



Université
de Liège



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE

UNIVERSITE DE LIEGE

FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE

DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET
PARASITAIRES

SERVICE DE BACTERIOLOGIE

**Bilan bactériologique des mammites dans les troupeaux
Zébu Azawak à la station expérimentale sahélienne de
Toukounous (Niger) et épidémiologie moléculaire des
Staphylococcus aureus isolés entre 2009 et 2012**



**Bacteriological assessment of mastitis in Azawak Zebu
herds at the Sahelian experimental station of
Toukounous (Niger) and molecular epidemiology of
Staphylococcus aureus isolated between 2009 and 2012**

Abdoulkarim ISSA IBRAHIM

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES

ANNEE ACADEMIQUE 2014-2015



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE

UNIVERSITE DE LIEGE

FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE

DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET
PARASITAIRES

SERVICE DE BACTERIOLOGIE

**Bilan bactériologique des mammites dans les troupeaux
Zébu Azawak à la station expérimentale sahélienne de
Toukounous (Niger) et épidémiologie moléculaire des
Staphylococcus aureus isolés entre 2009 et 2012**



**Bacteriological assessment of mastitis in Azawak Zebu
herds at the Sahelian experimental station of
Toukounous (Niger) and molecular epidemiology of
Staphylococcus aureus isolated between 2009 and 2012**

Abdoulkarim ISSA IBRAHIM

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES

ANNEE ACADEMIQUE 2014-2015

Dédicaces

Je dédie ce travail à ma famille :

A mon père Issa IBRAHIM et à ma mère Hadizatou MAHAMADOU, pour tout le soutien que vous n'avez sans cesse apporté le long de ma formation.

A mes frères et sœurs, Ibrahim, Abdoukader, Zalifa, Aissata et Djamila.

A Ousseina Oumarou Roua

A la famille Mamadou IBRAHIM

A la famille Kandine IBRAHIM

A la famille Arnaud RIBES

"J'ai exécuté mes investigations dans l'intérêt de la santé publique, à laquelle, j'espère, elles apporteront le plus grand avantage" Robert Koch.

Sommaire

Remerciements	vi
Résumé	viii
Summary	xi
Liste des abréviations.....	xiv
INTRODUCTION GÉNÉRALE	17
PARTIE 1 : Le contexte de l'étude	21
1.1. Le Niger.....	21
1.2. La race zébu Azawak.....	24
1.2.1. Article de synthèse: Le Zébu Azawak dans l'élevage bovin au Sahel	24
1.3. La zone d'étude	32
1.3.1. Présentation générale	32
1.3.2. Structure des troupeaux	33
1.3.3. Alimentation des animaux	34
1.3.4. Suivi sanitaire des animaux	35
PARTIE 2 : Les mammites bovines.....	36
2.1. Les aspects cliniques	36
2.1.1. Les mammites subcliniques	36
2.1.2. Les mammites cliniques	37
2.2. Les mécanismes de défense de la mamelle	38
2.2.1. Au niveau du trayon.....	38
2.2.2. Au niveau de la glande mammaire	38
2.3. Les bactéries mammopathogènes	39
2.3.1. Les agents étiologiques contagieux	40
2.3.2. Les agents étiologiques de l'environnement.....	42
2.3.3. Les autres agents étiologiques	44
2.4. Les mammites à <i>S. aureus</i>	45

2.4.1.	Les facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>	45
2.4.2.	Les outils épidémiologiques pour l'étude de <i>S. aureus</i>	51
2.4.3.	La prévention et la lutte contre les mammites à <i>S. aureus</i>	52
OBJECTIFS.....		58
RESULTATS		60
PARTIE 1: Bactériologie		61
1.1.	Préambule	61
1.2.	Article 1 : Bacterial mastitis in the Azawak zebu breed at the Sahelian experimental station in Toukounous (Niger): Identification and typing of <i>Staphylococcus aureus</i>	63
1.3.	Article 2: Typing of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from subclinical mastitis in Azawak zebu cows at the Sahelian experimental farm of Toukounous, Niger: a three-year long longitudinal and transversal study.....	75
1.4.	Article 3: Antibiotic resistance trends of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated between 2010 and 2012 from mastitis cases in Azawak zebu in Niger	102
PARTIE 2 : Prévention.....		111
2.1.	Préambule	111
2.2.	Article 4: Efficacy of Antisepsis Measures during Manual Milking on the Prevalence of Bacterial Mastitis at the Sahelian Experimental Station of Toukounous (Niger).	112
DISCUSSION GENERALE		120
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		131
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		135

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens particulièrement à remercier mes Promoteurs ainsi que tous les membres de mon Comité de thèse pour le suivi attentif dont j'ai fait l'objet tout au long de mes travaux.

Je tiens tout d'abord à rendre un vibrant hommage au Professeur Jacques MAINIL, promoteur de cette thèse. Depuis la formation doctorale, jusqu'à l'aboutissement de ce travail, vous avez toujours répondu promptement à toutes mes sollicitations. J'ai beaucoup bénéficié de votre grande disponibilité, et surtout de votre grande rigueur scientifique et de votre parfaite expérience. J'ai été particulièrement très touché par vos qualités humaines. Trouvez ici, le témoignage de ma plus vive reconnaissance.

J'exprime ma profonde gratitude au Professeur Rianatou BADA- ALAMBEDJI, pour l'appui constant à la réalisation de cette thèse. Professeur, vous m'avez enseigné à l'école vétérinaire de Dakar, puis encadré ma thèse de doctorat vétérinaire, co-encadré ce présent travail, et j'espère que le meilleur reste encore à venir dans cet appui constant que vous avez démontré. Cher Professeur, merci du fond du cœur pour votre soutien.

Mes sincères remerciements vont également à l'endroit du Professeur Annick LINDEN et Dr Bernard TAMINIAU membres de mon Comité de thèse pour vos diverses contributions scientifiques dans la réalisation de ce travail, mais aussi pour vos sages conseils dont vous m'avez prodigué le long de mon séjour en Belgique.

Je remercie également les membres du jury qui ont bien voulu accepter l'évaluation de mon travail malgré leurs multiples occupations. Il s'agit particulièrement des membres externes à la faculté, Prof Sarne De VLIEGHER (UGent) et Dr Filip BOYEN (UGent), puis des membres internes à la faculté, Prof Christian HANZEN, Prof Hughes GUYOT (ULg), Prof Jean-Luc HORNICK (ULg), Dr Nicolas ANTOINE-MOUSSIAUX (ULg).

Mes remerciements vont à l'endroit du Prof Laurent GILLET (ULg), Président du jury de cette thèse, pour votre simplicité et votre aimable coopération tout au long du processus administratif ayant abouti à cette défense de thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance à Dr Marjorie BARDIAU, Dr Isabelle OTE, Monsieur Jean-Noel DUPREZ, dans le suivi de mes différentes manipulations au laboratoire. Vous avez été toujours là pour moi à chaque fois que le besoin se fait sentir. J'ai beaucoup appris de vos expériences respectives, trouvez par ces mots, ma profonde reconnaissance. Vous serez à jamais gravés dans mes pensées dans ma vie professionnelle.

Mes remerciements vont à l'endroit de Dr Duchesnes Christiane et de Dr Damien THIERY, pour votre disponibilité, et les sages conseils pour l'amélioration de la qualité de mon document.

Je ne terminerais pas sans pour autant adresser mes remerciements aux autres collègues du laboratoire notamment Dr GREGOIRE F, Dr FET, Dr VOLPE R, Dr LESENFANTS C, Dr NAHAYO A PATERNOSTRE J, DEPAS A, Nadège K, FAKHI I et Dr N'GUASSAM C, pour leur collaboration.

Ce travail a été rendu possible grâce au financement de la Coopération Technique Belge (CTB). Je remercie vivement l'ensemble du personnel de la CTB, particulièrement les différents gestionnaires de mon dossier qui se sont succéder. Mes remerciements vont également au Programme de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest (PPAAO), à l'Institut Vétérinaire Tropical (IVT) de l'Université de Liège pour leur contribution financière lors de mon séjour à Liège.

Je ne termine pas sans adresser mes sincères remerciements à la firme i2A pour la mise à notre disposition de l'appareil microscan et de l'automate de coloration de Gram.

Enfin, je remercie vivement tous mes autres collègues doctorants nigériens et mes collègues du Laboratoire Central d'Elevage (LABOCEL) et le personnel de l'Ecole Nationale de Santé publique (ENSP). Il s'agit de Dr ZANGUI I, Directeur du LABOCEL, Dr MADOUGOU A, Dr ABDOU A, Dr Zara H, Dr Rahila I, Dr Moutari, Dr Cathérine B, M^{lle} Halima Maina, Mr Bachir, Dr Issa H, Dr Kouato S, Dr Moussa M, Dr Sido, Ibrahim A, Djika M, Kandine A.

Je remercie aussi toute la communauté nigérienne vivant en Belgique, notamment les amis que j'ai eus lors de mon séjour. Mes pensées vont à l'endroit de la famille Bassirou Hamidou, à la famille Kaka Djibo, à Haladou Oumarou, à Aminou Boubacar, à Issa Zouladeyni, à Sani Mohamed, à Issaka Hamani, à Seydou Mounkaila, à Illyassou M.

Résumé

L'élevage est la seconde activité principale après l'agriculture au Niger. Cependant, ce secteur est confronté à d'énormes problèmes, notamment la faible productivité des animaux, le faible investissement, des problèmes d'alimentation et d'accès aux points d'eau, et divers problèmes sanitaires récurrents. Depuis l'indépendance du pays en 1960, plusieurs politiques ont été mises en œuvre pour améliorer la productivité des espèces et races domestiques locales. C'est ainsi que, la station expérimentale sahéenne de Toukounous a vu le jour, avec comme objectifs la sélection et la diffusion de la race Zébu Azawak auprès des producteurs ruraux. Les efforts de sélection ont abouti à l'obtention d'un animal standard bien adapté au contexte sahéen avec un niveau de production en lait acceptable. Le bétail laitier à travers le monde souffre énormément des problèmes sanitaires liés aux infections de la glande mammaire. La situation est la même à Toukounous malgré la proximité de services vétérinaires et para-vétérinaires. Cependant, au Niger de manière générale, les données sur les mammites sont rares et très peu de publications scientifiques sont disponibles. Une des possibles explications est la prévalence élevée de mammites sub-cliniques, mais faible de mammites cliniques.

La présente étude est dès lors centrée sur les problèmes de mammites au sein de la station sahéenne expérimentale de Toukounous afin d'identifier : (i) les vaches souffrant de mammites cliniques et/ou subcliniques ; (ii) les principales bactéries pathogènes responsables ; et (iii) les virulotypes et profils de résistance aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus (S.) aureus* isolées ; et afin de démontrer l'impact positif de l'application de mesures simples d'hygiène lors de la traite manuelle sur la prévalence de vaches avec mammite.

De 2009 à 2012, l'ensemble des vaches en lactation des trois troupeaux de la station, à savoir « élites », « non-élites » et « primipares » ont été testées avec le « California Mastitis Test » (CMT). Ensuite, le lait de tous les quartiers des vaches ayant réagi positivement au test CMT a été prélevé pour réaliser des analyses bactériologiques au Niger. Les espèces bactériennes pré-identifiées au Niger ont ensuite été importées en Belgique (ULg-FMV) afin de procéder à une identification complète par des galeries API[®]. Les souches confirmées de *S. aureus* ont par la suite été étudiées pour leurs virulotypes (i) phénotypiquement pour la production de biofilm par mesure de la densité optique après croissance en milieu liquide en plaque de microtitration et pour la synthèse d'une capsule par un test ELISA ; et (ii) génétiquement par PCR ciblant des gènes codant pour différentes propriétés de virulence (adhésines, leucotoxines, entérotoxines, biofilm, et capsule) ; ainsi que pour leurs profils de résistance aux antibiotiques par le test de diffusion en gélose, ou antibiogramme. Ces mêmes souches ont été comparées par leurs

empreintes génétiques après « Pulsed Field Gel Electrophoresis » (PFGE), ou pulsotypes, pour en étudier la clonalité au cours des 4 années de l'enquête et dans les 3 troupeaux. Enfin, l'impact de mesures d'hygiène (lavage et désinfection du pis, des trayons et des mains des trayeurs avant et/ou après chaque traite) a été évalué en 2011 et en 2012, en comparant la prévalence de vaches positives au test CMT et l'identité des bactéries isolées en présence ou en absence de ces mesures.

Au cours de la première étude en 2009 sur la prévalence des vaches positives au test CMT et l'identité des bactéries mammopathogènes, 104 des 265 vaches (39%) testées dans l'ensemble des 3 troupeaux étaient positives au test CMT, bien qu'aucune mammite clinique n'ait été diagnostiquée. Les analyses bactériologiques ont identifié 55 souches bactériennes: la moitié (51%) appartient au genre *Staphylococcus*, essentiellement à l'espèce *S. aureus* (42%). Les autres bactéries identifiées appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* (26%) et aux genres *Enterococcus* (13%), *Bacillus* (9%) et *Acinetobacter* (2%). Des résultats similaires ont été obtenus en 2010, 2011 et 2012, bien que les pourcentages respectifs puissent varier selon l'année et le troupeau.

Les résultats des tests phénotypiques et génétiques du virulotypage (études 1 et 3) des 122 souches de *S. aureus* isolées de 2009 à 2012 dans les trois troupeaux n'ont permis d'effectuer aucun regroupement. Par contre, les résultats des empreintes génétiques par PFGE sur ces mêmes souches ont montré qu'elles appartiennent à 16 pulsotypes différents, dont trois sont plus fréquents, A (33%), D (23%) et B (21%). Ces différents pulsotypes se distinguent, dans une certaine mesure, par la présence plus fréquentes des gènes *icaA*, *spa* et *cap5H* dans les souches des pulsotypes A et B ; des gènes *cap8H*, *seg*, *sei* et *seb* dans celles du pulsotype D ; et du gène *lusk-PV* dans celles des pulsotypes B et D.

Pour ce qui concerne les antibiogrammes des mêmes 122 souches (études 1 et 2 + résultats non publiés), des pourcentages élevés de souches résistantes de *S. aureus*, particulièrement aux β -lactamines, ont été relevés. Ainsi, 41% des souches testées étaient résistantes à la pénicilline et 7%, à l'oxacilline. Mais, aucune souche résistante à la méticilline (SARM) ne possède le gène *mecA*. Les pourcentages de souches résistantes atteignaient 11% pour la tétracycline et la gentamicine, mais restaient inférieurs à 5% pour la clindamycine, l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole et l'enrofloxacin.

Pour la 4^{ème} étude en 2011 et 2012, les mesures d'hygiène ont été appliquées pendant 6 mois : lavage du pis avant la traite, trempage des trayons avec de la chlorhexidine après la traite, et

lavage et désinfection des mains des trayeurs avec une solution antiseptique à base d'hypochlorite de sodium. L'application de ces mesures a diminué de manière statistiquement significative les pourcentages de vaches positives au test CMT en comparaison avec les résultats dans les troupeaux et au cours des années sans application de ces mêmes mesures d'hygiène. En 2012, par exemple, les pourcentages de vaches positives au CMT dans les troupeaux « élite » et « non-élite » ont diminué de 65% et 62%, à 44% et 41% après trois mois d'application, puis à 20% et 24% après 6 mois d'application, respectivement. Par contre, ces mesures d'hygiène n'ont eu aucun effet statistiquement significatif sur les pourcentages relatifs des différents pathogènes identifiés.

En conclusion, les mammites bovines sévissent essentiellement sous forme sub-clinique à la station sahélienne de Toukounous. Le genre *Staphylococcus* et l'espèce *S. aureus* sont les bactéries mammopathogènes les plus fréquemment identifiées. Les souches de *S. aureus* appartiennent à différents virulotypes et pulsotypes, bien que trois de ces derniers soient plus fréquents dans les trois troupeaux et au cours des quatre années de l'étude. Ces mêmes souches présentent différents profils de résistance aux antibiotiques, avec près de la moitié d'entre elles résistantes à des membres de la famille de β -lactames. Enfin, l'application de mesures d'hygiène (lavage et désinfection du pis, des trayons et des mains des trayeurs) avant et/ou après la traite manuelle permet de réduire la prévalence des vaches positives au test CMT de manière statistiquement significative, mais n'a pas d'influence sur les fréquences relatives des bactéries pathogènes identifiées dans les laits.

Summary

Livestock is the main second activity after agriculture in Niger. However, this sector is facing huge problems, such as the weak productivity of the animals, the weak investment, the feeding and watering difficulty and the recurrent sanitary problems. Since the independence of the country in 1960, several policies have been implemented to improve the productivity of local domestic species and breeds. To such a purpose, the Sahelian experimental station of Toukounous was created with the objective of selecting and diffusing the Azawak Zebu breed to rural producers. The former objective was achieved with the selection of a standard animal well adapted to the Sahelian context and with an acceptable milk production level. Dairy cattle worldwide suffer from health problems related to mammary gland infections. The situation is the same at Toukounous despite the presence of veterinary and para-veterinary services at proximity. Still, data on mammary gland infections are scarce in Niger in general and very few publications are present in the literature. One possible explanation of this situation is the high prevalence of subclinical mastitis and a low prevalence of clinical mastitis.

The present study therefore focuses on the problem of mammary gland infections at the Sahelian experimental station of Toukounous to identify (i) the cows with clinical and/or sub-clinical mastitis; (ii) the major bacterial pathogens involved; (iii) and the virulotypes and antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus (S.) aureus* isolates; and to demonstrate the positive impact the application of basic hygienic measures during the manual milking on the prevalence of cows with mastitis.

From 2009 till 2012, all lactating cows of the three herds known as « elite », « non-elite » and « primiparous » were tested with the California Mastitis Test (CMT). All CMT-positive quarters were further sampled for bacteriological analysis in Niger to perform bacteriological analyses. The pre-identified bacteria were subsequently imported into Belgium (ULg_FMV) to perform a complete identification using API[®] sets. The confirmed *S. aureus* species were further identified for their virulotypes (i) phenotypically for their ability to produce a biofilm by measuring the optical density after growth in broth in microtitre plates and/or to synthesize a capsule by an ELISA test; and (ii) genetically by PCR for the presence of several genes coding for different virulence properties (adhesins, leucotoxins, enterotoxins, biofilm, and capsule); and for their antibiotic resistance profiles by the disk diffusion assay. Finally, all *S. aureus* isolates were compared by their Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) fingerprints (or pulsotypes) to study their clonality along the four years of the study and between the three herds. Finally, the impact of hygienic measures (washing and disinfection of the udder, of the

teats and of the hand of the milker before and/or after milking) was assessed in 2011 and 2012 by comparing the prevalence of the CMT-positive cows and the identity of the bacterial pathogens identified in presence or absence of such measures.

During the first study in 2009 on the prevalence of CMT-positive cows and on the identification of the bacterial mammopathogens, 104 of 265 cows (39%) in the three herds tested positive with the CMT although no clinical mastitis was diagnosed. Bacteriological analyses identified 55 bacterial isolates: half of them (51%) belonged to the genus *Staphylococcus* in particular to the species *S. aureus* (42%). Other identified bacteria belonged to the family *Enterobacteriaceae* (26%) and to the genera *Enterococcus* (13%), *Bacillus* (9%), and *Acinetobacter* (2%). Similar results were obtained in 2010, 2011 and 2012, although the percentages did vary to some extent depending on the year and on the herd.

The phenotypic and genotypic virulotyping performed during the first and third studies could not group together in any way the 122 *S. aureus* isolated between 2009 and 2012 from the three herds. On the other hand the same 122 isolates belonged to 16 different pulsotypes, three of them being predominant: A (33%), D (23%), and B (21%). These 3 pulsotypes could, to some extent, be associated with virulotypes: the *icaA*, *spa* and *cap5H* genes are predominant in pulsotypes A and B; the *cap8H*, *seg*, *sei* and *seb* genes in pulsotype D; and the *luks-PV* gene in pulsotypes B and D.

The same 122 *S. aureus* isolates were also tested for their antibiotic resistance profiles (studies 1 and 2 + unpublished results) and had a high level of resistance, especially to the β -lactam family: 41% of them were resistant to penicillin and 7% to oxacillin, though no methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) possesses *mecA* gene. And 11% of them were resistant to tetracyclin or to gentamicin, whereas less than 5% were resistant was to clindamycin, trimethoprim-sulfamethoxazole or enrofloxacin.

During the fourth study in 2011 and 2012, application for 6 months of pre-milking washing of the udder, post-milking teat dipping with chlorhexidine, and milkers' hand washing and disinfection with a sodium hypochlorite solution significantly decreased the % of CMT-positive cows compared to the % in the herds and during the years with no application of such hygienic measures. In 2012 e.g., the % of CMT-positive cows in the « elite » and « non-elite » herds respectively decreased from 65% and 62% to 44% and 41% after 3 months of application, then to 20% and 24% after 6 months. Conversely, no significant difference was observed in the relative frequency of the different bacterial pathogens.

In summary, mastitis occurs mainly in its subclinical form at the Sahelian experimental station of Toukounous. The genus *Staphylococcus* and the species *S. aureus* are the most frequently isolated bacterial mammopathogens. The *S. aureus* isolates belong to several different virulotypes and pulsotypes, though three pulsotypes are the most frequent in the three herds and along the four years of the study. They also have different antibiotic resistance profiles, with almost half of them being resistant to members of the β -lactam family. To conclude, the application of hygienic measure (washing and disinfection of the udder, of the teats, and of the milkers' hands) prior and after the manual milking significantly reduces the prevalence of CMT-positive cows, but not the relative frequency of the different pathogens.

