bovine mastitis and workers colonization,

respectively. This widespread resistance against penicillin G in Algeria can be attributed to the frequent and long term use of penicillin in therapeutics. The differences in prevalence of penicillin-resistant *S. aureus* in bovine mastitis observed between countries may be due to different management options to control *S. aureus* mastitis but possibly also by different use patterns of antimicrobials for mastitis treatment. Indeed, countries with a policy of prudent use of antibiotics in veterinary practices have shown lower levels of resistance compared to other countries (Kalmus *et al.*, 2011).

Recent reports from Belgium indicate that MRSA was involved in bovine nasal carriage within 19.8% farms, and responsible for Bovine mastitis in 10% of Belgium farms (Nemeghaire *et al.*, 2014). A study from China reported that 15.5% of bovine mastitis isolates were MRSA strains, and 38.2% MRSA strains had observed resistance to more than 8 classes of antibiotics (Wang *et al.*, 2015). In Algeria, increased rates of human MRSA infections were previously reported, both in hospital and community (Antri *et al.*, 2011). Occupational livestock contact showed 5.31 times increased risk of MRSA carriage using no contact as reference (Ye *et al.*, 2015). In this study, only four healthy individuals (3.1%) were colonized by MRSA strains while all mastitis derived isolates were MSSA. No discrepancy was found among data for phenotypic antimicrobial susceptibility test using disk diffusion method and PCR screening for *mecA* and *mecC* genes. Indeed all MRSA isolates showed expression of *mecA* gene; two strains were confirmed later as CC80, *SCCmec IV*, *agr III*, *PVL+* and two others as CC22, *SCCmec IV*, *agr I*.

With the exception to tetracycline, resistance to other antimicrobials than penicillin G in *S. aureus* isolates was rare (<5%) in strains isolated from cows with mastitis and markedly ( $P < 0.05$ ) lower than human isolates (table 2). Resistances genes in *S. aureus* are often plasmid-encoded and disseminate through *S. aureus* populations by horizontal gene transfer mechanisms leading to strains that are more resistant (Werckenthin *et al.*, 2001). While, similar rates of acquisition and loss of *S. aureus* strains were shown in carriers and non carriers' individuals (Miller *et al.* 2014), frequent exposure to the flora of close contacts may lead to mixed-clone *S. aureus* colonization or infection. Since different antimicrobial patterns shared the same ecological niches, the relatively high resistance

to multiple antibiotics of human isolates might constitute a potential important step and risk towards the emergence and spread of more resistant strains in cows. It has been reported that *agr* autoinducer receptor specificity groups may influence host ecology by enhancing or inhibiting the ability of an *S. aureus* isolate to colonize in the presence of resident strains, including other staphylococci (Ji *et al.*, 1997). In this study, *agr* specificity group I was dominant both in human and animal isolates with 60% and 91%, respectively. From bovine mastitis standpoint, different proportions of *agr* specificity groups were reported in previous studies (Kumar *et al.*, 2011; Benhamed and Kihal, 2013). The widespread of *agr* specificity group type I in our study can most likely reflect the contagious aspect of *S. aureus* in bovine mastitis.

At the end of this study, one can assume that *S. aureus* is highly prevalent in bovine dairy herds suffering from mastitis, and in nasal carriage of workers with contact to animals in Algeria. High levels of resistance to penicillin G were noted both in human and mastitic derived isolates. Further concern was the detection of different patterns of resistance on same ecological niches, as well as methicillin resistant *S. aureus* in human.

**Acknowledgements:** This study was carried out in a framework of a co-operation project DPGRF/INSERM (U851). We are grateful for the staff of Centre National de reference des staphylocoques for their excellent technical support. Thanks also to Di-Med laboratory, Algeria for providing *chromogenic* medium.

**Author's contribution:** MA, NRB, RK, FL, MB and AT conceived and designed the experiments. MA, KA MB, and HM executed the experiment and analyzed the samples. MA, HM, OD and MB analyzed the data. All authors involved in collecting data and discussing the contents of the manuscript and agreed to publication.