Liste des abréviations

°C	Degré Celcius
AFSCA	Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire
AND	Acide Désoxyribonucléique
BORSA	BORderline <i>S. aureus</i>
cap5H	CP5 synthesis enzyme
cap8H	CP8 synthesis enzyme
CCS	Comptages Cellulaires Somatiques
clfA	Clumping factor ClfA
clfB	Clumping factor ClfB
CMT	Californian Mastitis Test
Cna	Collagen-binding protein
ebpS	Cell surface elastin-binding protein
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENSP	Ecole Nationale de Santé Publique de Niamey
FAO	Food and Agriculture Organization
fnbA	Fibronectin-binding protein A
hla	Alpha-haemolysin precursor
hlb	Beta-haemolysin precursor
hld	Delta-haemolysin precursor
hlgAC	Gamma-haemolysin components A and C
ica	Intercellular adhesion protein
IDH:	Indice de Développement Humain

Km ²	Kilomètre carré
LABOCEL	Laboratoire Central d'Elevage
LPS	Système Lactopexoxydase
lukD	Leukotoxin LukD
lukF-PV	Panton-Valentine leukocidin chain F
lukM	Leukocidin LukM
lukS-PV	Panton-Valentine leukocidin chain S
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
MODSA	MODified <i>S. aureus</i>
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis »
PN	Polynucléaires Neutrophiles
PPCB	Péripneumonie Contagieuse Bovine
SARM	Staphylococcus Aureus Résistant à la Méricilline
SCN	Staphylocoques à Coagulase Négative
SCVs	Small Colony Variants
sdrC	Bone sialoprotein-binding protein
sea	Enterotoxin A
seb	Enterotoxin B
sec4	Enterotoxin C

sed	Enterotoxin D
see	Enterotoxin E
seg	Enterotoxin G
seh	Enterotoxin H
sei	Enterotoxin I
sej	Enterotoxin J
spa	Protein A
SSET	Station Sahélienne Expérimentale de Toukounous
ST	Sequence Type
Ulg	Université de Liège

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'augmentation du niveau de la production laitière et l'amélioration de la qualité hygiénique du lait produit sont, entre autres, de grands défis auxquels sont confrontés les élevages bovins laitiers. Ces défis ne sauraient être relevés sans de meilleures connaissances des agents étiologiques impliqués dans les mammites, mais aussi par l'élaboration des stratégies adéquates de lutte et de prévention. En effet, la mammité est une des maladies qui causent beaucoup de pertes économiques dans les élevages à travers le monde, non seulement liées à la baisse de la production du lait et aux coûts des traitements des animaux malades, mais aussi aux pénalités dues à une élévation du nombre des cellules somatiques, voire même à l'élimination des vaches incurables dans les cas les plus extrêmes. Cette notion de pertes économiques est cependant difficile à objectiver dans les conditions actuelles d'élevage au Niger.

De nos jours, les principales bactéries impliquées dans l'infection de la glande mammaire ont été répertoriées dans les pays développés. Dans ces différents pays, plusieurs études ont été consacrées à cette maladie, telle que l'évaluation du coût de la maladie, la caractérisation génétique des souches responsables de l'infection, la définition des différents modèles épidémiologiques de la maladie, ou encore l'évaluation de l'efficacité des programmes de contrôle mis en place. Si ces notions sont déjà connues et en perpétuelle actualisation dans ces pays, il n'en est pas de même dans certains pays en voie de développement comme le Niger, où les études qui ont porté sur les mammites sont encore à un stade embryonnaire, car elles se limitent essentiellement à la reconnaissance des différents agents étiologiques de la maladie.

La détermination exacte de l'identité des bactéries responsables de la mammité est tout aussi primordiale qu'importante dans l'orientation du choix thérapeutique, tout comme dans le contrôle de l'infection dans un élevage (Belschner *et al.*, 1996), d'autant plus qu'il n'y a pas une bonne corrélation entre les signes cliniques et la nature du germe impliqué (Bradley *et al.*, 2000). La culture bactériologique des échantillons de lait est une méthode largement utilisée par de nombreux laboratoires pour l'identification bactériologique. Elle se révèle être une technique relativement lente, car il faut attendre 48 à 72 h avant d'obtenir les résultats (Hogan *et al.*, 1999). Dans une étude regroupant une quarantaine de laboratoires, le pourcentage de bactéries responsables de mammites correctement identifiées par la culture bactériologique varie entre 63% et 91% (Pitkälä *et al.*, 2005). De plus, avec cette méthode le nombre d'échantillons avec des cultures négatives varie entre 25 et 45% (Makovec and Ruegg, 2003; Bradley *et al.*, 2007; Koivula *et al.*, 2007). Les techniques de biologie moléculaire ont alors

commencé à être utilisées dans le cadre du diagnostic de routine des mammites afin de remédier aux imprécisions de la culture bactérienne. C'est ainsi que des « Polymerase Chain Reaction » (PCR) multiplexées ont été développées et mises au point, comme celle qui détecte à la fois *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus uberis* (Phuektes *et al.*, 2001). Le test PathoProof[®] permet d'identifier et de quantifier en même temps à l'aide de la méthode Real-Time-(q) PCR, l'ADN bactérien de jusqu'à 15 différents germes mammapathogènes. Des progrès importants doivent être faits au Niger dans le cadre du diagnostic des maladies bactériennes. En effet, le seul laboratoire vétérinaire de référence manque cruellement de matériel adéquat pour assurer un diagnostic bactériologique de certitude des maladies animales.

Les études épidémiologiques menées sur les mammites ont apporté beaucoup de connaissances dans la pathologie de la glande mammaire. Ainsi, cela a permis notamment de comprendre les facteurs de risque, le mode d'évolution et de transmission de la maladie. Les plus grandes avancées ont été enregistrées avec l'avènement de la caractérisation génétique des bactéries responsables des mammites. Ainsi, il a été démontré que 1 à 2 souches de *S. aureus* sont responsables de plus de 80% des infections mammaires dans un élevage, ce qui confirme non seulement leur caractère contagieux, mais aussi leur origine mammaire expliquant ainsi leur transmission lors du mécanisme de la traite d'un quartier à un autre ou d'une vache à une autre (Serieys, 2004).

Dans le cadre des programmes de contrôles de la mammité, l'hygiène à la traite est une phase capitale. Les mesures d'hygiène à la traite permettent d'assurer le contrôle de l'infection de la glande mammaire (Goodger *et al.*, 1988). Dans le contexte du Niger, où la traite se fait manuellement, la notion de mesures d'hygiène à la traite doit se focaliser essentiellement sur l'hygiène des trayeurs (lavage des mains avant et après chaque traite), sans oublier cependant la glande mammaire (désinfection des trayons après la traite). L'hygiène des mains est une notion empirique dans le cadre du contrôle des maladies infectieuses. C'est en 1822, qu'un pharmacien français a montré que les solutions contenant des chlorures ou de la soude pourraient éradiquer les mauvaises odeurs associées aux cadavres humains et que ces solutions pourraient être utilisées comme antiseptiques et désinfectants (Boyce et Pittet, 2002). Plus tard, c'est à dire en 1847, les travaux de Semmelweis sur la fièvre puerpérale vont démontrer que

l'hygiène des mains des agents de santé chargés de l'accouchement des femmes enceintes diminuent significativement le taux de mortalité des femmes, due à la fièvre puerpérale (Slovis *et al.*, 2012). Ensuite, l'hygiène des mains a été progressivement acceptée comme l'une des mesures les plus importantes pour prévenir la transmission des agents pathogènes. En Belgique par exemple, depuis 2005 et tous les deux ans se tient la campagne « **Vous êtes en de bonnes mains** » pour promouvoir davantage l'hygiène des mains en médecine hospitalière. Et en mai 2009, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) lance l'initiative « **Sauvez des vies: lavez-vous les mains** » dans un vaste programme mondial pour la sécurité des patients : « Un soin propre est un soin plus sûr ».

Enfin, les préoccupations sont sans cesse grandissantes vis-à-vis du développement des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Il est donc absolument nécessaire d'œuvrer au maintien de l'efficacité de notre arsenal thérapeutique utilisé contre les maladies tant animales qu'humaines. L'antibiogramme est dès lors un très bon outil pour le praticien vétérinaire qui peut contribuer efficacement à la définition des choix stratégiques en matière d'utilisation des antibiotiques. L'antibiogramme est également un outil nécessaire pour la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne à l'échelle nationale. Cette surveillance est d'autant plus nécessaire pour le cas du Niger avec l'apparition des circuits parallèles de vente de médicaments vétérinaires de rue, phénomène jadis connu avec les médicaments destinés aux humains vendus, au niveau "des pharmacies par terre", terme localement utilisé pour qualifier ces lieux de vente.

PARTIE 1 : Le contexte de l'étude

1.1. Le Niger

Le Niger est un pays sahélien enclavé d'Afrique Occidentale dont l'accès à la mer par le port le plus proche se situe à 700 km de ses frontières. La superficie est de 1 267 000 Km² dont 152 000 Km² exploitables à des fins agricoles et 620 000 Km² à des fins pastorales (figure 1). La population est quant à elle estimée à 16 274 738 habitants en 2012 (INS, 2013), avec un accroissement annuel de 3,33 %, largement supérieur à celui de la production agricole, ce qui aggrave le déficit alimentaire et place le pays à un rang peu enviable à l'Indice de Développement Humain (IDH). Le climat est de type sahélien avec deux types de saisons. Une saison pluvieuse de courte durée (3 à 4 mois) et une saison sèche pendant laquelle alternent un climat froid, période à laquelle les températures journalières moyennes varient entre 10 et 20°C, et un climat chaud, période à laquelle les températures peuvent atteindre 40°C. Les précipitations moyennes annuelles varient entre 0 mm à 800 mm, du nord très désertique au sud. L'agriculture, l'élevage et le secteur minier constituent les trois grands piliers de l'économie du Niger.

L'agriculture est essentiellement pluviale, ce qui la rend fortement dépendante de la bonne répartition dans le temps et dans l'espace des quantités de précipitations qui tombent dans l'année. Elle repose principalement sur des cultures vivrières (mil, sorgho, maïs) et commerciales (niébé, arachide, sésame, souchet). Durant la saison sèche froide, la population s'adonne également à la pratique des cultures maraîchères, appelées aussi localement culture de contre-saison (Photo 2).

Le secteur minier est porteur de croissance au Niger. L'uranium dans la région d'Agadez, le pétrole dans la région de Diffa, l'or dans les régions de Tillabéry et d'Agadez et, enfin, le charbon dans les régions d'Agadez et de Tahoua constituent les principales ressources minières du pays.

L'élevage emploie près de 87% de la population active du pays et représente, pour l'économie nationale du Niger, la composante la plus dynamique et porteuse de croissance du secteur primaire. En effet, l'élevage contribue à 62% des recettes d'exportation des produits du secteur

rural et 21% de l'ensemble des produits d'exportation (MEL, 2012). Le sous-secteur de l'élevage offre d'énormes potentialités capables de contribuer à l'amélioration de la sécurité alimentaire et d'augmenter les revenus de la population. Conscient de l'apport inestimable de ce sous-secteur dans l'économie nationale, le Ministère de l'Elevage a élaboré et exécuté une stratégie nationale (Stratégie de Développement Durable de l'Elevage) qui vise à mieux valoriser les potentialités des ressources animales. Cette stratégie opérationnelle est assortie d'un premier plan d'action pluriannuel 2013-2015 qui repose sur trois grands axes prioritaires d'intervention à savoir :

- l'amélioration durable de la santé animale et de l'hygiène des produits d'origine animale ;
- l'accroissement, la diversification et la valorisation des productions animales ;
- la création d'un environnement juridique et institutionnel favorable au développement durable de l'élevage.

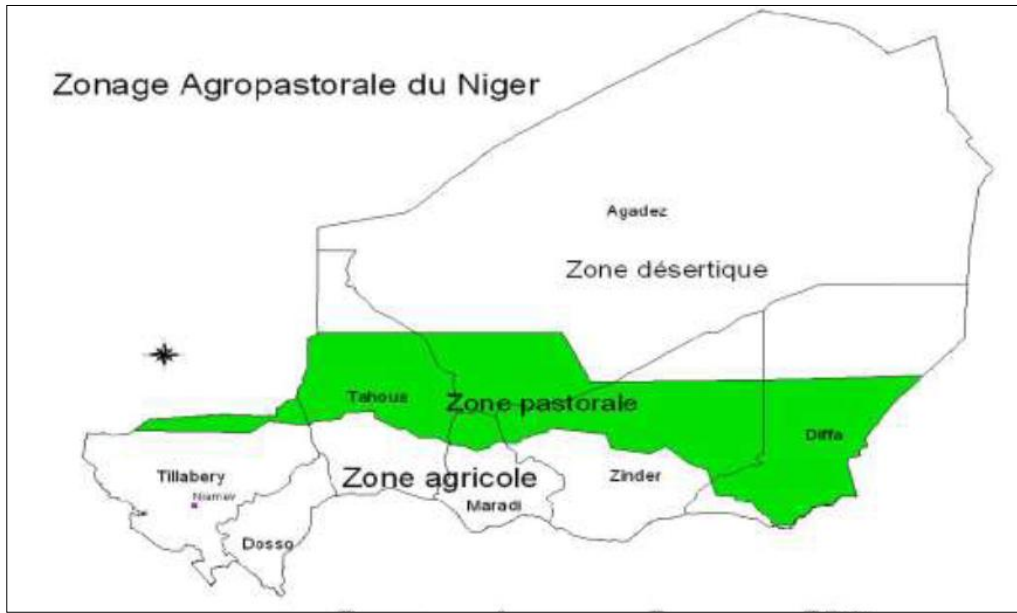


Photo 1 : Répartition des zones agro-écologiques du Niger.



Photo 2 : Système traditionnel de labour au Niger.

1.2. La race zébu Azawak

1.2.1. Article de synthèse: Le Zébu Azawak dans l'élevage bovin au Sahel

Abdoulkarim Issa Ibrahim^{1,2}, Rianatou Bada-Alambéji³, Jacques G. Mainil¹.

¹Bactériologie, Département des Maladies infectieuses, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Sart Tilman, Bât 43a, B-4000 Liège, Belgique.

²Laboratoire Central d'Élevage- Direction Diagnostic Enquête et Recherche Vétérinaire- Service de virologie. B.P. 485, Niamey, Niger.

³Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires-Service de Microbiologie, Immunologie et Pathologie infectieuse, BP 5077, Dakar, Sénégal.

Sous presse dans la Revue Africaine de Santé et Productions Animales.



ISSA IBRAHIM A.^{1,2}, BADA-ALAMBEDI R.³, et J.G. MAINIL¹

¹Bactériologie, Département des Maladies Infectieuses, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Sart Tilman, Bât 43a, B-4000 Liège, Belgique.

²Laboratoire Central d'Elevage- Direction Diagnostique Enquête et Recherche Vétérinaire-Service de virologie. B.P. 485, Niamey, Niger.

³Ecole Inter-Etat des Sciences et Médecine Vétérinaires-Service de Microbiologie, Immunologie et Pathologie infectieuse, BP 5077, Dakar, Sénégal.

✉ Correspondance et tirés à part, e-mail : karimlebelge@yahoo.fr

Résumé

La contribution de l'élevage est essentielle pour l'amélioration de la production alimentaire et la réduction de la pauvreté dans le Sahel. Dans ce vaste ensemble, l'élevage repose sur l'exploitation des parcours naturels avec différents systèmes de production. Ainsi, on retrouve principalement trois types de systèmes à savoir le type pastoral, le type nomade, le type transhumant auxquels s'ajoute le système de ranching. Les races bovines sahéliennes sont caractérisées par des faibles productions avec des paramètres de reproduction peu performants. Certains pays sahéliers ont adopté plusieurs politiques d'amélioration des productions des races locales à travers notamment l'insémination artificielle ou encore la mise en place de programmes de sélection de race locale performante. C'est ainsi que, le zébu Azawak élevé dans un système de ranching à Toukounous (Niger) s'est révélé bien adapté dans un système de production aride avec des productions animales nettement supérieures aux autres races rencontrées. Cet article décrit les modes d'élevage dans le sahel, les principales races bovines rencontrées et enfin traite des avantages comparatifs qu'offre la race Azawak par rapport aux autres races bovines locales et aux produits issus du croisement de l'insémination artificielle. (RASPA, 12 (2) : 71-77).

Mots-clés : Zébu Azawak – Toukounous - Sahel - Niger.

Abstract

Azawak Zebu breed in the Sahel

The contribution of livestock is essential for the improvement of the food production and the reduction of poverty in the Sahel. Breeding in the Sahel is based on the exploitation of the natural grazing with different systems of production. So, we find mainly three systems namely pastoral, nomadic, transhumant to which is added the system of ranching. Sahelian breeds bovine are characterized by low production with inefficient parameters of reproduction. Some Sahelian countries have adopted several policies to improve production of local breeds through artificial insemination or the establishment of breeding programs for local race performance or programs of selection of local breed. Thus The Azawak breed brought up at the ranching of Toukounous (Niger) was revealed adapted well in an arid production system. This article describes the types of livestock in the Sahel and compares the advantages of the Zebu Azawak breed with the other bovine breed and the cows which descended artificial insemination.

Keys – Words: Azawak zebu - Toukounous - Sahel - Niger.

Introduction

DESCRIPTION DU SAHEL ET DE SON SYSTEME D'ÉLEVAGE

CONTRAINTES DE LA PRODUCTION LAITIÈRE AU SAHEL

RACES BOVINES SAHÉLIENNES : PLACE DU ZÉBU AZAWAK

1. Origine et répartition du zébu Azawak
2. Performances de reproduction du zébu Azawak
3. Performances de production laitière du zébu Azawak
4. Politiques d'amélioration génétique de la race Azawak au Sahel : Exemple de la station de Toukounous au Niger
5. Principales pathologies à la station de Toukounous au Niger

PERSPECTIVES DE L'ÉLEVAGE BOVIN LAITIER AU SAHEL

Conclusion

Introduction

L'élevage constitue l'activité principale de la population au Sahel après l'agriculture. Sa contribution est importante dans l'économie nationale des pays sahéliens. Ainsi, la part de l'élevage au PIB est de 10 à 15% au Burkina et au Niger, de 20% en Mauritanie, et de 36% du PIB agricole au Sénégal [11] ; [28]. L'élevage participe non seulement au budget des ménages, mais également à la satisfaction leurs besoins alimentaires, le plaçant ainsi comme un facteur déterminant de la lutte contre la pauvreté et la malnutrition.

Malgré un cheptel bovin estimé à 63 895 800 têtes, les Etats du Sahel consacrent annuellement 9 à 12 milliards de francs CFA à l'importation des produits laitiers afin de couvrir le déficit de production lactée [11]. L'élevage bovin laitier peine, en effet, à satisfaire les besoins de la population sans cesse en croissance dans cette zone qui abrite des pays ayant des taux de croissance parmi les plus élevés de la planète. Le mode d'exploitation du système de production, la faible productivité des races locales exploitées et les nombreux problèmes sanitaires demeurent les principaux défis à relever pour l'émergence d'un élevage en proie à des difficultés structurelles.

Le système de production reste, en effet, dominé essentiellement par l'exploitation des parcours naturels, qui est tributaire de la pluviométrie. L'inégale répartition des pluies dans le temps et dans l'espace a comme corollaire, des sécheresses récurrentes et une baisse progressive de la valeur nutritive des pâturages associées à la faible complémentation alimentaire. Cet état de fait se traduit par une baisse générale de la productivité, notamment un faible taux de fécondité, un faible taux de fertilité et un faible poids des jeunes à la naissance. Face à cette variabilité climatique et à la forte demande en produits laitiers, on assiste à une émergence des systèmes de production de bovins laitiers autour des principales grandes villes du Sahel. Mais, la faible productivité des races locales exploitées a ouvert d'autres perspectives de développement de ces genres d'élevage. Ainsi, certains pays ont opté pour l'insémination artificielle des races locales avec des semences de races exotiques beaucoup plus performantes. Toutefois, l'amélioration directe de certaines races locales à fort potentiel zootechnique, notamment le zébu Azawak et le zébu Goudali, constitue une seconde alternative car moins sujettes aux maladies tropicales.

L'objectif de ce travail est (i) de décrire les principaux systèmes d'élevage bovin au Sahel, (ii) de discuter des contraintes de la production laitière au Sahel et (iii) de présenter le zébu Azawak en général et à la Station Sahélienne Expérimentale de Toukounous (Niger) en particulier. Les perspectives de l'élevage bovin à des fins de production laitière seront discutées dans la conclusion.

DESCRIPTION DU SAHEL ET DE SON SYSTÈME D'ÉLEVAGE

Le Sahel est une région comprise entre les latitudes 12°N et

20°N sur une hauteur allant de 400 à 600 km et qui s'étend sur 6000 km de l'océan Atlantique à la mer Rouge, couvrant ainsi une superficie approximative de 3 000 000 km². La moyenne annuelle de température enregistrée est de 29°C et la moyenne pluviométrique annuelle varie de 100 mm au Nord à 600 mm au Sud [8].

Ce vaste ensemble couvre les pays formant le Comité Permanent Inter-Etats de Lutte contre la Sécheresse dans le Sahel (CILSS) regroupant le Burkina Faso, le Cap-Vert, la Guinée Bissau, la Gambie, le Mali, la Mauritanie, le Niger, le Sénégal et le Tchad, ainsi que d'autres pays comme le Soudan, la Somalie et l'Éthiopie (figure 1).

Le système d'élevage est un ensemble d'éléments en interaction dynamique en vue de valoriser des ressources par l'intermédiaire d'animaux domestiques pour en obtenir des productions variées ou pour répondre à des objectifs. Cette définition prend en compte un certains nombre de facteurs déterminants à savoir, les animaux, la conduite de l'élevage par l'éleveur et l'environnement où tout se déroule. En partant de ce principe, nous présenterons l'environnement qu'est le Sahel, les animaux en nous limitant uniquement aux bovins et le mode de gestion du troupeau.

D'une manière très succincte, on distingue trois modes de gestion de troupeaux au Sahel. Il s'agit du système pastoral avec deux composantes (pastoral de type nomade et pastoral de type transhumant), du système agro-pastoral et du système agro-sylvopastoral. Ces trois modes de gestion des animaux sont rencontrés dans les trois sous-zones climatiques et pluviométriques retrouvées au Sahel, à savoir la sous-zone saharo-sahélienne (100-200 mm), la sous-zone sahélienne (200-400 mm) et la sous-zone soudano-sahélienne (400-600 mm) [11]. Ainsi, le système pastoral nomade est principalement rencontré dans la sous-zone saharo-sahélienne. Il se caractérise par une migration non planifiée des familles d'éleveurs accompagnées de leurs troupeaux, avec comme objectif l'exploitation des ressources hydriques et fourragères disponibles tout au long du trajet. Le système pastoral de type transhumant est rencontré dans la sous-zone sahélienne. Dans ce cas d'espèce, il s'agit d'un déplacement saisonnier et cyclique, où seuls les éleveurs se déplacent avec une partie des animaux, tandis que l'autre partie constituée des vaches en lactation est gardée au lieu d'habitation permanent. Au Niger, le mouvement des animaux en transhumance s'observe au début de la saison pluvieuse et se fait du Sud vers le Nord (zone pastorale) où les animaux demeurent jusqu'à la fin des récoltes dans les champs. Le système agro-pastoral est pratiqué dans le Sud de la sous-zone sahélienne et dans la sous-zone soudano-sahélienne. Dans ce système, les animaux appartiennent à des éleveurs sédentaires qui confient leur



Figure 1 : Le Sahel (Source?????)

RASPA Vol.12 N°2, 2014

animaux majoritairement constitués des petits ruminants à un berger qui fait paître le troupeau. Il n'est pas rare aussi d'observer dans ce système d'élevage, des animaux dans les concessions familiales attachés à des piquets. Enfin, le système agro-sylvopastoral est pratiqué au Soudan.

A côté de ces trois modes d'élevage anciennement connus, il est nécessaire de noter deux autres systèmes d'apparition récente, le système de ranchs et l'élevage périurbain. La Station de Toukounous au Niger peut être citée en exemple comme un système de ranching bien réussi au Sahel. L'élevage dans cette station est basé sur l'exploitation d'une race locale, de bonne aptitude laitière, élevée sous un mode extensif avec une utilisation rationnelle du pâturage. Les stations d'élevage ont vu le jour dans beaucoup de pays au Sahel ; on peut aussi citer celles de Loubilla au Burkina Faso, de Niono au Mali et de Dahra au Sénégal. Dans le système d'élevage périurbain, deux types d'exploitations modernes et traditionnelles sont rencontrées [11]. L'exploitation dite de type moderne incorpore des races exotiques ou métissées avec des races locales. Les animaux sont élevés sur de très grandes surfaces entièrement clôturées souvent mises à profit pour produire du fourrage. Ces élevages appliquent un plan de prophylaxie rigoureusement respecté (soins, manipulation des animaux, insémination artificielle) sous la supervision des spécialistes (vétérinaire ou zootechnicien). Les animaux reçoivent une bonne complémentation alimentaire et minérale avec un programme de réforme permettant d'adapter la taille de l'effectif aux ressources fourragères disponibles et / ou d'éliminer les mauvaises laitières. Ce type d'élevage observé dans presque toute l'Afrique de l'Ouest est l'apanage des fonctionnaires en activité ou à la retraite, des personnalités de la sphère politique et des sociétés privées. Par opposition au système moderne, le système traditionnel représente l'écrasante majorité du système d'élevage périurbain. Au Niger, il représente 85% des exploitations autour de la ville de Niamey et, au Burkina Faso, ce système fournit plus de 80 % des besoins en lait frais de la ville de Bobo Dioulasso [15] ; [17]. Au Niger, l'alimentation des animaux dans le système traditionnel des élevages périurbains est basée sur l'exploitation des parcours naturels et post-cultureaux situés au niveau des champs, dans les zones loties non mises en valeur, sur les berges du fleuve Niger, aux abords des pistes rurales et dans les bas-fonds [26].

CONTRAINTES DE LA PRODUCTION LAITIÈRE AU SAHEL

L'élevage au Sahel est fortement dépendant de la nature. L'abreuvement des animaux dans les systèmes pastoraux est un paramètre important et une première contrainte majeure dans la vie des pasteurs transhumants et nomades. En effet, l'accès aux points d'eau (mares, cours d'eau permanents, puits, etc.) est une rude épreuve en raison de leur nombre très limité. De plus, la multiplicité de ces points d'eau varie avec les quantités des précipitations enregistrées au cours de l'année. Ces dernières, très variables dans le Sahel rendent donc aléatoire la production fourragère au niveau des parcours naturels qui constituent l'essentiel de l'alimentation des

animaux dans le système pastoral. A ces aléas climatiques, viennent s'ajouter l'irrationalité de l'exploitation des parcours naturels, l'action des feux de brousse, le défrichement des terres, qui, tous, peuvent limiter et/ou favoriser la croissance de certaines espèces végétales contribuant à la dégradation du pâturage. L'adoption et la vulgarisation des techniques de culture fourragères, bien qu'elles soient une alternative pour compenser le déficit fourrager, sont encore très peu répandues en milieu pastoral.

L'autre contrainte majeure demeure la faible productivité des races locales dans les élevages. DIOP[13], rapporte que les races africaines sont peu productives : 1 à 2 kg de lait en saison humide, 0,4 à 1 kg en saison sèche soit 150 à 300 kg par lactation de 200 jours.

Sur le plan sanitaire, les pathologies dominantes sont la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB), les maladies telluriques et la pasteurellose en zone pastorale ; les trypanosomoses en zones soudanaises ; la tuberculose, la brucellose, les parasitoses digestives et les mammites dans les élevages laitiers périurbains. Dans une étude menée dans les élevages traditionnels de Hamdallaye (Ouagadougou), la prévalence de la brucellose et de la tuberculose sont respectivement de 13,2% et 27,7% [29]. Dans une enquête épidémiologique au niveau des élevages périurbains de Bamako, la prévalence de la tuberculose a été de 22,45% [24].

Au Niger, la prévalence de la brucellose dans les élevages urbains et périurbains de Niamey est de 11,23% chez les vaches en lactation contre 7,8% sur les autres bovins [6]. Les mammites ont surtout été observées chez les bovins issus du croisement entre les races importées et les races locales plus rustiques. En effet, la prévalence des mammites chez les bovins locaux et les bovins métisses est respectivement, de 13% et 46% dans les élevages semi-intensifs des régions de Kolda et de Fatick au Sénégal [21]. Dans deux études réalisées au Niger sur les mammites dans des élevages traditionnels périurbains de Niamey, des prévalences de 44% et 52% ont été rapportées [2] ; [16]. Par contre, dans ces mêmes types d'élevages, cette prévalence n'est que de 26% à Ouagadougou [29].

D'autres contraintes et pas des moindres, caractérisent l'élevage bovin laitier au Sahel. Dans les systèmes pastoraux, la marge de profit tiré de la vente des sous-produits animaux tel que le lait est très limitée. L'éloignement des éleveurs des grands centres de consommation constitue un handicap conduisant à l'autoconsommation de la production ou à sa transformation en lait caillé ou en beurre vendu sur le marché le plus proche, au cas où il existe. Les conflits armés qui ont éclaté au Mali depuis 2011 ont engendré un mouvement des pasteurs (éleveurs) en quête des zones beaucoup plus stables. Ainsi, certains ont migré vers le Sud du pays alors que les autres se sont rabattus vers les pays limitrophes comme le Burkina-Faso, le Niger, la Mauritanie, eux-mêmes confrontés à un accès difficile aux ressources tels que l'eau et le pâturage. Ces nouveaux itinéraires de la transhumance peuvent être source de tension d'autant plus que, le partage des maigres ressources avec les éleveurs autochtones pourrait être cause de conflits. À cela s'ajoute aussi la prolifération d'armes légères

liée aux troubles socio-politiques en Lybie, qui explique les attaques régulières et récurrentes par les différentes organisations des éleveurs.

Les élevages périurbains souffrent également de la restriction des aires des pâtures avec l'urbanisation galopante des villes, le phénomène d'accaparement des terres créant une insécurité de la propriété foncière, du manque d'approvisionnement en intrants en raison des faibles revenus des éleveurs, de l'absence ou du mauvais fonctionnement des organisations des producteurs laitiers et de l'absence d'un circuit structuré de collecte et de commercialisation du lait, pouvant assurer sa bonne stabilité jusqu'à sa destination finale.

RACES BOVINES SAHÉLIENNES : PLACE DU ZÉBU AZAWAK

1. Origine et répartition du zébu Azawak

Le zébu Azawak porte le nom de la vallée de l'Azawagh signifiant « pays sablonneux sans relief marqué » en Tamasheq (langue parlée par les Touaregs). Cette vallée est située en zone saharo-sahélienne entre 3° et 7° de longitude Est et 15°30' et 18° de latitude Nord. Cette vaste étendue fossile s'étend d'une part, en territoire nigérien (Nord des départements de Filingué et de Tchintabaraden) et, d'autre part, en territoire malien (région de Ménaka).

L'origine du zébu Azawak est diversement rapportée dans la littérature. Toutefois, quelle que soit la considération, on peut regrouper l'origine en deux considérations distinctes. Ainsi, la première considération prend en compte des aspects migratoires de populations nomades et la seconde prend en compte des données génétiques.

➤ Considération migratoire

Le zébu Azawak serait issu des animaux ayant survécu à une épizootie sur la vallée du fleuve Niger, dont les rescapés auraient été conduits vers leur habitat actuel. Pour d'autres, la race proviendrait d'une migration entre le VIII^{ème} et XI^{ème} siècle des Peulh, des Touaregs et des Arabes venus de l'Afrique de l'Est pour s'installer dans la vallée de l'Azawagh. SOULARD [27] soutient que le zébu Azawak serait originaire de l'Est de la région du Soudan anglo-égyptien.

➤ Considération génétique

Du fait de sa grande ressemblance avec le zébu indo-pakistanaï, certains auteurs pensent que le zébu Azawak serait le croisement entre ce dernier avec une variété du *Bos taurus* européen.

L'aire de répartition géographique du zébu Azawak a considérablement évolué dans le temps et dans l'espace. Aujourd'hui, le zébu Azawak est retrouvé principalement au Niger et au Mali, mais a aussi été introduit au Nord du Nigéria, au Sénégal, en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso. Dans ce dernier pays, l'Etat intervient d'ailleurs à travers un Projet de Diffusion de la Race Azawak en important massivement des animaux depuis le Niger.

2. Performances de reproduction du zébu Azawak

En comparant les aptitudes de reproduction du zébu Azawak

par rapport aux autres races bovines rencontrées au Sahel, notamment le zébu Gobra ou encore le taurin N'dama retrouvés au Sénégal, au Mali, en Mauritanie, en Guinée et en Côte d'Ivoire, on remarquera que la femelle Azawak offre un meilleur avantage comparatif tant en station qu'en milieu traditionnel [4] ; [7] ; [9] ; [12] (Tableau I). En effet, l'âge au premier vêlage, l'intervalle vêlage-vêlage (VV) et la durée de gestation sont nettement plus favorables chez la femelle Azawak.

Par ailleurs, l'âge au premier vêlage et l'intervalle entre les vêlages obtenus avec les produits de croisement entre les races exotiques et les races locales ne sont pas plus performants que pour la race Azawak. L'âge au premier vêlage enregistré chez les métisses est de 40,3 et 39 mois, respectivement au Sénégal et en Côte d'Ivoire, contre 35 mois chez la race Azawak. A cela, s'ajoute un intervalle entre les vêlages très compétitif de la femelle Azawak : 14 mois contre 23,3 mois, 13,44 mois et 13,11 mois chez les vaches métisses au Sénégal, en Côte d'Ivoire et en Gambie, respectivement.

3. Performances de production laitière du zébu Azawak

La femelle Azawak est considérée comme la meilleure laitière en Afrique de l'Ouest. En effet, la production laitière varie entre 800-1100 kg de lait par lactation [27]. Cependant, il existe des variations individuelles au sein de la race [3]. La production laitière journalière peut atteindre 7 à 8 litres dans des bonnes conditions d'élevage, avec des quantités maximales atteignant les 12 litres/jour [23]. Ce niveau de production de lait est nettement supérieur à celui obtenu avec trois autres races bovines rencontrées au Niger (Bororo, Djelli et Kouri), mais avoisine celui du zébu Gudali qui présente également des bonnes aptitudes laitières (Tableau II). Aussi, le nombre de jours de lactation chez la femelle Azawak est supérieur à celui des autres races bovines présentes au Niger. A cela s'ajoute également un bon rendement de la carcasse à l'abattage (48-52 %).

De plus, les performances de production enregistrées avec la femelle Azawak sont citées en exemple dans le Sahel en général, et en Afrique de l'Ouest en particulier. En effet, le zébu Azawak offre également un avantage comparatif par rapport aux autres races bovines rencontrées au Sahel notamment sur la production laitière, le poids à l'âge adulte et le rendement de la carcasse à l'abattage. Par exemple, le zébu Gobra rencontré au Sénégal, en Mauritanie et au Mali ne produit que 1,5 à 2 litres de lait/jour [10] ; le taurin N'Dama retrouvé au Burkina Faso, au Mali, au Sénégal, 2 à 3 litres de lait/jour ; et le zébu Maure, 2,7 à 3 litres de lait/jour [5] ; [30] ; [19] (Tableau III).

Aussi, en comparant les résultats de performance de production laitière obtenus dans le cadre de programme Nationaux d'Insémination Artificielle entre les races locales africaines et les races exotiques européennes, on se rend compte que les résultats obtenus avec la race Azawak sont encore meilleurs. Au Sénégal par exemple, les vaches croisées Holstein ont une production moyenne journalière de 7,3 litres et les croisées Montbéliardes de 5,7 litres [20].

Tableau I : Performances de reproduction des zébus en station et en élevage traditionnel. Source : [4] ; [7] ; [9] ; [12]

Race	Âge au premier vêlage		Intervalle entre vêlages		Durée gestation
	Station	Traditionnel	Station	Traditionnel	
Azawak	35,3 mois	54 mois	14 mois	16,4 mois	288 jours
Gobra	44,4 mois	48 à 68 mois	15 mois	24 mois	293 jours
N'dama	35 mois	47 mois	14 à 15 mois	18 à 24 mois	288,2±68 jours

Tableau II : Quelques paramètres de production des races bovines du Niger. Source : [3] ; [23] ; [27]

Race	Production lait (kg)	Durée lactation (nombre de jours)	Poids vif (kg)	Rendement carcasse (%)
Azawak	800-1100	270-300	M 350-500 / F 250-300	48-52
Bororo	180-300	180-200	M 350-500 / F 350-450	40-50
Djelli	400-450	160-200	M 300-350 / F 250-350	50
Gudali	1000-1100	230	M 500-550 / F 300-350	50
Kouri	600-700	200-250	M 650 / F 400	50

M : Mâle ; F : Femelle

Tableau III : Quelques paramètres de production des races bovines du Sahel. Source : [5] ; [10] ; [19] ; [30]

Race	Pays	Production lait (litres/jour)	Poids vif (kg)		Rendement carcasse (%)
			Mâle	Femelle	
Azawak	Mali / Nigeria / Niger	7 à 8	350-500	250-300	48-52
Zébu Peul	Burkina Faso / Mali	2 à 3	280-345	248-300	47
Zébu Maure	Mauritanie / Mali	2,7 à 3	250-700	250-300	45
Gobra	Sénégal	1,5 à 2	300-350	250-300	48-56
Baoulé	Côte d'Ivoire	1,69	180-200	-	-
Ndama	Burkina Faso / Mali / Sénégal	2 à 3	308-348	278-294	55

En Gambie, les croisées Jersey ont une production journalière moyenne de 3,54±0,94 litres, tandis que les croisées Friesianes produisent en moyenne 4,5±1,19 litres/jour [20]. Certes, l'apport du sang européen a eu un effet positif notamment sur la durée de lactation, sur la fertilité des animaux (réduction de l'intervalle de vêlage) ainsi que sur la production de lait, mais les études ont montré aussi que ces métisses ont des valeurs d'hématocrite peu compatibles avec une survie, une reproduction normale et une bonne résistance aux pressions parasitaires [25]. A noter enfin que les vaches métisses ont une incidence des mammites subcliniques trois fois plus élevée et qu'elles coûtent trois fois plus cher à l'entretien que les vaches locales [21].

4. Politiques d'amélioration génétique de la race Azawak au Sahel : Exemple de la station de Toukounous au Niger

Les politiques d'amélioration génétique au Niger remontent à 1936 avec la création du Centre Agricole de Filingué (CAF) qui plus tard prendra le nom de « Station Sahélienne Expérimentale de Toukounous » (SSET). Par la suite, d'autres stations ont vu le jour notamment celle de Kirikisoye en 1966. A la suite des sécheresses de 1972 et 1973 qui ont décimé le cheptel nigérien, l'Etat a opté pour la mise en place de

plusieurs centres supplémentaires de multiplication du bétail à Ibécétene, à Fako, à Bathé et à Sayam, qui furent créés entre 1975 et 1980. De tous ces centres, la station de Toukounous est celle qui a su relever les défis grâce à l'appui de la coopération belge qui a contribué à la mise en place d'un protocole de contrôle de performances de sélection de mâle Azawak «type Toukounous» et des programmes de suivi sanitaire et alimentaire. La station expérimentale de Toukounous est une institution étatique qui couvre une superficie de 4474 ha scindée en 5 parcs morcelés en 30 parcelles de superficies, permettant une utilisation rationnelle et bien adaptée à l'aridité des pâturages [1].

Les objectifs assignés à la station sont la multiplication, la sélection et la diffusion de la race zébu Azawak en milieu rural. Le travail de sélection entrepris à la SSET a permis une définition des standards de race et l'obtention d'un animal hautement apprécié par :

- son manque d'exigence sur le plan alimentaire ;
- son aptitude de production (viande, lait) et de reproduction ;
- sa docilité et son aptitude à la traction .

Bien que cette race sélectionnée et fixée sur un certain nombre de critères préalablement définis soit un succès, il est nécessaire qu'il puisse avoir un cadre formel de sélection génétique pour une exploitation maximale des aptitudes de cette race. Le zébu Azawak est décrit comme un animal rectiligne,

ISSA IBRAHIM *et al.*

médoligne, eumétrique, avec un fanon assez développé et des cornes en coupe quand elles sont courtes et en lyres quand elles sont longues (Figure 2). Le dimorphisme sexuel est très marqué (Figure 2 et 3). La femelle est beaucoup plus fine avec une hauteur au garrot qui varie entre 1,10 et 1,20 m, contre 1,20 et 1,30 m chez le mâle [22]. Ces mensurations varient cependant selon les pays où elles ont été effectuées. La bosse est volumineuse chez le mâle, mais beaucoup plus petite chez la femelle.

Le travail de diffusion à travers la cession des taureaux et/ou des vaches en milieu rural est hautement apprécié par les éleveurs. Ainsi, grâce au projet Azawak financé par la Coopération Technique Belge, cinq cent trente (530) géniteurs ont été diffusés en milieu rural à partir de la Station de Toukounous et des éleveurs sélectionneurs en 2006. Cela a permis de saillir vingt mille cinq cent (20 500) femelles de race Azawak, soit 23 % du cheptel national. Dans les troupeaux qui ont utilisé ces géniteurs sélectionnés, le poids des jeunes à 1 an est augmenté de 10 % et la production laitière des filles est augmentée de 20 %. Cependant, dans sa mission de diffusion du patrimoine génétique du zébu Azawak, beaucoup de défis restent encore à relever par la Station. Toutefois, l'Etat doit réhabiliter les autres centres de multiplications afin d'assurer une bonne couverture nationale du patrimoine génétique de la race Azawak.

Le travail de multiplication permet à la station de maintenir un nombre constant d'animaux en fonction de la capacité de la charge et de profiter de la vente du lait. Selon ACHARD et CHANONO [1], trois mesures phares concourent au bon succès de l'élevage à la station de Toukounous. Il s'agit de :

- l'adéquation entre l'effectif du cheptel et les ressources fourragères ;
- l'instauration d'un système de rotation annuelle des parcelles pâturées en saison pluvieuse
- la forte pression de sélection des animaux en éliminant les mauvaises productrices.

5. Principales pathologies à la station de Toukounous au Niger

Selon les données disponibles dans le rapport annuel 2009, les affections digestives, la fièvre de 3 jours et les affections locomotrices représentent les pathologies les plus couramment rencontrées à la SSET. Le taux de mortalité est passé de 2,83 % en 2008 à 3,33 % en 2009. Les mammites cliniques sont rares tandis que alors que subcliniques (39%) sont principalement dues à *Staphylococcus aureus* [12]. Les conditions de traites, manuelles (figure 4), favorisent la contamination de la mamelle.

PERSPECTIVES DE L'ÉLEVAGE BOVIN LAITIÈRE AU SAHEL

Les Etats du Sahel doivent impérativement mieux s'investir dans des politiques de gestion des ressources génétiques bovines capables de répondre durablement aux besoins d'une population sans cesse croissante, mais aussi à mieux sécuriser



Figure 2 : Femelle Azawak

Figure 3 : Mâle Azawak



Figure 4 : Traite manuelle

les différents types de système d'élevage. Ainsi, plusieurs options s'offrent au pays du Sahel.

L'une des options serait la rationalisation de l'utilisation des parcours naturels, tout en incitant les éleveurs à diminuer la taille des effectifs, à éliminer en priorité les animaux les moins productifs et à opter pour des animaux plus productifs dans le cas des élevages pastoraux.

Les états du Sahel doivent opter en priorité aussi à la valorisation des races locales par des programmes de sélection génétique. MISSOHOU et ADAKAL [18] préconisent d'ailleurs la création de bureaux des ressources génétiques pour assurer la caractérisation, la conservation et la valorisation des ressources génétiques bovines en Afrique. Ainsi, le cas de la race Azawak élevée à la station expérimentale de Toukounous au Niger est assez édifiant.

Les filières de productions animales urbaines et périurbaines sont en plein essor dans presque toutes les grandes villes du Sahel. Il est donc impératif de promouvoir l'exploitation des races locales améliorées dans les élevages péri-urbain et urbain. Les performances zootechniques enregistrées avec la race Azawak doivent motiver l'adoption de cette politique. La promotion des races locales doit être suivie par des mesures d'accompagnement (Santé et alimentation) pour mieux exploiter le potentiel génétique des animaux.

Et enfin, certains pays du Sahel ont opté pour l'insémination artificielle comme outil d'amélioration de la production laitière dans les élevages urbains et périurbains. Récemment introduite au Niger, elle requiert d'une part, un changement dans le mode de gestion de l'élevage (stabulation) et d'autre part, une bonne gestion de la santé et de l'alimentation des vaches croisées.