## REFERENCES

- Antri K, Rouzic N, Boubekri I, Dauwalder O, Beloufa A *et al.*, 2011. High prevalence of community and hospital acquired infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin gene in Algiers. *Path Biol*, 58: e15-e20.
- Benhamed N and Kihal M, 2013. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* agents of dairy cows' mastitis in Algeria. *J Appl Sci Res*, 9: 86-93.
- Botrel MA, Haenni M, Morignat E, Sulpice P, Madec JY *et al.*, 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France. *Foodborne Path Dis*, 7: 479-487.
- Boufaïda Asnougne Z, Butel MJ and Ouzrout R, 2012. Prévalence des principales bactéries responsables de mammites subcliniques des vaches laitières au nord-est de l'Algérie. *Rev Elev Med Vet des pays trop*, 65: 5-9.
- Cauda R and Garau J, 2009. New insights concerning methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *Clin Microbiol Infect*, 15: 109e11.
- Cengiz S, Dinc G and Cengiz M, 2015. Evaluation of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from subclinical mastitis in cows. *Pak Vet J*, 35: 334-338.
- CLSI, 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Feßler A, Scott C, Kadlec K, Ehrlich R, Monecke S *et al.*, 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother*, 65: 619-625.
- Fox LK and Gay JM, 1993. Contagious mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 9: 475-487.
- Garcia-Alvarez L, Holden MTG, Lindsay H, Webb CR, Brown DFJ *et al.*, 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*, 11: 595-603.
- He JZ, Wang AQ, Liu G, Gao J, Ali T *et al.*, 2014. Biofilm formation and biofilm-associated genes assay of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in China. *Pak Vet J*, 34: 508-513.
- Javed S, Muhammad G, Saqib M and Hussain I, 2015. Comparative prevalence of streak canal and intramammary microorganisms and their contemporaneous association in a dairy cow and buffalo herd lacking mastitis control program. *Int J Agric Biol*, 17: 755-760.
- Jayarao BM, Pillai SR, Sawant AA, Wolfgang DR and Hegde NV, 2004. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *J Dairy Sci*, 87: 3561-3573.
- Ji G, Beavis R and Novick RP, 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, 276: 2027-2030.
- Kalmus P, Aasmäe B, Kärssin A, Orro T and Kask K, 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet Scand*, 53: 7 pages.
- Mikail N and Keskin I, 2015. Subclinical mastitis prediction in dairy cattle by application of fuzzy logic. *Pak J Agric Sci*, 52: 1105-1111.
- Kim C, Milheirico C, Gardete S, Holmes MA, Holden MT *et al.*, 2012. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the  $\beta$ -lactam-resistant phenotype. *J Biol Chem*, 287: 36854-63.
- Kumar R, Yadav BR and Singh RS, 2011. Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. *J Biosci*, 36: 175-188.
- Miller RR, Walker AS, Godwin H, Fung R, Votintseva A *et al.*, 2014. Dynamics of acquisition and loss of carriage of *Staphylococcus aureus* strains in the community: The effect of clonal complex. *J Infect*, 68: 426-439.
- Miranda-Morales RE, Rojas-Trejo V, Segura-Candelas R, Sanchez-Gonzalez EM, Castor MG *et al.*, 2008. Prevalence of pathogens associated with bovine mastitis in bulk tank milk in Mexico. *Ann N Y Acad Sci*, 1149: 300-302.
- Nemeghaire S, Argudin MA, Haesebrouck F and Butaye P, 2014. Epidemiology and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage isolates from bovines. *BMC Vet Res*, 10: 153.
- NMC, 1990. Microbiological procedures for the diagnosis of udder infection-3rd Edition. National Mastitis Council, Arlington, VA, USA.
- Olde Riekerink RG, Barkema HW, Scholl DT, Poole DE and Kelton DF, 2010. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Prev Vet Med*, 97: 20-28.
- Opplinger A, Moreillon Ph, Charrière N, Giddey M, Morisset D *et al.*, 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains acquired by pig Farmers from Pigs. *Appl Environ Microbiol*, 78: 8010-8014.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B and Carter GR, 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, London, UK, pp: 95-101.
- Ruimy R, Armand-Lefevre L, Barbier F, Ruppé E, Coccojaru R *et al.*, 2009. Comparisons between Geographically Diverse Samples of Carried *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 191: 5577-5583.
- Saidi R, Khelef D and Kaidi R, 2013. Subclinical mastitis in cattle in Algeria: frequency of occurrence and bacteriological isolates. *J South Afri Vet Assoc*, 84: Art 929, 5 pages.
- Sakwinska O, Giddey M, Moreillon M, Morisset D, Waldvogel A *et al.*, 2011. *Staphylococcus aureus* Host Range and Human-Bovine Host Shift. *Appl Environ Microbiol*, 77: 5908-5915.
- SFM, 2007. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: recommandations. Société Française de Microbiologie, Soussy CJ.
- Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE and Horswill AR, 2010. Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev*, 111: 117-151.
- Wang D, Wang Z, Yan Z, Wu J, Ali T *et al.*, 2015. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infect Gen evol*, 31: 9-16.
- Ye X, Liu W, Fan Y, Wang X, Zhou J *et al.*, 2015. Frequency-risk and duration-risk relations between occupational livestock contact and methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* carriage among workers in Guangdong, China. *Am J Infect Cont*, 43: 676-81.
- Werckenthin C, Cardoso M, Martel JL and Schwartz S, 2001. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to Bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet Res*, 32: 341-362.
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belcum A *et al.*, 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*, 5: 751-762.