Conclusion

L'élevage au Sahel doit faire face à d'énormes épreuves: foyers de tension, amenuisement des ressources naturelles, faible rentabilité, maladies... etc. Le projet de durabilité de l'élevage nécessite l'implication des éleveurs et des autorités publiques pour s'affranchir de la fatalité des aléas climatiques.

Bibliographie

- 1- ACHARD F. et CHANONO M., 1995.- Un système d'élevage performant bien adapté à l'aridité à Toukounous, dans le Sahel nigérien. *Sécheresse*, 6 : 215-222.
- 2- BADA-ALAMBEDJI R.; KANE Y.; ISSA IBRAHIM A.; VIAS F.G. et AKAKPO A.J., 2005.- Bactéries associées aux mammites subcliniques dans les élevages bovins laitiers urbains et périurbains de Niamey (Niger). *RASPA*, 3(2):119-124.
- 3- BOLY H.; BOSMA B.M.; SAWADOGO L. et LEROY P., 2003.- Amélioration génétique en production laitière bovine traditionnelle : zone périurbaine de Ouagadougou et de Dori (Burkina Faso). In Séminaire Sous Régional "Lait Sain pour le Sahel", Mali, Bamako, 24 février.
- 4- BOLY H.; SOMÉ S.S.; KABRÉ A.; SAWADOGO L. et LEROY P., 2000.- Performances laitières du zébu Azawack en zone soudano-sahélienne (station de Loubila au Burkina Faso). *Annales de l'Université de Ouagadougou*, 8: 127-139.
- 5- BONFOH B.; FOKOU G.; OULD TALEB M.; FANE A.; WOIRIN D.; N. LAIMABAO J. et ZINSSTAG., 2007.- Dynamiques des systèmes de production laitière, risques et transformations socio-économiques au Mali. *Revue Elev.Méd.vet. Pays trop.*, 60: 67-76.
- 6- BOUKARY A.R., 2012.-Epidémiologie de la brucellose et de la tuberculose animales dans les milieux urbain, périurbain et rural au Niger. Thèse doctorat en sciences vétérinaires: Liège. (N° ??????)
- 7- CIPEA, FAO et UNEP, 1979.- Le bétail trypanotolérant d'Afrique Occidentale et Centrale. Tome 1 : Situation générale. Addis Abéba : CIPEA : 156p.
- 8- COCHEME J. et FRANQUIN P., 1967.- Une étude d'agrocimatologie de l'Afrique occidentale. World Meteorological Organisation Technical Report. Geneva (Nombre de page?????)
- 9- COULOMB J.; 1976.- La race N'Dama : quelques caractéristiques zootechniques. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 29: 367-380.
- 10- DIADHIOU A., 2001.- Etude comparative de deux moyens de maîtrise de la reproduction (L'implant CRESTAR® et la Spirale FRID®) chez les vaches N'Dama et Gobra au Sénégal. Thèse Méd. Vét : Dakar. (N° ??????)
- 11- DICKO M.S.; DJITEYE M.A. et SANGARE M., 2006.- Les systèmes de production animale au Sahel. *Sécheresse*, 17: 83-97.
- 12- DIOUF M.N., 1991.- Endocrinologie sexuelle chez la femelle N'Dama au Sénégal. Thèse Méd. Vét : Dakar. (N° ??????)
- 13- DIOP P.E.H., 1997.- Production laitière en Afrique subsaharienne : problématique et stratégie. *Cahiers Agricultures*, 6: 213-224.
- 14- ISSA I.A.; BADA-ALAMBEDJI R.; DUPREZ J.-N.; DJIKA. MOULA N.; OTE I.; BARDIAU M. et MAINIL, J.G., 2013.- Bacterial mastitis in the Azawak zebu breed at the Sahelian experimental station in Toukounous (Niger): Identification and typing of *Staphylococcus aureus*. *International Research Journal of Microbiology*, 4:168-178.
- 15- HAMADOU S.T. et TOEZ., 2008.- Le lait, produit de diversification en zone périurbaine à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Cahiers Agricultures*, 17: 473-478.
- 16- HAROUNA A.; ZEOCHINI M.; LOCATELLI C.; SCACCABAROZZI L.; CATTANEO C.; AMADOU A.; BRONZO V.; MARICHATOU H.; BOETTCHER P.J.; ZANONI M.G.; ALBORALI L. et MORONI P., 2009.- Milk hygiene and udder health in the periurban area of Hamdallaye, Niger. *Trop. Anim. Health Prod.* 41:705-710.
- 17- MARICHATOU H.; KORE H.; MOTCHO H.K. et VIAS G., 2005.- Synthèse sur les filières laitière au Niger/Reseau de Recherche et d'Echange sur les Politiques laitière (REPOL), Document N° 04. (nombre de page ??????)
- 18- MISSOHOU A. et ADAKAL H.E.H., 2004.- Situation actuelle et perspectives d'une Gestion durable des ressources génétiques bovines d'Afrique de l'Ouest. (429-435) In : Colloque développement durable leçonset perspectives,Ouagadougou (BurkinaFaso), 735p.
- 19- HOSTE C.L.; DESLANDES P. et POIVEY J.P., 1983.- Etude de la production laitière et de la croissance des veaux de vaches allaitantes N'Dama et Baoulé en Côte d'Ivoire et estimations des productions laitières. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 36 :197-205.
- 20- KEITA N.S., 2005.- Productivité des bovins croisés laitiers dans le bassin arachidier. Cas des régions de Fatick et Kaolack. Thèse Méd. Vét : Dakar. (N° ??????)
- 21- KONTE M., 2003.- Etude de la prévalence des mammites chez les bovins méisés et locaux des systèmes de production semi-intensifs de Kaolack et de Fatick. In: Actes de l'atelier de restitution des résultats du projet PROCORDEL au Sénégal, Dakar, 22 décembre.
- 22- REGE J.O., 1999.- The state of African cattle genetic resources. Classification framework and identification of threatened and extinct breeds. * Bulletin d'information sur les ressources génétiques animales, 25: 1-26.
- 23- SEYDOU B., 1981.- Contribution à l'étude de la production laitière du zébu Azawak au Niger. Thèse Méd. Vét : Dakar. (N° ??????)
- 24- SIDIBE S.S.; DICKO N.A.; FANE A.; DOUMBIA R.M.; SIDIBECK.K.; KANTE S.; MANGANE O.; KONATE B.; KONE A.Z.; MAÏGA M.S. et FOFANA M., 2003.- Tuberculose bovine au Mali : résultats d'une enquête épidémiologique dans les élevages laitiers de la zone périurbaine du district de Bamako. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 56:115-120.
- 25- SISSOKO M., 2003.- Evaluation des risques de maladies à transmission vectorielle chez les bovins locaux et les méisés F1 dans les systèmes d'élevage en zone sub-humide (Régions de Kolda et Tambacounda). In : Actes de l'atelier de restitution des résultats du projet PROCORDEL au Sénégal, Dakar, 22 décembre.
- 26- SISSOURAN V., 2003.- Le rôle de la femme peule dans l'élevage laitier en Afrique Subsaharienne. Synthèse bibliographique, DESS Productions animales en régions chaudes, Montpellier. (N° ??????)
- 27- SOULARD, 1994.- L'élevage laitier au Niger. Etude technico-économique de deux systèmes d'élevage amélioré. Mémoire de fin d'étude, Institut Supérieur Technique d'Outre Mer. (N° ???? N° ??????)
- 28- SOW D.F., 2004.- Caractérisation socio-économique de la filière laitière dans les systèmes mixtes intensifs ou semi-intensifs du centre du bassin arachidier du Sénégal. In: Actes de l'atelier de restitution des résultats du projet PROCORDEL au Sénégal, Dakar, 22 décembre .
- 29- TRAORE A.; TAMBOURA H.H.; BAYALA N.; ROUJAMBA D.W.; YAMEOGO N. et SANOU M., 2004.- Prévalence globale des pathologies majeures liées à la production laitière bovine en système d'élevage intraurbain à Hamdallaye (Ouagadougou). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 8:3-8.
- 30- ZAMBA P., 1969.- Performances de reproduction poids à la naissance et au sevrage des zébus goudal et wakwa de la station zootechnique de wakwa (Cameroun). Thèse Méd. Vét : Dakar. (N° ??????)



1.3. La zone d'étude

1.3.1. Présentation générale

La présente étude a été menée au niveau de la station expérimentale sahélienne de Toukounous. Toukounous est un village situé à 220 km au nord-est de Niamey dans le département de Filingué, région de Tillabéry (Figure 2). La principale activité économique de la population est l'élevage. La station expérimentale sahélienne de Toukounous fait partie des six centres de multiplication de bovins au Niger (Tableau 1). Les infrastructures opérationnelles sont celles qui assurent la livraison du lait, le transport des trayeurs à l'aire de traite, le fonctionnement du le groupe électrogène qui alimente la cuve pour la conservation du lait et celui des pompes immergées pour l'approvisionnement en eau. La vente du lait et celle des animaux sont les principales sources de revenu de la station en plus de la subvention de l'Etat. Le lait est vendu soit localement auprès des coopératives féminines pour la fabrication du fromage, soit via l'industrie laitière au niveau de la capitale. Les animaux sont, quant à eux, vendus au poids

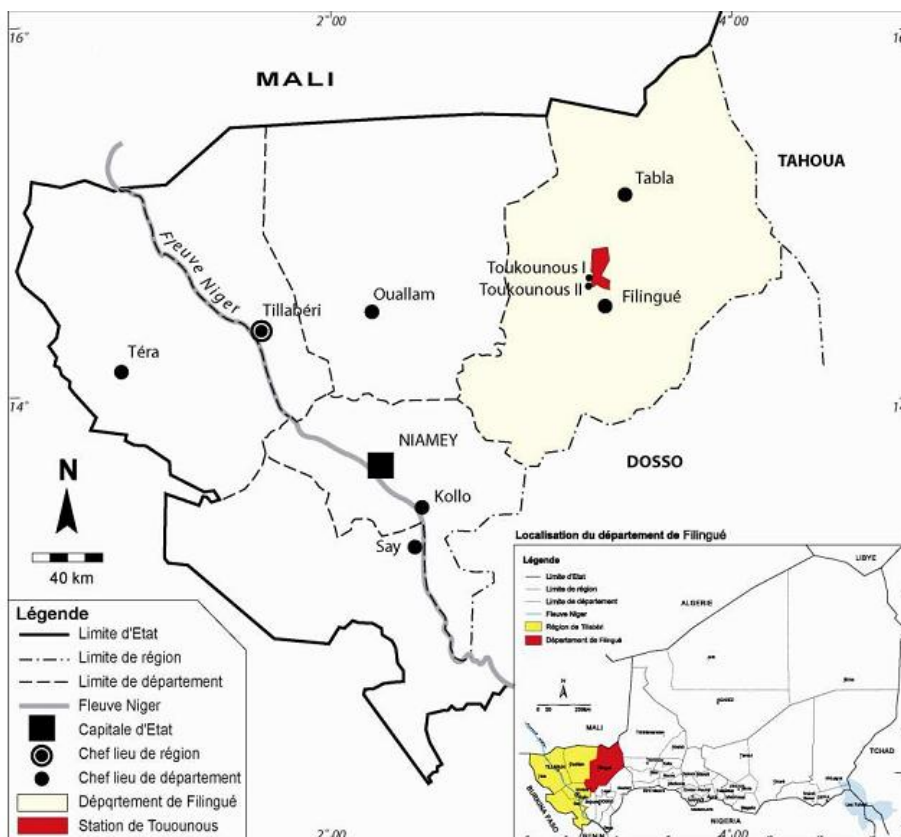


Figure 2 : Localisation de la station sahélienne expérimentale de Toukounous au Niger.

Tableau 1 : Les Centres de multiplication des bovins au Niger

Centre de multiplication	Date de Création	Superficie (ha)	Type de bovins élevés
Toukounous	1954	4.474	Azawak
Kirkissoye	1966	120	Azawak Gudali
Ibécétene	1975	42.000	Azawak
Fako	1977	28.000	Bororo
Sayam	1979	29.000	Kouri
Bathé	1980	33.000	Azawak

1.3.2. Structure des troupeaux

Les animaux sont scindés en douze (12) troupeaux répartis selon l'âge, le sexe et l'état physiologique :

- ✚ Taureaux: mâles entiers de plus de 3 ans ;
- ✚ Taurillons : mâles entiers de plus de 2 ans et de moins de 3ans ;
- ✚ Veaux sevrés : mâles du sevrage à 2ans ;
- ✚ Velles sevrées : femelles du sevrage avant la mise à la reproduction
- ✚ Primipares ;
- ✚ Vaches suitées élites ;
- ✚ Vaches suitées non-élites ;
- ✚ Vaches et génisses gestantes d'élites ;
- ✚ Vaches et génisses gestantes non-élites ;
- ✚ Vaches et génisses en Progeny-Test d'élites ;
- ✚ Vaches et génisses en Progeny-Test non-élites ;
- ✚ Veaux et velles non sevrés

1.3.3. Alimentation des animaux

L'alimentation des animaux est basée sur l'exploitation du pâturage naturel. L'étude de la flore et de la végétation herbacée rencontrée à la station sahélienne expérimentale de Toukounous rapporte la répartition ci-après : graminées annuelles (69,5%), légumineuses annuelles (8,2%) et autres (22,3%), avec des valeurs pastorales pouvant aller à 87,5% (Saidou *et al.*, 2010). L'exploitation du pâturage se fait d'une manière rationnelle dans les cinq parcs morcelés en 30 parcelles variant entre 49 à 283 ha (Figure 3). Ainsi, 10 à 15 parcelles sont pâturées durant la saison des pluies et seront réservées pour la saison sèche de l'année suivante afin que le stock de semences puisse se reconstituer. L'abreuvement des animaux se fait *ad libitum* à partir de forages équipés de système de pompage. La complémentation alimentaire est sélective et est limitée aux vaches laitières, aux vaches gestantes, aux animaux affaiblis et/ou malades et aux veaux. Ces animaux reçoivent des graines de coton, du tourteau d'arachide et souvent du son de blé. En raison du coût élevé des compléments alimentaires, la complémentation se fait durant la saison sèche. Par contre, du sel, sous forme de pierre à lécher, est distribué aux animaux deux fois dans l'année, une fois durant la saison de pluie et une seconde fois durant la saison froide.

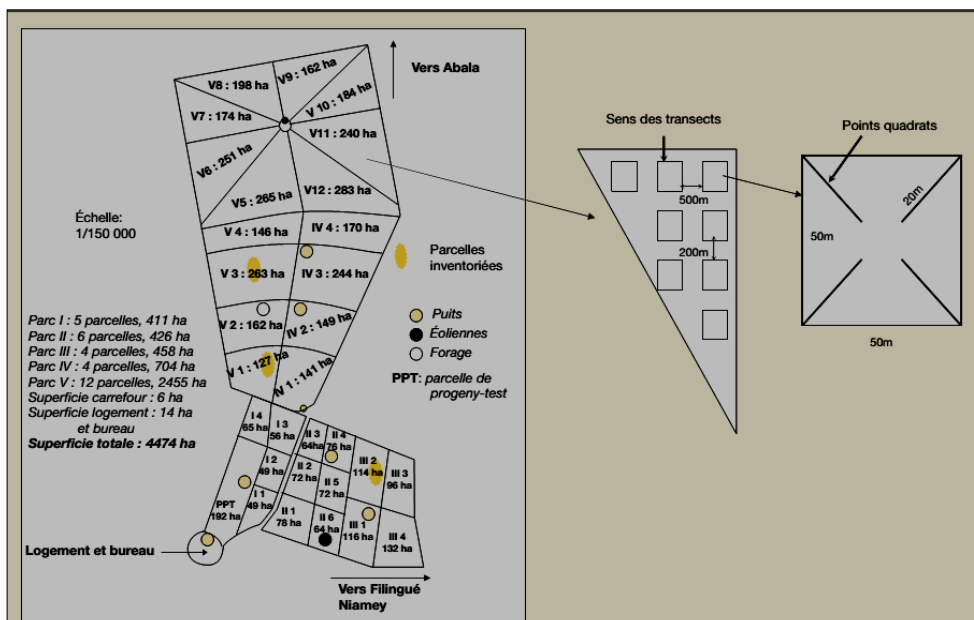


Figure 3 : Carte topographique de la station sahélienne expérimentale de Toukounous.

1.3.4. Suivi sanitaire des animaux

Sur le plan sanitaire, l'intervention s'articule autour de trois axes : la vaccination, le déparasitage et le traitement des animaux malades. Les animaux sont vaccinés contre les principales maladies, particulièrement celles qui sont réputées légalement contagieuses à savoir la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) à *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* variant « small colony », la pasteurellose septicémique bovine à *Pasteurella multocida* B et E le charbon symptomatique à *Clostridium chauvoei* et le charbon bactérien, ou anthrax, à *Bacillus anthracis*. Le déparasitage est systématique à la station expérimentale sahéenne de Toukounous. Chaque semaine, les animaux subissent en masse un déparasitage externe par pulvérisation contre les tiques. Ensuite, deux fois par an, les animaux sont traités contre les parasites gastro-intestinaux, une première fois en début de saison des pluies et une seconde fois en début de saison sèche. Quant aux animaux malades, ils reçoivent des traitements appropriés sous la supervision du vétérinaire en charge du suivi sanitaire.

PARTIE 2 : Les mammites bovines

2.1. Les aspects cliniques

La mammite est une inflammation de la mamelle dont l'origine la plus fréquente est la pénétration de bactéries dans un quartier par le canal de trayon. Chez la vache, la mammite se manifeste par:

- ❖ une modification non clinique de la sécrétion lactée (diminution de production et augmentation du nombre de cellules somatiques sans aucun signe clinique);
- ❖ une modification de la sécrétion suivie de signes cliniques fonctionnels (grumeaux, sang ou caillots sanguins, pus dans le lait), de signes cliniques locaux (gonflement, chaleur, douleur, rougeur) et de signes cliniques généraux (température \pm élevée, avec ou sans appétit et, quelquefois, en décubitus, un état de choc).

2.1.1. Les mammites subcliniques

Les mammites subcliniques sont insidieuses et caractérisées par une absence de signes cliniques. L'inflammation due à l'infection s'accompagne essentiellement d'un afflux de cellules somatiques dans le lait du quartier infecté, particulièrement les polynucléaires neutrophiles, et par une modification de la composition chimique du lait (baisse des taux de caséine et de lactose, augmentation des taux d'électrolytes). Le diagnostic des mammites subcliniques repose sur la numération des cellules somatiques du lait, la mise en évidence des modifications chimiques et la recherche de la bactérie en cause. L'augmentation des cellules somatiques peut être révélée par des méthodes de comptage, comme le California Mastitis Test (CMT), le Fossomatic[®], le Coulter Conter[®], la conductivité électrique. Lors de mammite subclinique, les bactéries peuvent persister dans le pis et l'infection devenir chronique suite à l'expression de certaines propriétés. Par exemple, la formation d'un biofilm, la survie à l'intérieur des cellules épithéliales mammaires et/ou l'absence de synthèse d'une capsule sont considérées comme trois propriétés impliquées dans la chronicité d'une infection à *S. aureus* (Bardiau *et al.*, 2014).

2.1.2. Les mammites cliniques

Les mammites cliniques se caractérisent par la présence des signes cliniques fonctionnels et locaux, voire généraux. Les signes cliniques fonctionnels se traduisent par une modification de la sécrétion de la glande mammaire matérialisée par un changement de l'aspect du lait (grumeaux, sang ou caillots sanguins, pus dans le lait) et de la composition du lait. Les signes locaux sont ceux observés lors d'un processus inflammatoire classique à savoir : rougeur, tuméfaction, chaleur et douleur du quartier atteint. Et enfin, les signes cliniques généraux se traduisent par de l'abattement, de l'anorexie, de l'hyperthermie, une arumination, une déshydratation et des troubles locomoteurs. Les infections mammaires cliniques peuvent être distinguées selon la sévérité de ces signes cliniques.

Ainsi, les mammites suraiguës se caractérisent par la rapidité de leur apparition et de leur évolution, souvent mortelles en l'absence de traitement. Elles peuvent revêtir deux formes chez les bovins, la forme paraplégique et la forme gangréneuse. La forme paraplégique est associée le plus souvent aux coliformes. Elle est caractérisée par une agalaxie brutale, une toxémie, une hyperthermie, une hypocalcémie, de la tachycardie, de l'anorexie, l'atonie du rumen et de la diarrhée. Le quartier atteint est chaud, enflé et douloureux. Le lait peut être blanc avec une consistance aqueuse ou devenir jaune et séreux avec des caillots observables à l'épreuve du bol à fond noir (Remy, 2004). Elles surviennent généralement quelques jours après le vêlage (Green *et al.*, 1998). Leur évolution peut être fatale (Wenz *et al.*, 2001). Le diagnostic nécropsique montre des lésions localisées au niveau des canaux et des alvéoles (Remy, 2004). Les mammites gangréneuses sont relativement rares, souvent fatales pour les animaux atteints. Certains auteurs décrivent la mastectomie comme traitement de choix dans les mammites gangréneuses chez les ruminants (Frank, 2002 ; Ribeiro *et al.*, 2007). *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* et *Escherichia coli* sont les bactéries prédominantes responsables de mammites gangréneuses chez les ruminants (Bradley et Green et 2004 ; Atyabi *et al.*, 2006).

Dans les mammites aiguës, l'inflammation du quartier atteint est évidente (rougeur, gonflement, douleur, chaleur) et la production laitière est affectée tant dans la qualité que dans la quantité, alors que l'état général de l'animal n'est pas ou peu altéré. Cette symptomatologie n'est pas spécifique à une espèce bactérienne particulière et peut apparaître à tous les stades de la lactation.

2.2. Les mécanismes de défense de la mamelle

2.2.1. Au niveau du trayon

Le canal du trayon est la principale voie d'entrée des bactéries lors des mammites ainsi que la première ligne de défense de la glande mammaire. L'extrémité distale du canal du trayon est normalement hermétiquement fermée par les muscles du sphincter, empêchant ainsi l'entrée des germes pathogènes. La paroi interne de ce canal du trayon est tapissée par de la kératine qui empêche la migration des bactéries et qui contient des acides gras à longues chaînes qui aident dans la lutte contre l'infection (Viguié *et al.*, 2009). Toutefois, l'efficacité de ces défenses est limitée à l'approche de la parturition, car il résulte une pression intra-mammaire accrue qui entraîne la dilatation du canal et des fuites de sécrétions mammaires (Capuco *et al.*, 1992) et, lors de la traite, le canal du trayon est également distendu (Rainard *et al.*, 2006). En outre, les muscles du sphincter exigent 2 heures de temps pour revenir à leur position de contraction (Capuco *et al.*, 1992). Une fois que les bactéries ont dépassé ces barrières anatomiques au niveau du trayon, elles doivent ensuite échapper aux composants cellulaires des mécanismes de défense de la glande mammaire.

2.2.2. Au niveau de la glande mammaire

Les mécanismes de défense cellulaire de la glande mammaire sont composés des polynucléaires neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes. Les polynucléaires neutrophiles (PMN) de la glande mammaire constituent la première ligne de défense cellulaire contre les bactéries mammopathogènes et représentent 90% des cellules dans la sécrétion lactée lors de mammites (Rainard, 1985). Les étapes conduisant à la destruction des bactéries par les PMN passent par leur recrutement à la faveur de la libération des cytokines comme le facteur α de nécrose des tumeurs (TNF- α), des interleukines (IL-8, IL-1) et de la prostaglandine (F2 α) (Viguié *et al.*, 2009 ; Semnani *et al.*, 1993). Ces cytokines favorisent l'afflux massif des PMN au niveau du site de l'infection. Les bactéries phagocytées sont tuées par l'action des ions superoxydes (O_2°) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Paape *et al.*, 1991). Les macrophages représentent, eux, le type cellulaire dominant du lait provenant d'une mamelle saine (Lee *et al.*, 1980 ; Paape *et al.*, 1991). Ces cellules interviennent aussi dans la phagocytose et participent à la réponse immunitaire spécifique en jouant un rôle dans le déclenchement et l'expression des

réponses immunitaires, après digestion et présentation des antigènes, via l'activation des lymphocytes (Haddadi, 2006). Quant aux lymphocytes, une fois activés, ils produisent les anticorps.

Les mécanismes de défense moléculaire de la glande mammaire sont divisés en innés et acquis. Les mécanismes innés sont représentés par des molécules à activité antimicrobienne et par le complément. Parmi les molécules à activité microbienne, les plus importantes sont la lactoferrine et le système lactoperoxydase (LPS). La lactoferrine est capable de séquestrer le fer et le rendre indisponible aux bactéries qui en ont besoin pour leur croissance comme cofacteur enzymatique. Le système lactoperoxydase (LPS) rencontré dans le lait est composé de trois éléments, la lactoperoxydase, l'ion thiocyanate et le peroxyde d'hydrogène. C'est la réaction entre le thiocyanate et le peroxyde d'hydrogène, catalysée par la lactoperoxydase qui donne le principe actif antimicrobien de ce système (Jacob *et al.*, 2000).

Le LPS est actif contre les bactéries telles que les streptocoques, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Outteridge *et al.*, 1988 ; Meunier, 1999). De par ses propriétés biologiques, à savoir l'opsonisation des bactéries, la cytolysse des bactéries Gram négatives et la mobilisation des PMN, le complément, une fois activé, participe aussi à l'élimination des bactéries dans la mamelle (Sordillo *et al.*, 1996).

La mamelle bénéficie également des mécanismes acquis de défense moléculaire, à savoir les immunoglobulines qui interviennent à différents stades de l'infection après activation de la réponse immune et sécrétion par les lymphocytes (Poutrel, 1983). Ainsi, les immunoglobulines peuvent :

- empêcher l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales mammaires, ce qui facilite l'excrétion de ces bactéries lors du processus de la traite ;
- rendre plus efficace la phagocytose par les PMN (= opsonisation) ;
- neutraliser les toxines bactériennes.

2.3. Les bactéries mammothogènes

Les bactéries responsables de mammites peuvent être distinguées en deux groupes. Le premier groupe est constitué par des bactéries qui vivent sur la vache et se transmettent d'animal à animal ou d'un quartier à un autre à l'occasion du processus de la traite. Ces bactéries sont à

l'origine de l'apparition dans les élevages laitiers de mammites contagieuses. Les bactéries responsables de mammites contagieuses regroupent classiquement *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* et *Mycoplasma spp* (George *et al.*, 2008) et à cela s'ajoutent les staphylocoques coagulase négative. Le deuxième groupe des bactéries responsables de mammites est constitué des germes qui vivent dans l'environnement de la vache. Ces germes contaminent directement la mamelle entre les traites (lors du couchage) par simple contact avec la litière qui est une source majeure de contamination favorable à la multiplication des germes dans le cas où l'environnement des animaux est mal entretenu. Les principales bactéries responsables des mammites environnementales sont essentiellement représentées par *Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae*, *Enterococcus spp*, *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp* et *Pseudomonas spp*, (Georges *et al.*, 2008). A ces bactéries s'ajoutent également quelques champignons et levures.

2.3.1. Les agents étiologiques contagieux

✓ *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, immobiles, groupés en amas, non sporulés appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*. Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires, commensales de la peau et des muqueuses des mammifères et des oiseaux. Dans un élevage laitier, *S. aureus* peut coloniser le lait des vaches en lactation, les vaches tarées, les veaux, la surface de la peau, les trayons, le vagin, le mufler (Boddie *et al.*, 1987 ; Roberson *et al.*, 1998, Matos *et al.*, 1991). Cependant, la principale source d'infection est le lait provenant des quartiers infectés mais aussi les mains des trayeurs et l'équipement de la traite (George *et al.*, 2008). Il existe des différences entre les souches de *S. aureus* isolés au niveau des différents sites c'est-à-dire le lait, la peau du trayon, les mains, et l'équipement de traite (Zadoks *et al.*, 2002).

✓ *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae est un cocci à Gram positif, β hémolytique, appartenant au groupe B de la classification de Lancefield. C'est une bactérie hautement contagieuse, parasite obligatoire de

la glande mammaire, car elle ne survit que très peu de temps en milieu extérieur. La bactérie est généralement responsable de cas de mammites subcliniques avec, souvent aussi des cas cliniques (George *et al.*, 2008). Le lait de la mamelle infectée constitue la principale source de contamination dans les élevages laitiers. La contamination intervient à l'occasion de la traite.

✓ *Mycoplasma bovis* et *Mycoplasma spp*

Ce genre bactérien caractérisé par l'absence de la paroi, est doué d'une capacité de persistance dans l'environnement notamment sur le matériel de traite ou encore dans le fumier (Pfützner, 1984 ; Le Grand *et al.*, 1996). Dans les élevages laitiers, *M. bovis* est l'espèce le plus souvent isolée, et dans la plupart de cas, responsable des infections mammaires (Bennett et Jasper, 1978). Une fois que l'infection s'établit dans un élevage, sa transmission d'un animal à un autre se fait lors de la traite mais elle peut aussi être congénitale ce qui contribue au maintien de l'infection dans le troupeau (Quinn *et al.*, 2011).

✓ Les staphylocoques à coagulase négative

Le groupe des staphylocoques à coagulase négative (SCN) comprend 39 espèces dont une dizaine a été isolée des cas de mammites avec la prédominance d'un petit nombre (Pyorala et Taponen, 2009). Dans les élevages, la prévalence des mammites à SCN est plus élevée autour du vêlage chez les primipares et les vaches (Aerestrup et Jensen, 1997 ; Rajala-schulz *et al.*, 2004). Les staphylocoques à coagulase négative peuvent être isolés des sites extra-mammaires comme la peau, le canal du trayon, et leur transmission est facilitée lorsque les mesures d'hygiène sont inadéquates (Trinidad *et al.*, 1990 ; Matos *et al.*, 1991 ; George *et al.*, 2008). Généralement, ce groupe de bactéries provoque des mammites subcliniques, et dans quelques rares cas des mammites cliniques (Pyorala et Taponen, 2009). Près de 15 espèces différentes ont été mises en évidence dans des cas de mammites (Persoson *et al.*, 2011) dont les plus fréquentes sont *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus cohnii*. Dans ce groupe, certains se comportent comme des bactéries contagieuses et d'autres comme des bactéries environnementales. Par exemple, *Staphylococcus chromogenes* est beaucoup moins isolé de l'environnement que dans le lait des vaches (Piessens *et al.*, 2011). Par contre, les souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées de

mammites sont caractérisées par une faible hétérogénéité au sein de l'espèce, ce qui traduit un modèle contagieux du type de mammites Thorberg *et al.*, 2009; Piessens *et al.*, 2011). Le modèle contagieux et environnemental de mammites a été observé avec les souches de *Staphylococcus simulans* (Piessens *et al.*, 2011).

2.3.2. Les agents étiologiques de l'environnement

✓ *Streptococcus uberis*

C'est un cocci à Gram positif, α hémolytique, esculines +, saprophyte du milieu extérieur. La bactérie est retrouvée au niveau des trayons, sur la peau de la mamelle, dans le rumen, dans la cavité buccale et au niveau du vagin (George *et al.*, 2008). Les infections mammaires à *S. uberis* s'installent au cours de la lactation ou durant la période sèche avec des manifestations cliniques ou subcliniques (George *et al.*, 2008). Des études ont montré que deux types de modèles épidémiologiques différents peuvent être définis dans le cas des infections à *S. uberis* (Serieys, 2004 ; George *et al.*, 2008). Dans le premier modèle, les infections s'installent au cours de la période sèche ou durant la lactation, et la contamination se fait essentiellement à partir de sources environnementales par des souches polyclonales. Dans le second modèle, la contamination se fait d'un quartier à un autre à l'occasion de la traite avec un nombre limité de souches (oligoclonal).

✓ *Streptococcus dysgalactiae*

S. dysgalactiae est une cocci à Gram positif, α hémolytique appartenant au groupe C de la classification de Lancefield. Cette bactérie occupe une position intermédiaire entre les germes contagieux et les germes de l'environnement. En effet, elle peut se retrouver dans l'environnement de la vache, et a été isolée de sites extra-mammaires comme au niveau des amygdales, de la bouche ou encore du vagin (Quinn *et al.*, 2011), mais aussi à partir du pis, et sur les lésions des trayons (Schalm *et al.*, 1971). La transmission de la bactérie se fait principalement pendant la traite (Bramley et Dodd, 1984).

✓ *Enterococcus spp.*

Le genre *Enterococcus* appartient à la famille des *Enterococcaceae*. Ce sont des coques ovoïdes, à Gram positif et appartiennent au groupe D de Lancefield. Les espèces les plus couramment isolées de cas de mammites bovines sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* (Devriese *et al.*, 1999; Tenhagen *et al.*, 2006). Ce sont des germes pathogènes de l'environnement retrouvés au niveau de la litière, de l'intestin et sur la peau des vaches (Bradley, 2002).

✓ *Trueperella pyogenes*

Anciennement successivement appelé *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces pyogenes*, et enfin *Arcanobacterium pyogenes*, *T. pyogenes* est un coccobacille à Gram-positif, non sporulé, immobile qui apparaît seul, en paire (en forme de V ou T) ou en grappe (Yassin *et al.*, 2011). Cette bactérie peut être retrouvée au niveau des voies respiratoires supérieures, au niveau urogénital et gastro-intestinal et est responsable des infections pyogènes chez les bovins (Wüst *et al.*, 1993 ; Jost *et al.*, 2005). *T. pyogenes* est responsable de diverses maladies, particulièrement la «mammite d'été». Les vaches sont infectées lorsque les trayons sont en contact avec un environnement contaminé telles les zones de mise bas, le logement des vaches taries, mais cette bactérie est également transmise par les mouches (George *et al.*, 2008).

✓ **Les bacilles à Gram négatif**

Il s'agit principalement des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et à la famille des *Pseudomonadaceae*.

Les *Enterobacteriaceae* sont des germes peu exigeants, oxydase négative, retrouvés dans le sol, dans l'eau, et surtout dans l'intestin de l'homme et des animaux et renferment un nombre très élevé de genres et d'espèces. Dans le cas des infections mammaires, on peut les distinguer en deux groupes, celles qui sont lactose+ notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, communément appelées coliformes, et celles qui sont lactose- comme *Serratia spp*. Les infections mammaires dues aux coliformes présentent deux caractéristiques qui dépendent du moment de leur installation. En effet, Serieys (2004) rapporte, que les

souches qui s'installent durant la lactation provoquent des mammites plus sévères que celles qui s'installent durant la période du tarissement. Le même auteur rapporte que les souches qui s'installent durant le tarissement présentent une certaine spécificité qui les distinguent des autres souches notamment une capacité d'acquisition de fer plus élevée malgré la forte concentration de la lactoferrine durant cette période, une meilleure capacité d'adhérence et d'internalisation dans les essais *in vitro*, et secrètent plus fréquemment une capsule polysidique qui les rend résistantes à la phagocytose.

Les *Pseudomonadaceae* particulièrement, *Pseudomonas aeruginosa* impliquée dans la mammite bovine, est une bactérie mobile, aérobie stricte, oxydase positive, saprophyte du milieu extérieur retrouvée dans l'eau et les sols humides (Spiers *et al.*, 2000). La bactérie provoque généralement des mammites sporadiques avec souvent des formes suraigües caractérisées par une sécrétion séro-hémorragique (Osborne *et al.*, 1981).

2.3.3. Les autres agents étiologiques

D'autres agents étiologiques comme les levures et les algues sont également responsables des mammites. Les levures sont retrouvées dans des endroits humides, riches en matière organique, et sont isolées à partir des trayons mais aussi du matériel de traite (Keller *et al.*, 2000). Bien que la fréquence des mammites à levure soit faible, occasionnellement des cas d'épidémie peuvent être observés notamment dans les élevages avec des mesures d'hygiène défailante et ou associés à des traitements intra-mammaires répétitifs (Farnsworth et Sorensen, 1972 ; Moretti *et al.*, 1998 ; Elad *et al.*, 2000 ; Crawshaw *et al.*, 2005). Plusieurs espèces de levures du genre *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* et *Trichosporum* ont été associées aux mammites bovines, mais *Candida spp* est le genre le plus fréquemment isolé à partir de cas de mammite mycosique chez les bovins (Farnsworth et Sorensen ; Aalbaek *et al.*, 1994 ; Krukowski *et al.*, 2006). L'infection peut se faire lors des injections des infusions intra-mammaires contaminées ou par le manchon du trayeur (Radostitis *et al.*, 2007). Parmi les algues connues qui provoquent des maladies chez les humains et les animaux, on peut citer le genre *Prototheca* (*P.*), notamment *P. zopfii* et *P. wickerhamii* (Moller *et al.*, 2007). *P. zopfii* a été identifié comme un agent pathogène responsable de mammites bovines en 1952 (Moller *et al.*, 2007). Dans le passé, cette algue entraînait des mammites sporadiques, et de nos jours, ces mammites sont devenues endémiques (Costa *et al.*, 1996 ; Janosi *et al.*, 2001). Tout comme

Candida spp, les infections dues à *Prototheca spp* se font via les injections intra-mammaires (Taniyama *et al.*, 1994).

2.4. Les mammites à *S. aureus*

Les mammites à *S. aureus* peuvent revêtir diverses formes suivant qu'elles soient associées ou non à des signes cliniques (Sutra et Poutrel, 1994). Bien que *S. aureus* puisse provoquer des mammites cliniques aiguës, ces infections mammaires ont tendance à devenir chroniques. Cette capacité de *S. aureus* à provoquer une infection chronique est corrélée à sa faculté à échapper à la réponse immune et à persister à long terme dans des niches particulières au sein de la mamelle (Humblet et Godeau, 2005 ; Wallemacq *et al.*, 2010). Des formes de mammites suraiguës ont également été rapportées, et elles sont caractérisées par une dégradation de l'état général, une déshydratation, une anorexie, avec une hypothermie ou une hyperthermie (Strandberg *et al.*, 2005 ; Wallemacq *et al.*, 2010). La forme gangréneuse est caractérisée par une forte inflammation, et une nécrose au niveau du quartier atteint qui devient froid, bleuâtre, avec une sécrétion gazeuse rouge foncée dégageant une odeur nauséabonde (Rainard et Riollet, 2006 ; Strandberg *et al.*, 2005 ; Wallemacq *et al.*, 2010).

2.4.1. Les facteurs de virulence de *S. aureus*

La pathogénicité de cette bactérie est liée à l'expression des facteurs de virulence qui interviennent pour assurer l'adhérence de la bactérie aux cellules hôtes, ou pour engendrer des dommages tissulaires ou encore échapper au système immunitaire. La virulence de *S. aureus* réside dès lors dans sa capacité de colonisation, de sécrétion des toxines, des enzymes ou encore dans sa capacité à former du biofilm et de survie intracellulaire.

2.4.1.1. Les protéines de surface

L'adhérence est considérée comme une étape indispensable à la colonisation du tissu mammaire. Cette étape requiert la présence de protéines particulières, à fonction d'adhésines, par lesquelles *S. aureus* se fixe aux cellules et à la matrice extracellulaire. Les adhésines appartiennent à la famille des *Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM), qui, pour la plupart sont ancrées dans le peptidoglycane de la

bactérie (Brun *et al.*, 2007). Les principales adhésines sont la protéine de liaison au collagène (Cna), la protéine de liaison à la fibronectine (FnBP), la protéine de liaison au fibrinogène ou « *clumping factor* » (Clf), la protéine de liaison à l'élastine (EbpS), la protéine A (Spa) liant les immunoglobulines (IgG), et enfin les protéines de la famille de Sdr qui sont des MSCRAMM, impliqués dans la liaison au Bpb (bone sialo-binding protein) (Sabat *et al.*, 2006).

Le rôle biologique de la protéine de liaison au collagène (Cna) a été étudié dans un modèle animal, les résultats démontrent que les souches dépourvues du gène codant pour la Cna sont moins virulentes que les souches exprimant le gène (Brun *et al.*, 2007). En effet, les souches Cna⁺ sont capables d'entraîner une inflammation suppurative (Rhem *et al.*, 2000). La capacité de liaison à la fibronectine de *S. aureus* a été rapportée pour la première fois en 1978 par Kuusela, (1978). Cette propriété biologique s'avère être très commune aux souches de *S. aureus* et joue un rôle important dans la première étape de la colonisation du tissu de l'hôte (Rhem *et al.*, 2000). La fibronectine se lie d'une part aux FnBP et d'autre part aux intégrines (localisées au niveau des cellules hôtes). L'interaction ainsi générée serait à l'origine de l'internalisation des bactéries (Fowler *et al.*, 2000). Le clumping factor (Clf) est une protéine responsable de l'adhérence des bactéries au fibrinogène et, *in vitro*, de l'agrégation des bactéries en présence de plasma (Geoghegan *et al.*, 2010). De plus, elle protège les bactéries de l'action du complément en inhibant le clivage de la fraction C3b en iC3b (Hair *et al.*, 2010). Deux variantes ont été décrites chez *S. aureus* (ClfA et ClfB). La protéine ClfA est présente à la surface des bactéries à tous les stades de la croissance bactérienne, alors que la protéine ClfB est présente à la surface des bactéries au début de la phase exponentielle de croissance et seulement en cas de culture anaérobie. Les souches qui possèdent le gène de la protéine ClfA sont associés à la sévérité des signes cliniques de la mammite (Akineden *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2000). La protéine EbpS se lie à l'élastine retrouvée au niveau de certains organes et tissus comme la peau, les poumons et les vaisseaux sanguins (Downer *et al.*, 2002; Park *et al.*, 1991). Cette capacité d'attachement à la matrice extracellulaire permettrait de jouer un rôle dans les infections de la mamelle. La Protéine A (Spa) est une protéine de surface capable de se lier aux immunoglobulines. En effet, cette protéine se fixe sur le fragment Fc des immunoglobulines et empêche l'opsonisation des bactéries (Brun *et al.*, 2007). Cinq à soixante pourcent des souches de *S. aureus* responsables de mammites sont capables de se fixer sur les IgG, et cette fixation est plus forte sur les IgG2 que sur les IgG1 chez les bovins (Poutrel et Caffin, 1988). Dans la famille des protéines Sdr, plusieurs variants ont été décrits (SdrC, SdrD, SdrE) (Sabat *et al.*,

2006). La protéine SdrC est impliquée dans l'adhérence de *S. aureus* aux cellules épithéliales de mammifères (Barbu *et al.*, 2008; Corrigan *et al.*, 2009).

2.4.1.2. Les cytotoxines

S. aureus est aussi capable d'excréter plusieurs autres types de facteurs de virulence notamment les hémolysines, les leucocidines, les entérotoxines et des enzymes extracellulaires. Les hémolysines et les leucocidines sont des toxines à activité membranaire (Brun *et al.*, 2007). Quatre types de toxines hémolytiques ont été décrites à savoir; la toxine α (HLA), la toxine β (HLB), la toxine γ (HLG) et la toxine δ (HLD). L'injection de toxine α purifiée dans une glande mammaire de lapine entraîne une nécrose hémorragique qui est dose dépendante, tandis que l'injection de la toxine β entraîne une inflammation de la glande mammaire associée à un œdème et à un afflux de PMN au niveau des canaux et des alvéoles (Poutrel et Sutra, 1994). La toxine γ (HLG), de par son mécanisme d'action, fait partie des leucocidines qui appartiennent à la famille des toxines synergohyménotropes. Ces dernières sont des toxines à deux sous-unités, S et F, qui agissent en synergie en formant des pores pour lyser les membranes des cellules phagocytaires, notamment les PMN et les monocytes (Brun *et al.*, 2007). Dans une étude faite au Canada, le typage du gène *spa* a démontré que, le t529 est présent dans 60% des souches isolées de cas de mammites cliniques, et ce sérotype est fortement associé à l'expression du gène *hld* (Veh, 2014).

2.4.1.3. Les entérotoxines

Les entérotoxines produites par les *S. aureus* sont impliquées dans des intoxications alimentaires et dans la physiopathologie générale des infections staphylococciques chez les humains et les animaux (Akineden *et al.*, 2001). Ces entérotoxines sont douées de propriété biologique capable d'entraîner une élévation de la température du corps (pyrogenicité), mais aussi capable d'induire l'activation des lymphocytes T (antigenicité) (Dingues *et al.*, 2000). Plusieurs types d'entérotoxines ont été décrits chez *S. aureus*. Les toxines SEA, SEB, SEC, SED, SEE dites "classiques" ont été caractérisées et décrites depuis 1960 (Brun *et al.*, 2007). Au sein de SEC, plusieurs variants ont été mis en évidence sur la base de la spécificité d'hôte (SEC1, SEC2, SEC3, SECbovine, SECovine, SECcaprine et SECcanine (Bergdoll *et al.*, 1965 ; Marr *et al.*, 1993). De nouvelles toxines ou variants ont ensuite été progressivement découverts.

2.4.1.4. Les enzymes

Les enzymes extracellulaires comme les exofoliatines, la staphylokinase, la coagulase, la hyaluronidase ainsi que diverses protéases, lipases, et nucléases sont produites par *S. aureus*. Les exofoliatines A (ETA), ETB, ETC et ETD ont été décrites chez *S. aureus*, mais rarement ou très peu présentes sur les souches responsables des mammites (Karahana *et al.*, 2009; Ote *et al.*, 2009 Larsen *et al.*, 2002 ; Haveri *et al.*, 2007). La staphylokinase est un activateur du plasminogène capable de dissoudre les caillots sanguins. Elle joue, par conséquent, un rôle dans la formation d'embolus septiques à l'origine des métastases infectieuses (Lijnen et Collen, 1996). La coagulase se lie à la prothrombine et l'activation du complexe ainsi formé entraîne la transformation du fibrinogène en fibrine responsable de la coagulation du plasma. Cette action génère dans l'organisme des micro-caillots de fibrine à l'intérieur desquels les bactéries peuvent proliférer et échapper à l'action phagocytaire et/ou thérapeutique. La hyaluronidase est capable d'hydrolyser l'acide hyaluronique qui est un constituant de la substance interstitielle du tissu conjonctif permettant ainsi la fluidification de la substance fondamentale. Or, la substance fondamentale du tissu conjonctif offre une bonne résistance à la pénétration des agents infectieux grâce à sa consistance visqueuse. De par sa propriété évoquée précédemment, la hyaluronidase peut permettre la propagation de l'infection à partir de son site initiale (El-safory *et al.*, 2010).

2.4.1.5. Les composants de surface

Les souches de *S. aureus* sont capables de former du biofilm défini comme étant une communauté structurée de cellules bactériennes enfermées dans une matrice polymérique et adhérent à une surface vivante ou inerte (Costerton *et al.*, 1999). En raison de sa taille et de sa structure chimique, le biofilm offre une résistance à la phagocytose par les macrophages, et même une résistance aux antibiotiques qui ont du mal à diffuser et à atteindre leurs cibles (Monzona *et al.*, 2001). Le gène *ica* code pour des protéines impliquées dans la production de biofilm avec quatre variants (*icaA*, *icaB*, *icaC* et *icaD*) (Dhanawade *et al.*, 2010). Les expériences de Cucarella *et al.*, (2004) ont montré que la capacité de colonisation bactérienne de la glande mammaire est augmentée avec les souches de *S. aureus* mucoïdes porteuses des gènes *icaABCD* et du gène *bap*. Les souches de *S. aureus* porteuses du gène *bap* sont fortement productrices de biofilm, et son expression est suffisante pour induire la production de biofilm

même en absence du gène *ica* (Cucarella *et al.*, 2001 ; Cucarella *et al.*, 2004). Certains auteurs associent la persistance chronique des mammites à la production de biofilm (Costerton *et al.*, 1999 ; Donlan, 2000).

Les polysaccharides capsulaires chez *S. aureus* ont été classés en 11 sérotypes par Karakawa *et al.* (1988). Cependant 80% des souches de staphylocoques responsables de mammite produisent en majorité le type 5 et 8 (Poutrel et Caffin, 1988). Ces antigènes capsulaires sont à l'origine de l'inactivation de la voie alterne du complément se traduisant ainsi par une protection de la bactérie contre la phagocytose (Avril *et al.*, 1992).

Le tableau 2 (page suivante) récapitule les différents facteurs de virulence.

2.4.1.6. La survie intracellulaire

Des études *in vitro* ont démontré que *S. aureus* est capable de survivre à l'intérieur des cellules épithéliales mammaires (Almeida *et al.*, 1996 ; Bayles *et al.*, 1998). Toutefois, *S. aureus* a été mis en évidence dans différents types cellulaires, notamment dans des macrophages et les cellules alvéolaires isolés du lait des vaches naturellement infectées (Craven et Anderson, 1984 ; Hébert *et al.*, 2000), puis dans des cellules épithéliales et des neutrophiles issus de glande mammaire de souris à la suite d'une infection expérimentale (Anderson et Chandler, 1975; Brouillette *et al.*, 2003), et enfin dans les ostéoblastes (Hudson *et al.*, 1995 ; Reilly *et al.*, 2000). Certaines souches de *S. aureus* présentent des caractères particuliers notamment une capacité de croissance lente *in vitro* avec la production de petites colonies, une diminution de la production de la toxine α , une résistance à la gentamicine et une capacité de survie intracellulaire (Atalla *et al.*, 2008). Ces souches sont appelées *Small Colony Variants (SCVs)*. Ces propriétés permettraient à ces souches de persister dans le phagocyte, être moins sensibles à l'action des antibiotiques conduisant ainsi à la persistance de l'infection (Vesga *et al.*, 1996).

Tableau 2: Aperçu sur quelques facteurs de virulence de *S. aureus*.

Facteurs de virulence	Gène	Rôle dans la pathogénie
Facteurs d'adhésion		
Clumping factor protein	<i>clf</i>	Liaison au Fibrinogène
Fibronectin binding protein A	<i>fnb</i>	Liaison à la fibronectine
Elastin Binding protein	<i>ebpS</i>	Liaison à l'élastine
Collagen binding protein	<i>cna</i>	Liaison au collagène
Protein A	<i>spa</i>	Inactivation des immunoglobulines
Bone sialoprotein-binding protein	<i>sdr</i>	Liaison aux ostéoblastes
Composants de surface		
Intercellular adhesion protein A	<i>ica</i>	Formation du biofilm
Biofilm associated protein	<i>bap</i>	Formation du biofilm
Capsular polysaccharide biosynthesis proteins	<i>cap5H</i> <i>cap8H</i>	Protection contre la phagocytose
Hémolysines et Cytotoxines		
Alpha hemolysin precursor	<i>hla</i>	Formation de pores sur les leucocytes
Beta hemolysin precursor	<i>hlb</i>	Formation de pores sur les leucocytes
Delta hemolysin precursor	<i>hld</i>	Formation de pores sur les leucocytes
Cytotoxines		
Leukotoxin chain	<i>luk</i>	Formation de pores sur les leucocytes
Panton Valentine leukocidin	<i>plv</i>	Formation de pores sur les leucocytes
Entérotoxines	<i>sea, seb,</i> <i>sec, sed,</i> <i>seg, seh</i>	Activation des lymphocytes T

2.4.2. Les outils épidémiologiques pour l'étude de *S. aureus*

Le typage des souches bactériennes est très important dans les enquêtes épidémiologiques dans le but de déterminer les principales sources d'infection, les voies de transmission et aussi de comparer les caractères particuliers de virulence dévolus à certaines souches. Plusieurs méthodes sont utilisées pour la caractérisation, notamment des méthodes phénotypiques (biotypie, sérotypie, lysotypie) et des méthodes génotypiques (MLST, PFGE).

2.4.2.1. Les outils phénotypiques

Dans le biotypage, les souches de *S. aureus* sont différenciées au moyen des caractères observés à la culture, et aussi à diverses propriétés biochimiques. Par exemple, Devriese (1984) a proposé une technique qui distingue les souches de *S. aureus* en plusieurs biotypes sur la base de l'étude de quatre caractères phénotypiques : la production de la staphylokinase, la visualisation du caractère β -hémolytique, la capacité de coaguler le plasma bovin et la croissance sur gélose au cristal violet. Le désavantage de cette méthode réside dans la discordance des résultats liée aux conditions des tests et aussi dans des problèmes d'interprétation du test sur la gélose au cristal violet (Hennekinne *et al.*, 2003).

Le sérotypage est une technique de plus en plus utilisée dans la caractérisation des souches de *S. aureus* isolés de cas de mammites bovines, particulièrement le sérotypage des antigènes capsulaires. Ainsi, les sérotypes capsulaires CP5 et CP8 sont exprimés par environ 80% des souches responsables de mammites bovines (Poutrel et Caffin., 1988). Cependant, il y a aussi une prédominance du sérotype capsulaire selon les zones géographiques (Salasia *et al.*, 2004).

Durant des années, la lysotypie a été la technique de choix pour la caractérisation des souches de *S. aureus*. C'est une méthode qui consiste à déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne à une gamme de bactériophages. Fox *et al.*, (1991) ont utilisé cette méthode pour comparer 257 isolats de souches de *S. aureus* provenant de 40 troupeaux, à partir de 23 phages ; seules 10 souches n'étaient pas typables. Cependant, la lysotypie est aujourd'hui considérée comme une méthode peu reproductible qui ne permet pas le typage de toutes les souches (Bannerman *et al.*, 1995).

2.4.2.2. Les outils génétiques

La méthode dite du « Multi-Locus Sequence Typing » (MLST) transpose la technique de l'analyse des iso-enzymes au niveau du génotype par comparaison des séquences codant pour les enzymes métaboliques, afin de mesurer la distance génétique multi-locus (Enright et Spratt, 1999 ; Maiden *et al.*, 1998). Chez *S. aureus*, cette technique consiste à séquencer sept gènes conservés dit « gènes de ménage ». Ainsi, chaque séquence constitue un allèle distinct désigné par un numéro arbitraire et la combinaison des sept chiffres constitue le « Sequence Type » (ST). Cette technique a connu plusieurs applications, notamment pour étudier la spécificité d'hôte des souches de *S. aureus* (Herron-Olson *et al.*, 2007) ou la clonalité des souches isolées de cas de mammites bovines (Rabello *et al.*, 2007). Cette méthode présente l'avantage d'être reproductible et les données accessibles à partir d'une base de données sur internet.

La « Pulsed Field Gel Electrophoresis » (PFGE) est une méthode qui consiste à couper l'ADN génomique extrait dans une matrice d'agarose par une enzyme de restriction possédant un faible nombre de sites de coupure. Les fragments d'ADN obtenus sont par la suite séparés par électrophorèse en champs pulsé. La PFGE a connu beaucoup d'applications dans l'étude des souches de *S. aureus* responsables de mammites. Ainsi, elle a été utilisée pour étudier la persistance à long terme de clones de *S. aureus* dans les troupeaux laitiers ainsi que les relations génétiques de souches exprimant ou portant des déterminants spécifiques de virulence. Elle a également l'avantage d'être beaucoup moins chère par rapport à la méthode MLST.

2.4.3. La prévention et la lutte contre les mammites à *S. aureus*

Les mammites bactériennes sont des infections avec de fortes répercussions d'ordre économique, sanitaire et, aussi, hygiénique au niveau des élevages spécialisés dans la production du lait. Les mammites bactériennes, particulièrement celles causées par *S. aureus*, peuvent en effet évoluer sous forme gangréneuse et mettre en péril la vie de l'animal, ou se développer de manière insidieuse avec une évolution chronique favorisant ainsi l'entretien de l'infection au sein de l'élevage. Ce passage à chronicité a pour conséquence la mise en route de traitements, la réduction de la production, la réforme des vaches incurables et, aussi, des pénalités sur le prix de vente du lait (en Europe), qui sont autant des frais à supporter par l'éleveur, réduisant ainsi les marges bénéficiaires. L'importance du traitement et de la

prévention des mammites à *S. aureus* est aussi hygiénique, car le lait contaminé peut être un vecteur dans la transmission à l'homme des souches capables d'entraîner des toxi-infections alimentaires. La prévention et le traitement des mammites ont, donc, de fortes implications dans ces élevages.

2.4.3.1. La prophylaxie

La prophylaxie contre les mammites est antiseptique, nutritionnelle, génétique et/ou vaccinale.

Les principales mesures de prophylaxie antiseptique visent à éliminer ou limiter les sources de *S. aureus* dans l'élevage et d'agir sur le mécanisme de sa transmission. La source majeure de *S. aureus* demeure le quartier infecté, et la transmission se faisant essentiellement à l'occasion de traite d'un quartier à un autre et/ou d'une vache à une autre. Les vaches atteintes d'infections chroniques et/ou de mammites subcliniques, sont alors des sources de dissémination de la bactérie au sein de l'élevage. Il est, donc, indispensable de procéder au dépistage précoce des vaches atteintes de mammites subcliniques et d'envisager la réforme de celles qui présentent des infections chroniques. A la fin de la lactation, c'est-à-dire au tarissement, une antibiothérapie permet également de prévenir de nouvelles infections au moment du vêlage (Bradley, 2002). Le traitement au tarissement est abordé dans la section suivante. Ces mesures doivent également être associées à une bonne pratique d'hygiène au moment de la traite. Dans le cas des élevages qui pratiquent la traite manuelle, les mesures d'hygiène impliquent le lavage et la désinfection des mains, du trayeur, du pis et des trayons avant et après la traite.

Nagahata *et al.* (2000) ont proposé un programme de contrôle de mammites articulé autour de cinq points d'intervention pour la maîtrise des infections particulièrement causées par *S. aureus* :

- Etablissement d'un ordre de traite;
- Usage de gants en plastique à usage unique pour les travailleurs et de lavettes individuelles pour laver chaque trayon;
- Trempage des trayons dans une solution désinfectante;
- Traitement des quartiers atteints par des antibiotiques au tarissement;
- Abattage des vaches infectées dans plus de deux quartiers et/ou atteintes d'infection chronique.

L'apport de certains nutriments dans l'alimentation de la vache laitière permet aussi à la mamelle de prévenir efficacement des infections bactériennes. Ainsi, beaucoup d'études se sont penchées sur la relation entre la présence de ces nutriments et le risque d'apparition des mammites. L'une des approches les plus documentées est celle qui fait intervenir la supplémentation des animaux avec le sélénium et la vitamine E chez la vache laitière. Cependant, d'autres nutriments, notamment le zinc, le cuivre, la vitamine A et les bêta-carotènes interviennent également dans la résistance de la mamelle contre les infections bactériennes. Smith *et al.* (1984) ont étudié les effets de la vitamine E et du sélénium sur les mammites bovines. Ces auteurs constatent que l'incidence de mammites cliniques au vêlage était diminuée chez les vaches supplémentées en vitamine E pendant le tarissement, alors que la supplémentation en Se avant le vêlage diminuait la durée des signes cliniques. L'association vitamine E / sélénium montre une synergie permettant la diminution de l'incidence et de la gravité des mammites dans un élevage. La vitamine E et les bêta-carotènes sont également des éléments nutritifs importants dans le maintien de l'intégrité des cellules épithéliales (Sordillo *et al.*, 1997). Les études menées par Chew *et al.* (1982) ont montré que les vaches avec des scores de CMT élevés avaient significativement de plus faibles concentrations de vitamine A et de bêta-carotène dans leur plasma, contrairement aux vaches qui ont un score négatif.

Le cuivre facilite l'absorption et le transport du fer et intervient aussi dans la protection des cellules contre les métabolites libérés lors de la phagocytose (NRC, 2001). Par ces deux fonctions, il est supposé que le cuivre joue un rôle important dans le cadre de la protection contre les infections bactériennes de la mamelle. L'interaction entre le zinc et les cellules immunitaires indiquent que ce dernier pourrait aussi contribuer à mieux combattre l'installation de l'infection bactérienne (Sordillo *et al.*, 1997). Une zincémie faible est associée à un amincissement de la couche cornée papillaire et à un accroissement de l'infiltration leucocytaire du parenchyme mammaire, par conséquent à une augmentation du nombre de cellules somatiques dans le lait (Davidov *et al.*, 2013).

Par ailleurs la génétique a aussi été utilisée pour la sélection des races laitières plus résistantes aux infections mammaires. Cette sélection repose sur l'enregistrement des comptages cellulaires somatiques (CCS) individuels qui est un critère performant par son héritabilité (proche de 0,15) et sa forte corrélation génétique (proche de 0,85) avec l'objectif de sélection associant mammites cliniques et sub-cliniques (Rupp et Boichard, 2001 ; Bonaiti *et al.*, 2005).

Cependant, une sélection des animaux avec des numérations cellulaires individuelles à des valeurs très faibles risque, pour certains auteurs, d'aboutir à la sélection d'animaux dont les défenses immunitaires seraient amoindries et, par conséquent, plus vulnérables aux infections (Coffey *et al.*, 1986 ; Kehrl et Schuster 1994 ; Schukken *et al* 1994).

La prévention des mammites peut également faire appel à l'utilisation de vaccins dont les objectifs visent à prévenir de nouvelles infections, à réduire leur gravité et ainsi à réduire le nombre de cellules somatiques dans le lait, ce qui permettrait de limiter l'usage des antibiotiques. Selon Middleton (2008), la vaccination contre les mammites vise deux objectifs spécifiques : la réduction des taux cellulaires des vaches infectées et la prévention de nouveaux cas de mammites au sein de l'élevage. Cependant, la vaccination, notamment contre les mammites à *S. aureus*, se heurte à plusieurs difficultés majeures qui retardent la mise au point de vaccins pleinement efficaces (Wallemacq *et al.*, 2010), ceci étant probablement lié à la capacité de survie intracellulaire de cette bactérie lui conférant ainsi les moyens d'échapper à l'action du système immunitaire. En effet, les vaccins utilisés visent à l'obtention d'une réponse immune humorale dirigée contre un antigène spécifique de *S. aureus*. Cependant, la prise en compte de l'induction d'une réponse immune cellulaire impliquant notamment une réponse cytotoxique dirigée contre les cellules infectées par *S. aureus* est un des axes à suivre en perspective d'une mise au point de vaccin efficace (Wallemacq *et al.*, 2010).

2.4.3.2. Le traitement

La stratégie du traitement des mammites par l'administration d'antibiotiques consiste à traiter les mammites qui apparaissent au cours de la lactation et à établir un traitement systématique des vaches pendant le tarissement et, enfin, à procéder à la réforme des vaches ayant des infections chroniques.

La mise en place d'un traitement précoce lors de mammites s'avère efficace durant la lactation, bien que cette efficacité chez les vaches avec des infections chroniques soit très limitée. De plus, une antibiothérapie à long terme lors de mammites chroniques est, en partie, responsable de l'émergence de souches résistantes. Parmi les antibiotiques les plus fréquemment utilisés pour le traitement des mammites on peut citer les bêta-lactamines, les macrolides, les aminoglycosides et les tétracyclines (Sawant., 2005). Contre ces antibiotiques, *S. aureus* utilise

principalement quatre mécanismes de résistance : l'inactivation enzymatique, la modification ou le remplacement de la cible, la protection de la cible et l'efflux actif.

L'inactivation enzymatique résulte de la modification du noyau actif de l'antibiotique par clivage ou addition d'un groupement chimique empêchant par la même occasion la fixation de l'antibiotique à la cible entraînant ainsi une perte de l'activité antimicrobienne. Par exemple, l'enzyme pénicillinase codée par le gène *blaZ* entraîne une résistance à la pénicilline G, aux pénicillines A (ampicilline, amoxicilline, etc.), aux carboxypénicillines (ticarcilline) et aux uréidopénicillines (pipéracilline) (Quincampoix et Mainardi, 2001) et les enzymes « aminoside N-acétyltransférases » (AAC), « aminoside O-phosphotransférases » (APH) et « aminoside O-nucléotidyltransférases » (ANT) définissent chacune un phénotype particulier de résistance aux aminoglycosides (Bismuth, 2006). La cible de l'antibiotique peut aussi être modifiée ou remplacée pour éviter que l'antibiotique ne s'y lie et ne puisse exercer son activité. C'est l'exemple de la production d'une nouvelle « protéine de liaison à la pénicilline » (PLP2a) qui entraîne une résistance à toutes les bêta-lactamines et dont les gènes *mecA* et *mecC* sont les supports génétiques (Quincampoix et Mainardi, 2001 ; Becker *et al.*, 2014). Un autre mécanisme de modification est la méthylation de la cible à hauteur du ribosome (sous-unité 50S), qui réduit ainsi l'affinité des macrolides (Leclercq, 2006). La protection du ribosome, cible des tétracyclines, est due aux gènes *tet(O)*, *tet(M)* et *tet(W)* qui codent pour des protéines cytoplasmiques qui entraînent le relargage de l'antibiotique fixé et rendent ainsi au ribosome sa conformation originelle (Poyart, 2006). L'efflux actif est un mécanisme par lequel les bactéries vont relarguer l'antibiotique à l'extérieur de la cellule bactérienne grâce aux pompes à efflux, telles que les pompes ABC transporteur (ATP Binding Cassette Superfamily) qui confèrent une résistance aux macrolides et les pompes MFS (Major Facilitator Superfamily) qui confèrent une résistance aux tétracyclines.

L'objectif de l'administration d'antibiotiques durant la période du tarissement est d'avoir moins de quartiers infectés au vêlage. Elle permet non seulement d'éliminer les infections existantes, mais aussi de prévenir les nouvelles infections (Neave *et al.*, 1966). Le traitement au tarissement a ainsi un effet positif sur la réduction de l'incidence des mammites (Bradley, 2002). Cependant, des préoccupations majeures se posent de plus en plus quand à l'application systématique de l'administration d'antibiotiques au tarissement. Ainsi, certains pays ont adopté une politique de thérapie sélective des vaches taries (Browning *et al.*, 1990, Browning *et al.*,

1994; Osterås *et al.*, 1999). Pour Whist *et al.* (2006), cette thérapie sélective doit non seulement être simple et bon marché, mais aussi optimiser efficacement le traitement des quartiers infectés, tout en minimisant le traitement des quartiers en bonne santé. D'ailleurs, une recommandation de l'OMS appelle vivement à l'interdiction des traitements antibiotiques au tarissement des vaches dans le cadre de la politique de réduction de l'utilisation des antibiotiques en agriculture (WHO, 1998).

L'alternative de la réforme des vaches atteintes de mammites chroniques est une méthode onéreuse pour l'éleveur, mais nécessaire dans un plan stratégique de lutte contre les mammites à *S. aureus*. La réforme s'adresse principalement aux vaches atteintes de mammites chroniques incurables, malgré plusieurs traitements antibiotiques en lactation et celles ayant des CCI > 800000 cellules/ml au cours de deux lactations successives en dépit de traitement au tarissement (Serieys, 1991 ; Bouaziz, 2005).

Le traitement des mammites dues aux levures concerne les espèces *Candida albicans*, *C. crusei*, *C. kefir* et *C. rugosa*. Ces levures sont sensibles *in vitro* aux anti-mycosiques, mais *in vivo*, aucune préparation n'a démontré scientifiquement une efficacité (Théron *et al.*, 2010). Cependant, certains auteurs rapportent l'utilisation de certaines molécules dans le traitement comme la nystatine (5 000 U/ml ; 125 000 U/mamelle/j pendant 4 jours), la natamycine (2,5% ; 500 mg/ quartier/j, 3 jours), du miconazole (100 mg/j pendant 3jours) et du clotrimazole (100 à 200mg/j pendant 3 jours) (Kadic , 1978 ; Weigt , 1984 ; Théron *et al.*, 2010).

Deux espèces d'algues sont impliquées dans les mammites, *Prototheca zoopfi* et *P. wickerhamii*. Des expériences *in vitro* ont démontré une sensibilité de ces germes aux aminoglycosides et aux polyènes (Bergmann, 1993 ; Marques *et al.* 2006 ; Jagielski et Lagneau, 2007), mais aucune efficacité n'a été obtenue *in vivo*, probablement en relation avec la localisation particulière de ces germes pathogènes (Théron *et al.*, 2010). En effet ces algues sont capables d'envahir les tissus conjonctifs et les nœuds lymphatiques, ce qui les rend responsables d'infections chroniques. De plus, les lésions provoquées sont irréversibles et la production laitière demeure faible même après la disparation de l'agent pathogène (Costa *et al.*, 1996). Par conséquent, la réforme des animaux atteints constitue, à l'heure actuelle, la seule mesure économiquement envisageable (Théron *et al.*, 2010).

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Les mammites représentent une entrave à la production au niveau des élevages spécialisés dans la production laitière. Les pratiques d'élevages au Niger favorisent malheureusement l'entretien et la persistance des bactéries responsables des mammites dans les élevages. Au Niger, très peu d'études ont été menées sur les mammites et les rares études faites se limitent à l'identification des agents étiologiques dans les zones urbaines et périurbaines de Niamey.

L'objectif général visé dans ce travail est de faire l'inventaire des principales bactéries impliquées dans les mammites au niveau du plus grand Centre de Multiplication de Bétail au Niger (station sahéenne expérimentale de Toukounous) et de procéder à la caractérisation des bactéries prédominantes, afin de proposer une stratégie efficace de prévention et de contrôle.

Les objectifs spécifiques assignés à cette étude sont :

1. Etudier la prévalence des mammites cliniques et subcliniques au niveau de la station sahéenne expérimentale de Toukounous
2. Identifier les principales bactéries responsables des mammites
3. Faire une caractérisation phénotypique et génotypique des souches de *S. aureus*
4. Et, enfin, évaluer l'impact de l'application des mesures d'hygiène sur la prévalence des mammites

RESULTATS

Partie 1: Bactériologie

1.1. Préambule

Cette première partie du travail est divisée en trois études dont les objectifs étaient : (i) de connaître la prévalence des mammites au niveau de la Station Sahélienne Expérimentale de Toukounous (SSET) ; (ii) d'identifier les agents étiologiques bactériens ; et (iii) de comparer les souches de *Staphylococcus aureus*.

C'est ainsi que toutes les vaches en lactation des trois troupeaux à savoir les primipares, les élites et les non-élites ont été testées au « Californian Mastitis Test » (CMT). Les résultats de cette première étude ont démontré une prévalence élevée des vaches avec des CMT positifs, bien qu'aucune mammite clinique n'ait été diagnostiquée au cours de nos travaux. Et comme le lait de chaque vache positive au CMT a été prélevé, nous avons pu par la suite procéder à l'analyse bactériologique des échantillons. Les différents échantillons de lait ont été analysés au niveau du laboratoire de l'Ecole Nationale de Santé Publique de Niamey (ENSP) au Niger. Après isolement et pré-identification, les différentes souches bactériennes ont été conservées, puis acheminées au laboratoire de bactériologie de la Faculté de Médecine vétérinaire de Liège après avoir obtenu un permis d'importation délivré par l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA). En Belgique, les différentes souches bactériennes ont été reprises en culture pour confirmer et/ou infirmer les résultats obtenus précédemment au Niger.

Les résultats obtenus démontrent qu'il y a une diversité des agents bactériens impliqués dans l'étiologie de la mammite au niveau de la SSET. Toutefois, *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus fréquente, ce qui conforte des résultats obtenus lors de deux études précédentes réalisées dans les élevages laitiers urbains et périurbains de Niamey (Niger) selon lesquels *S. aureus* est le germe mammopathogène prédominant (Bada *et al.*, 2005 ; Harouna *et al.*, 2009). De plus, cette espèce bactérienne est connue sur le plan mondial comme un agent pathogène majeur de la glande mammaire, capable de provoquer autant des mammites cliniques aiguës que des mammites subcliniques tendant à devenir chroniques. Du fait de leur évolution insidieuse, c'est-à-dire sans signe clinique annonciateur, les mammites subcliniques

tiennent toute leur importance dans le cas du Niger où le diagnostic n'est pas systématique sur les vaches en lactation caractérisée par un faible niveau de production.

C'est ainsi que, partant des résultats précédemment obtenus, les investigations dans les deux études suivantes de nos travaux ont porté particulièrement sur *S. aureus* : il s'agit notamment de leur caractérisation phénotypique et génotypique. Ainsi, ces deux études ont concerné des aspects largement abordés dans beaucoup de publications de par le monde, mais qui restent inédits dans le cas du Niger. Dans ces deux études, les investigations ont porté sur la recherche des gènes et des propriétés potentiels de virulence, sur la détermination de leurs profils de sensibilité/résistance aux antibiotiques et sur l'étude de la clonalité des souches de *S. aureus*.

Il faut noter enfin, que dans la deuxième étude intitulée « *Antibiotic resistance trends of Staphylococcus aureus isolated between 2010 and 2012 from mastitis cases in Azawak zebu in Niger* », un erratum a été ajouté à la fin de l'article.

1.2. Article 1 : Bacterial mastitis in the Azawak zebu breed at the Sahelian experimental station in Toukounous (Niger): Identification and typing of *Staphylococcus aureus*.

Abdoulkarim Issa Ibrahim^{a,b,*}, Rianatou Bada-Alambedji^b, Jean-Noël Duprez^a, Mamane Djika^c, Nassim Moula^d, Isabelle Ote^a, Marjorie Bardiau^a, Jacques G. Mainil^a

^aBactériologie, Département des Maladies infectieuses, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Sart Tilman, Bât 43a, B-4000 Liège, Belgium

^bEcole Inter-Etat des Sciences et Médecine Vétérinaires - Service de Microbiologie, Immunologie et Pathologie infectieuse, BP 5077, Dakar, Sénégal

^cEcole Nationale de Santé Publique de Niamey, BP 290, Niamey, Niger

^dBiostatistique, Bioinformatique, Economie, Sélection animale, Département des Productions animales, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Sart-Tilman, Bât 43a, B-4000 Liège, Belgium

*Corresponding Author : Abdoulkarim Issa Ibrahim

Publié dans International Research Journal of Microbiology, 4 (7): 168-178, 2013



Full Length Research Paper

Bacterial mastitis in the Azawak zebu breed at the Sahelian experimental station in Toukounous (Niger): Identification and typing of *Staphylococcus aureus*

Abdoulkarim Issa Ibrahim^{a,b,*}, Rianatou Bada-Alambédji^b, Jean-Noël Duprez^a, Mamane DJika^c, Nassim Moula^d, Isabelle Ote^a, Marjorie Bardiau^a, Jacques G. Mainil^a

^aBactériologie, Département des Maladies infectieuses, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Sart-Tilman, Bât 43a, B-4000 Liège, Belgium

^bEcole Inter-Etat des Sciences et Médecine Vétérinaires - Service de Microbiologie, Immunologie et Pathologie infectieuse, BP 5077, Dakar, Senegal

^cEcole Nationale de Santé Publique de Niamey, BP 290, Niamey, Niger

^dBioinformatique, Economie, Sélection animale, Département des Productions animales, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Sart-Tilman, Bât 43a, B-4000 Liège, Belgium

*Corresponding Author E-mail address: karimlebelge@yahoo.fr; Tel.: +3243664052; a+22796573021; Fax: +3243664261; +221338244283

Abstract

Though the government of Niger opted in 1975 for a policy of improving the dairy capability of the Azawak zebu cows, the national level of dairy production satisfies only 50% of population needs. Several reasons may explain this shortage, including the prevalence of mastitis. The purpose of this research was (i) to study the prevalence of mastitis at the Sahelian experimental station in Toukounous; (ii) to identify the bacterial species responsible; and (iii) to type the *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* isolates. Two hundred and sixty-five cows were tested using the California Mastitis Test (CMT) and the 112 CMT-positive milk samples (10.6%) from 104 cows (39.2%) were further tested for bacterial growth. Fifty-one of them (45.5%) gave a positive growth: half of the isolated bacteria belonged to the genus *Staphylococcus* and 23 (41.8%), to the species *S. aureus*. The majority of the *S. aureus* isolates belonged to the bovine biotype, formed biofilms, produced Small Colony Variants, grouped into closely related virulotypes, and belonged to two closely related pulsotypes. In conclusion, (i) the prevalence of presumptive mastitis in Toukounous is 40%; (ii) the genus *Staphylococcus* is the most frequent; and (iii) the 23 *S. aureus* isolates are closely related, though not clonal.

Keywords: Niger, Azawak zebu, mastitis, *Staphylococcus aureus*, virulotyping.

INTRODUCTION

In Niger, zebu cattle of the Azawak breed offer the best dairy aptitude with a level of production that varies between 800 and 3000 kg of milk for a lactation period of between 270 and 300 days. Moreover, since 1975, the Niger government has opted for a policy of developing the breeding of the Azawak zebu and of improving its dairy capability (MRA, 2002). Various pilot farms have been set up, such as the Sahelian experimental station in Toukounous (Figure 1), with the objective of carrying out the genetic selection of the Azawak zebu breed and of

distributing these cows to individual farmers across the country.

However, despite the existence of such experimental farms and of almost 3.5 million heads of Azawak zebu cows in 2000, national dairy production in Niger satisfies only 50% of population needs (REPOL, 2001; Vias et al., 2005). Several reasons may explain this shortage, including the genetic background of the Azawak zebu compared to European and American dairy cattle breeds and the infection rates of the mammary gland.

Infection of the mammary gland by microorganisms, generally bacteria, causes inflammation and mastitis. Clinical mastitis is characterized by macroscopic modification of the milk, whereas only high cell counts with no macroscopic change are observed during sub-clinical mastitis. Mastitis can also be subdivided as either contagious or environmental, according to the identity of the bacterial species: contagious mastitis may be caused by bacterial species such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coagulase-negative staphylococci, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma bovis*, and environmental mastitis by *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* (Radostis et al., 2007; Quinn et al., 2011).

Mastitis prevalence and mastitis-associated bacterial species can nevertheless vary from country to country and also between farms, mainly as the consequence of differences in livestock management and milking process hygiene (Olde et al., 2008). In Niger, the prevalence of mastitis in the urban and peri-urban livestock of Niamey and of Hamdallaye (Figure 1) is 44% and 42% respectively, and *S. aureus* is the most frequently identified bacterial species (Bada-Alamedji et al., 2005; Harouna et al., 2009). But no survey has ever been performed at the pilot farms, such as the one in Toukounous.

Therefore, the purpose of this study was (i) to estimate the prevalence of mastitis in Azawak zebu cows at the Sahelian experimental station in Toukounous; (ii) to identify the bacterial species responsible; and (iii) to type the *Staphylococcus (S.) aureus* isolates phenotypically and genetically.

MATERIALS AND METHODS

The station in Toukounous

The Sahelian experimental station in Toukounous was created in 1936 by the colonial countries in order to produce meat for exportation to Europe. It was transformed in 1975 by the Niger government into a pilot farm to improve the dairy production of the Azawak zebu breed and to promote its distribution across the whole country (MRA, 2002). The Toukounous station is located 220 km North East of Niamey (Figure 1) and covers a surface area of 4474 hectares divided into several parcels allowing a rational use of pastures (Saidou et al., 2010). The climate is of the Sahelian type, characterized by a rainy season from June to October, with an average of 300 mm of rain per year, and a dry season from November to May.

At the Toukounous station, Azawak zebu cows are divided into three herds according to their level of milk production and age: "elite" cows (>1400 kg milk/lactation), "non-elite" cows (<1400 kg milk/lactation), and "primiparous" cows. Feeding is based on pasture

grazing, which is complemented by the distribution of cottonseed during the dry season. The animals drink water *ad libitum* during the course of the day. The milking process is performed manually twice daily with no general or specific disinfection procedure.

Bacterial milk analyses

Milk samples were collected during the rainy season (September 2009) from the four quarters of 265 lactating cows (120 elite, 74 non-elite, and 71 primiparous) and were submitted to the Californian Mastitis Test (CMT): a quarter was considered positive when the score was (++) or (+++), negative when the score was (-), and doubtful when the score was (+). Only CMT-positive quarters were sampled a second time for bacteriological analysis. Milk samples were stored at -20 °C in 10% (v/v) glycerol until further use.

Bacteriological analysis was performed at the Laboratory of Bacteriology in the National Public Health School of Niamey. After thawing, a loopful of each milk sample was inoculated onto Columbia base agar plates supplemented with 5% sheep blood (BioMérieux, France). Plates were incubated at 37 °C for 24 h to 48 h. Bacterial species were pre-identified on the basis of colony shape, presence of haemolysis, Gram staining, bacterial cell shape, and catalase and peroxidase production.

Pre-identified colonies were further identified at the Laboratory of Bacteriology in the Veterinary Faculty of the University of Liège (import permit n° CONT/IEC/FRT/376095). First, the colonies were grown on Columbia blood agar plates and on different selective agar plates: Mannitol salt phenol red agar (Merck, Germany) for staphylococci, Edwards medium modified (Oxoid, England) for streptococci, D-Coccosel agar (BioMérieux, France) for enterococci, and Gassner agar (Merck, Germany) for enterobacteria. Final identification was performed using appropriate API tests (BioMérieux, France), except for bacilli, which were identified as described by Reva and collaborators (Reva et al., 2001). All *Staphylococcus (S.) aureus* isolates were further identified and typed phenotypically and genetically.

S. aureus phenotyping

S. aureus isolates were classified into bovine, human, or poultry biotypes according to the results of the following tests (Devriese, 1984): the production of staphylokinase and of β-haemolysis on Columbia blood agar, the coagulation of bovine plasma and growth on Trypticase Soy Agar plates (Merck, Germany) supplemented with 6 µg/ml crystal violet (Acros Organics, Belgium).

Biofilm production was assayed in microtitre plates using the safranin staining method (Stepanovic et al.,

Table 1. Prevalence of California Mastitis Test (CMT)-positive cows and samples according to herd

Herd	No. of tested cows	No. of positive cows (%)	No. of positive samples (%)
Elite	120	51 (42.5)	55 (11.5)
Non-elite	74	29 (39.1)	32 (10.8)
Primiparous	71	24 (33.8)	25 (8.8)
Total	265	104 (39.2)	112 (10.6)

Mastercycler® (Eppendorf, France) as previously described (Ote et al., 2011). All PCR products were analysed by electrophoresis in 1.5% agarose gel. Gels were then stained with ethidium bromide and photographed under UV light at 254 nm.

S. aureus pulsotyping

The whole genome of the *S. aureus* isolates were compared by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Lysostaphine pre-treated bacterial cells were embedded in 0.9% certified low-melt agarose (Bio-Rad, Belgium), lysed in a 0.5M EDTA (pH 8) buffer containing 10% N-lauroylsarcosine and 2 mg/ml lysozyme, and treated with 1 mg/ml proteinase K (Sigma-Aldrich, Germany). Genomic DNA was digested with 10U of *Sma*I (Sigma-Aldrich, Germany) according to the manufacturer's instructions. Restricted fragments were separated through a 1% pulsed-field certified agarose gel in 0.5% TBE buffer by using a CHEF MAPPER (Bio-Rad, Belgium). The electrophoresis conditions were 6.0V/cm for 21h, with pulse times ranging from 5 to 60s, an angle of 120° and a linear ramp factor. Bacteriophage lambda DNA (Bio-Rad, Belgium) was used as molecular weight marker.

S. aureus antibiotic susceptibility testing

The susceptibility of the *S. aureus* isolates to antibiotics was determined by the disc diffusion method on Mueller-Hinton agar plates (Becton Dickinson, Belgium) as previously described (Bauer et al., 1966). The interpretation of susceptibility was based on the recommendations of the French Committee Guidelines for susceptibility testing (Soussy, 2010). Isolates were tested for tetracycline (30 UI), penicillin (10 UI), gentamicin (10 UI), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 µg / 23.75 µg), enrofloxacin (5 µg), clindamycin (2 UI), and oxacillin (5 µg) (Becton Dickinson, Benelux).

Statistical analysis

All data and information were registered and checked

using Microsoft Excel 2003. The data were analysed statistically and compared, in 2 x 2 and 2 x 3 contingency tables, using the χ^2 test and the Fisher's Exact Test, when the χ^2 test was not relevant (*P*-value > 0.05), using SAS Software 9.1 (SAS, 2001).

RESULTS

California Mastitis Test (CMT)

Though no clinical mastitis was observed during the study, 112 milk samples from 104 cows tested positive on the CMT: 63 (++) , 40 (+++) and 9 (++++) scores. Ninety-six cows had one positive quarter and eight cows two positive quarters. The prevalence of CMT-positive cows and quarters was higher (*P*<0.05) in the herds of elite and non-elite cows than in the herd of primiparous cows (Table 1).

Identification of bacterial species

Of the 112 CMT-positive milk samples, 51 (45.5%) gave a positive bacterial culture: 7 samples with a (++++) CMT score (7/9: 77.8%), 16 samples with a (+++) CMT score (16/40: 40.0%) and 28 samples with a (++) CMT score (28/63: 44.4%). The difference in isolation rates according to the CMT score was not significant. In four samples, two bacteria were isolated. Half of the 55 identified isolates belonged to the genus *Staphylococcus* (50.9%), in particular to the species *S. aureus* (41.8%) (Table 2). Other identified species belonged to the family *Enterobacteriaceae* (25.5%) and to the genera *Enterococcus* (12.7%), *Bacillus* (9.1%), and *Acinetobacter* (1.8%) (Table 2). The majority of *Staphylococcus* species were isolated from elite and non-elite cows, while the majority of *Enterobacteriaceae* and *Enterococcus* species were isolated from the primiparous cows; these differences were significant (*P*< 0.001).

S. aureus was isolated from 5 samples with a (++++) score on the CMT and 9 samples with a (+++) or a (++) score, while the majority of the *Enterobacteriaceae* were isolated from samples with a (+++) or a (++) score (Table 3). Nevertheless these differences were not significant.

a

Table 2. Distribution of the identified bacterial species according to herd

Species identified	No. of isolates (%)	Herd		
		Primiparous	Elite	Non-elite
Genus <i>Staphylococcus</i>	26 (50.9)			
<i>Staphylococcus aureus</i>	23 (41.8)	2	14	7
<i>Staphylococcus sciuri</i>	2 (3.6)	0	1	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	1 (1.8)	1	0	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1 (1.8)	0	1	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 (1.8)	0	1	0
Genus <i>Enterococcus</i>	7 (12.7)			
<i>Enterococcus faecium</i>	3 (5.5)	3	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	3 (5.5)	2	1	0
<i>Enterococcus avium</i>	1 (1.8)	1	0	0
Family <i>Enterobacteriaceae</i>	14 (25.5)			
<i>Escherichia coli</i>	1 (1.8)	1	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 (5.5)	3	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (3.6)	2	0	0
<i>Enterobacter spp</i>	3 (5.5)	3	0	0
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1 (1.8)	1	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (1.8)	1	0	0
<i>Citrobacter farmeri</i>	1 (1.8)	1	0	0
<i>Citrobacter spp</i>	2 (3.6)	2	0	0
Genus <i>Acinetobacter</i>	1 (1.8)			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (1.8)	1	0	0
Genus <i>Bacillus</i>	5 (9.1)			
<i>Bacillus subtilis</i>	2 (3.6)	1	1	0
<i>Bacillus coagulans</i>	3 (5.5)	1	2	0

Table 3. Association of CMT scores with identified bacterial species

CMT scores	No. of samples	No. of positive samples (%)	Bacterial species
++++	9	7* (77.8)	<i>S. aureus</i> (5), <i>S. warneri</i> (1), <i>E. faecium</i> (1), <i>Enterobacter spp</i> (1)
+++	40	16 (40.0)	<i>S. aureus</i> (9), <i>E. faecium</i> (1), <i>E. avium</i> (1), <i>C. sakazakii</i> (1), <i>C. freundii</i> (1), <i>Citrobacter spp</i> (1), <i>B. subtilis</i> (1), <i>B. coagulans</i> (1)
++	63	28** (44.4)	<i>S. aureus</i> (9), <i>S. sciuri</i> (2), <i>S. hyicus</i> (1), <i>S. epidermidis</i> (1), <i>E. faecium</i> (1), <i>E. faecalis</i> (3), <i>E. coli</i> (1), <i>K. pneumoniae</i> (3), <i>E. cloacae</i> (2), <i>Enterobacter spp</i> (2), <i>C. farmeri</i> (1), <i>Citrobacter spp</i> (1), <i>A. baumannii</i> (1), <i>B. subtilis</i> (1), <i>B. coagulans</i> (2).

* One sample with two bacterial isolates

** Three samples with two bacterial isolates

Phenotyping of *S. aureus*

The majority of *S. aureus* isolates (18/23) belonged to the bovine biotype; two isolates belonged to the human biotype and three belonged to a non host-specific biotype. Five isolates were strong producers of biofilms, 12 were moderate producers, 6 were weak producers and no biofilm production was detected for the last

isolate. Moreover, 20 isolates produced SCVs at different levels, while the remaining three did not.

Virulotyping of *S. aureus*

All or most of the *S. aureus* isolates gave amplified fragments with most PCRs for the genes coding for

Figure 1. Map of Niger showing the locations of the Niamey and Hamdallaye areas and of the Sahelian experimental station in Toukounous



2007). Isolates from frozen stocks were grown in Trypticase Soy Broth (TSB) (Merck, Germany) and incubated at 37 °C under shaking. Overnight cultures were then diluted 1:100 in TSB containing 0.25% glucose (TSB_{glc}) and were transferred into wells of sterile 96-well flat-bottom tissue culture (TC) plates. Non-inoculated TSB_{glc} served as the negative control. The TC plates were subsequently incubated at 37 °C for 24 h. The supernatant was then discarded and the wells were carefully washed twice with sterile Phosphate Buffered Sodium (PBS). The plates were dried, stained with safranin 0.1% (w/v) for 10 min, washed twice with distilled water and dried again at 37 °C. A mixture of 50% ethanol – 50% acetic acid was added to each well and the plates were incubated at room temperature for 15 min. The quantitative classification of biofilm production was based on optical density (OD) values at 490 nm using a microplate reader (Bio-Rad, Belgium). The results were collected from at least two independent experiments in which the biofilm formation of each culture tested was evaluated in triplicate. Isolates were classified into non-producers, weak producers, moderate producers, or strong producers.

In order to study the formation of Small Colony Variants (SCVs), *S. aureus* isolates were first inoculated into Brain Heart Infusion (BHI) broth (Merck, Germany) and incubated at 37 °C overnight. The OD value of each broth culture was determined at 600 nm so that the bacterial concentration could be adjusted to a value of 10⁸ Colony Forming Unit/ml (CFU/ml). Following this, 5.10⁵ CFU/ml were transferred into BHI broth containing

1 µg/ml of gentamicin, and were incubated at 37 °C overnight on a rotary shaker (200 rpm). Each isolate was then plated on Columbia blood agar containing 1 µg/ml of gentamicin and was incubated at 37 °C for 48 h. The production of SCVs was then interpreted as previously described (Atalla et al., 2008).

S. aureus virulotyping

S. aureus isolates were therefore virulotyped by PCR for the presence of genes coding for Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) to colonize the host epithelia and extra-cellular matrix components (*clfA*, *clfB*, *fnbA*, *cna*, *ebpS* and *sdrC*) (Dinges et al., 2000), for capsular and other surface antigens conferring resistance to phagocytosis (*cap5H*, *cap8H*, *spa* and *icaA*) (Hermans et al., 2010; Vasudevan et al., 2003), for exfoliative toxins active on extra-cellular matrix components (*etA*, *etB* and *etD*) (Nishifuji et al., 2008), for haemolysins and leukocidins counteracting the cells of the host's innate immune response (*hla*, *hly*, *hld*, *hlgAC*, *lukD*, *lukM*, *lukF-PV* and *lukS-PV*) (Hermans et al., 2010), and for enterotoxins causing diarrhoea by action on the host enterocytes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* and *sen*) (Dinges et al., 2000).

DNA extraction was carried out using the ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions for staphylococci. All PCR reactions were performed with a

surface antigens: *clfA* (91%), *clfB* (100%), *fnbA* (100%), *cna* (100%), *ebpS* (100%), *sdrC* (87%), *cap5H* (83%), *spa* (96%), *icaA* (96%); and with several PCRs for the toxin-encoding genes: *etD* (74%), *hla* (96%), *hly* (100%), *hld* (96%), *hlgAC* (74%), *lukD* (96%), *lukM* (96%). Conversely, a minority of isolates tested positive with the PCRs for the following genes: *cap8H* (4%), *lukF-PV* (17%), *lukS-PV* (9%); only one isolate (4%) tested positive for 2 of the 9 enterotoxin-encoding genes (*sej* and *seg*); and none with the PCRs for the *etA* and *etB* genes. Therefore the 23 *S. aureus* isolates could be grouped into 14 virulotypes, with 7 of them (30.4%) belonging to the same virulotype and half of them (52%) to three virulotypes (Table 4). The enterotoxin-encoding gene-positive isolate was also the only one that tested positive with the PCR for the *cap8H* gene and negative with the PCRs for the *spa* and *icaA* genes.

Pulsotyping of *S. aureus*

The 23 isolates showed four distinct pulsotypes (Figure 2) which were named A (n=13), B (n=8), C (n=1) and D (n=1). Pulsotypes A and B differ by only one band. The pulsotype A was recovered from the three herds, the pulsotype B from the elite and non-elite herds, whereas the pulsotypes C and D were recovered respectively from the elites and the primiparous herds (Table 5).

Antibiotic susceptibility/resistance profiles of *S. aureus*

Clinical levels of resistance to gentamicin were detected in five isolates (22%), to tetracycline in three isolates (13%), to penicillin in three isolates (13%), and to clindamycin in one isolate (4%). Conversely, resistance was not detected to enrofloxacin, oxacillin, or trimethoprim-sulfamethoxazole (Figure 2).

DISCUSSION

The prevalence of presumptive mastitis (CMT-positive milk samples) at the Sahelian experimental station in Toukounous (39.2%) is similar to, though lower than, the observations reported by Bada-Alamedji and collaborators also using the CMT test (Bada-Alamedji et al., 2005) and by Harouna and collaborators with reference to somatic cell counts (Harouna et al., 2008), in urban and peri-urban farms in Niger during the rainy season (44% and 52%, respectively). Although not directly relevant to this study, it is essential to take into account the fact that the season can influence CMT test results in Niger, with a prevalence as low as 27% being reported during the dry season (Harouna et al., 2008).

Of the different bacterial species that can be involved

in bovine mastitis, several are isolated from Azawak zebu dairy cows with the highest isolation rate being for staphylococci (50.9%), but an absence of streptococci (Table 2). Since *Streptococcus* represents one of the genera known to be the most likely cause of clinical mastitis (Bradley, 2002), the absence of these bacteria in our results supports the observation that clinical mastitis is not present in Toukounous. Although a few of the bacterial species identified here (Table 2) are also known to be possible causes of clinical mastitis, most of them, including *S. aureus* and coliforms, are associated with sub-clinical mastitis, high CMT scores and elevated cell counts (Morntaz et al., 2010; Sargeant et al., 2001) (Table 3). The high prevalence of staphylococci in the present study can be partly explained by the contagious nature of these bacterial species. This is especially the case for *S. aureus* (Radostits et al., 2007), with transmission from cow to cow being favoured by the lack of basic hygiene procedures during the manual milking process, such as disinfection of the teats and of the hands of the milkers.

Surprisingly all but two *S. aureus* are isolated from elite and non-elite cows, most frequently from milk samples with a (++++) or a (+++) CMT score (Table 1). This difference between the primiparous herd and the elite and non-elite herds cannot be explained at this stage. However, this observation might be related to the fact that a different set of milkers works with the primiparous herd than with the elite and non-elite herds. An alternative explanation for the difference could be related to the age of the cows (Harouna et al., 2009): elite and non-elite cows are older than primiparous cows and are therefore more often chronically infected with contagious bacterial species such as *S. aureus*.

Phenotypic and genotypic typing of the *S. aureus* isolates was subsequently performed in order to identify their virulence profiles. The majority of the 23 *S. aureus* isolates express properties and/or possess genes (Table 4) of strains able of persisting in the mammary gland and therefore causing chronic mastitis, in agreement with the presence of only chronic mastitis in Toukounous: adherence to extra-cellular matrix components (McDonald, 1989), biofilm and SCV formation (Costerton et al., 1999; Brouillette et al., 2003; Atalla et al., 2008), production of the Spa protein and clumping factors (Matsunaga et al., 1993), of capsular antigens (O'Riordan and Lee, 2004), and of haemolysins and leukotoxins (Rainard et al., 2003; Haveri et al., 2007). Though the results of the phenotypic assays (biotypes, biofilm formation, and SCV formation), of the PCR virulotyping, of the PFGE pulsotyping and of the antibiotic resistance profiles do not support the clonality of all 23 *S. aureus* isolates, several of them are closely related, supporting (though only partly) the hypothesis of transmission from cow to cow by the milkers' hands during the milking process.

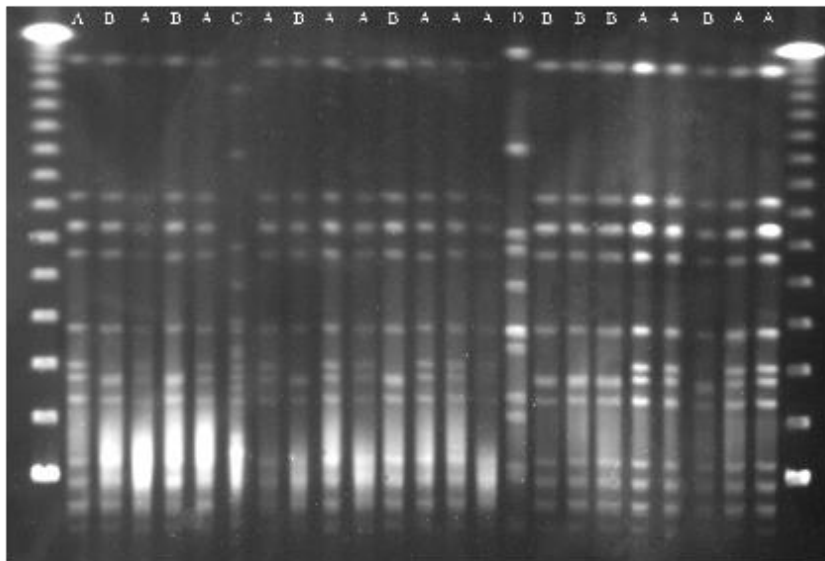
The 14 virulotypes identified (Table 4) also show

Table 4: Virulotypes of the 23 *S. aureus* isolates

	Genes																	No. of isolates		
	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>cna</i>	<i>fnbA</i>	<i>icaA</i>	<i>epbS</i>	<i>sdnC</i>	<i>spa</i>	<i>eid</i>	<i>hla</i>	<i>hnb</i>	<i>hnd</i>	<i>higAC</i>	<i>lukD</i>	<i>lukM</i>	<i>lukF-PV</i>	<i>lukS-PV</i>		<i>cap5H</i>	<i>cap6H</i>
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	7
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	3
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	1
+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	1
-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	1
-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	1
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	1
+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1*
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	1
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	1
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	1
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	1
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	1

* Isolate positive with the PCRs for the *sej* and *seg* enterotoxin-encoding genes

Figure 2. The A, B, C and D PFGE patterns of *Sma*I-digested DNA of the *S. aureus* isolates.



similarities and differences in comparison with the virulotypes identified during other surveys in different countries, emphasizing once more the great diversity of the mastitis-associated *S. aureus* isolates. For instance, the *clfA*, *clfB*, *cna*, *ebpS*, *hla*, *hly*, *lukD*, *lukM*, *spa*, and *ica* genes are widely distributed in our study. To cite only a few recently published surveys in various countries, the *clfA*, *clfB*, *ebpS*, *hla*, *hly*, *lukD*, *lukM* genes have also been detected in the vast majority (more than 95%) of isolates from bovine mastitis in Iran and Belgium (Momtaz et al., 2010; Ote et al., 2011). On the other hand, the *lukD*, *lukM* and *spa* genes are present in only a small number of isolates in Senegal (Kadja et al., 2010), the *cna* gene in one third of the isolates in Italy and Belgium (Zecconi et al., 2006; Ote et al., 2011) and the *icaA* gene in one quarter to two thirds of the isolates in Brazil and Belgium (Coelho et al., 2011; Ote et al., 2011). Conversely, none of the 23 isolates of the present study contains the *etA* and *etB* genes, in agreement with results already published in Finland, Turkey and Belgium (Haveri et al., 2007; Karahan et al., 2009; Ote et al., 2011).

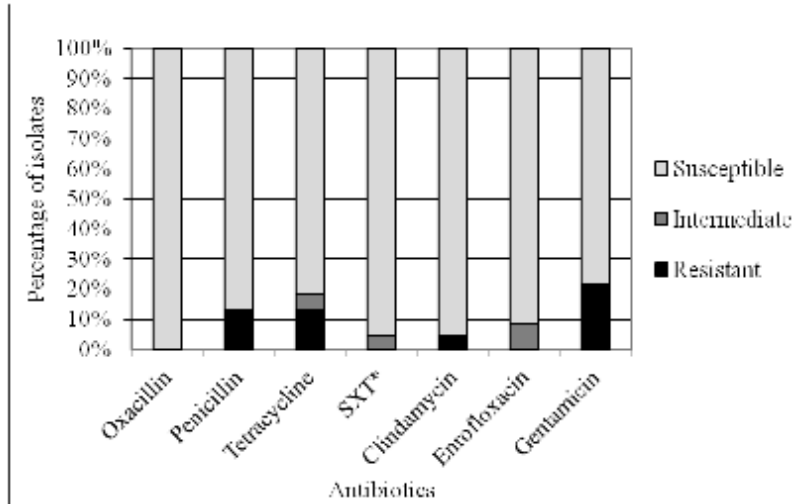
The respective prevalence of the capsular antigen-encoding *cap5H* and *cap8H* genes can also differ greatly between bovine strains of *S. aureus* depending on the geographical source (Sordelli et al., 2000). In our study, the *cap5H* gene is the more frequent (87%) and the *cap8H* gene is present in only one isolate. This result is in agreement with some other published results, showing

that more than two thirds of isolates possess the gene *cap5H* (Poutrel et al., 1988; Baselga et al., 1994; Kadja et al., 2010). However, the same result contrasts with those of Ote et al. (2011), who report that only one-third of isolates harbour the *cap5H* gene, but two-thirds, the *cap8H* gene. Such differences may be related not only to actual geographical variation in the clones of *S. aureus* causing bovine mastitis, but also to the samples of the isolates tested (numbers and/or clinical status of the cows).

Finally, in the present study, only one isolate belonging to a unique virulotype tests positive with PCR for enterotoxin-encoding genes (Table 4), i.e. the *seg* and *sei* genes, that are frequently associated since they are located on one "enterotoxin gene cluster" (*egc*) (Karahana et al., 2009). This result is comparable to those of Harouna and collaborators in Niger (Harouna et al., 2009), who report the absence of genes coding for any enterotoxin. Enterotoxin-encoding genes are actually most frequent in strains causing food toxin-infection in humans (Zschock et al., 2005). Nevertheless, these genes have also been described in some isolates from mastitis in other countries (Rosec and Gigaud, 2002; Zschock et al., 2005; Kadja et al., 2010; Ote et al., 2011) questioning their possible public health hazard.

Our results also indicate that the 23 *S. aureus* isolates show a good level of sensitivity to the seven antibiotics tested (Figure 2), since a clinical level of resistance to gentamicin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazol

Figure 3. Prevalence (%) of antibiotic resistance amongst the 23 *S. aureus* isolates



(*) sulfamethoxazole and trimethoprim

Table 5. Distribution of the pulsotypes A, B, C and D (see Figure 3) in the three herds

Pulsotypes	No. of isolates	Herds		
		Primiparous	Elite	Non-Elite
A	13/23	1	7	5
B	8/23	0	6	2
C	1/13	0	1	0
D	1/23	1	0	0

and/or oxacillin is observed in only one to five isolates. Similar results have been obtained during surveys in African countries (Niger, Kenya and Senegal) (Shitandi and Sternesjo, 2004; Bada-Alamedji et al., 2005; Harouna et al., 2009; Kadja et al., 2010) and in other countries (Turkey and Italy) (Güler et al., 2005; Moroni et al., 2006). However, the level of resistance to β -lactams is usually higher than in our results.

Several other bacterial species apart from *S. aureus* are also identified from the CMT-positive milk samples, and some of these have a (++) or a (+++) CMT score. These species can also be responsible for contagious mastitis (other staphylococci) or cause environmental mastitis (enterococci, enterobacteria). Due to the low number of isolates of each species, a comparison of their phenotypic and genotypic traits could not be performed. The role of the remaining species (acinetobacteria and bacilli) is more difficult to assess and one cannot rule out

the possibility that they are, in fact, contaminants of the milk samples.

Finally, a very interesting feature is that no bacterial growth is obtained from ca. half of the milk samples with high CMT scores, emphasizing once more that elevated cellular concentrations as evidenced by the CMT is not always associated with the presence of bacterial infection (Longo et al., 1994). Indeed, physiological cellular concentrations in milk can vary according to the number of lactations and the stage of lactation (Serieys, 1995). Moreover, the failure to isolate bacteria from CMT-positive milk samples may be associated with the presence of antibiotic residues following treatment of the cows or with the destruction of the bacteria during transport (Bouchot et al., 1985). A further possible cause of this failure to isolate bacteria may be found in the growth conditions used at the National Public Health School of Niamey, which do not allow the isolation of

some mastitis-associated bacteria, such as *Mycoplasma bovis* or anaerobes (Laak and Ruhnke, 1995).

In conclusion, results from the present study at the Sahelian experimental station in Toukounous are similar to those obtained during two studies in urban and peri-urban farms in Niger (Bada-Alamedji et al., 2005; Harouna et al., 2008). It is most likely that the absence of hygienic procedures at the time of milking contributes not only to the original contamination but also to the perpetuation of the infection. It is hoped that wider transversal and longitudinal surveys in the three herds will confirm these data and demonstrate the positive role of prophylactic measures when applied, and that the genetic typing of isolates will clarify the mode of contamination and of transmission of the infection.

ACKNOWLEDGMENTS

Abdoukarim Issa Ibrahim is a PhD student at the University of Liège (Belgium), and is supported financially by the Belgium Technical Cooperation (CTB). We are also grateful to the staff of the Sahelian experimental station in Toukounous and especially to Dr Chanono Mogueza, the manager.

REFERENCES

Atalla H, Gyles C, Jacob, CL, Moisan H, Malouin F, Mallard B (2008). Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathog. Dis.* 5: 785-799.

Bada-Alamedji R, Kane Y, Issa Ibrahim A, Vias FG, Akakpo AJ (2005). Bactéries associées aux mammites subcliniques dans les élevages bovins laitiers urbains et périurbains de Niamey (Niger). *RASPA*. 3: 119-124.

Baseiga R, Albizu I, Amorena B (1994). *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet. Microbiol.* 39: 195-204.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.

Bouchot M, Catel J, Chirou C, Ganiere J-P, Lemeneç (1985). Diagnostic Bactériologique des infections mammaires des bovins. *Recl. Méd. Vét.* 161: 567-577.

Bradley A (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164: 116-128.

Brouillette E, Grondin G, Shkreta L, Lacasse P, Talbot BG (2003). In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb. Pathog.* 35: 159-168.

Coelho SM, Pereira IA, Soares LC, Pribul BR, Souza MM (2011). Short communication: profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci.* 94:3305-3310.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318-1322.

Devriese LA (1984). A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 215-220.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 16-34.

Güler L, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH (2005). Antimicrobial Susceptibility and Coagulase Gene Typing of *Staphylococcus aureus*

Isolated from Bovine Clinical Mastitis Cases in Turkey. *J. Dairy Sci.* 88: 3149-3154.

Harouna A, Zecchini M, Locatelli C, Scaccabarozzi L, Cattaneo C, Amadou A, Bronzo V, Marichatou H, Boettcher PJ, Zanoni MG, Alborali L, Moroni P (2009). Milk hygiene and udder health in the periurban area of Hamdallaye, Niger. *Trop. Anim. Health Prod.* 41:705-710.

Haveri M, Roslöf A, Rantala L, Pyörälä S (2007). Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 103: 993-1000.

Hermans K, Devriese LA, Haesebrouck F (2010). *Staphylococcus*. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 4th Edition. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Iowa State University Press, Ames, IA, USA, pp.75-89.

Kadja M, Kane Y, Tchassou K, Kaboret Y, Maini J, Taminiou B (2010). Typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk cows with subclinical mastitis in Dakar, Senegal. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.* 58:195-205.

Karahan M, Acik MN, Cetinkaya B (2009). Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. *Foodborne Pathog. Dis.* 6: 1029-1035.

Laak T, Ruhnke HL (1995). *Mycoplasma* infections of cattle. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma* 2th Edition, Shmuel Razin and Joseph G. Tully Academic Press, California, USA, pp 255-264.

Longo F, Beguin JC, Consalvi PJ, Deltor JC (1994). Quelques données épidémiologiques sur les mammites subcliniques de la vache laitière. *Rev.Méd.Vét.* 145: 42-47.

Matsunaga T, Kamata S, Kakichi N, Uchida K (1993). Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 297-300.

McDonald JA (1989). Receptors for extracellular matrix components. *Am. J. Physiol.* 257: 331-337.

Montaz H, Rahimi E, Tajbakhsh E (2010). Detection of some virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in Iran. *Afr. J. Biotechnol.* 25: 3753-3758.

Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Villa R, Boettcher P, Carli S (2006). Short communication: antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. *J. Dairy Sci.* 89: 2973-2976.

MRA (Ministère de Ressources animales) (2002). Etat des ressources génétiques animales dans le monde : Rapport national de la République du Niger. URL address : <http://ftp.fao.org/docrep/fao/011/a1250f/annexes/CountryReports/Niger.pdf> . consulted 2013/05/06.

Nishifuji K, Sugai M, Amagai M (2008). Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *J. Dermatol. Sci.* 49: 21-31.

Olde R, Barkema RG, Kelton HW, Scholl DF (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 91: 1366-1377.

O'Riordan K, Lee JC (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 218-234.

Ote I, Taminiou B, Duprez J-N, Dizier I, Mainil JG (2011). Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 153: 285-292.

Poutrel B, Boutonnier A, Sutra L, Fournier JM (1988). Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J. Clin. Microbiol.* 26: 38-40.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitz ES (2011). Bacterial causes of bovine mastitis In: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2th Edition, Wiley-Blackwell, Oxford, USA, pp837-850.

Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2007). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, 10th Edition, Elsevier, Philadelphia, USA, pp.673-748.

Rainard P, Corrales JC, Barrio MB, Cochard T, Poutrel B (2003). Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from

- cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF-PV leukotoxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10: 272-277.
- REPOL (Réseau de Recherche et d'Echanges sur les Politiques laitières) (2005). Synthèse sur les filières laitières au Niger. URL address : http://www.repol.info/IMG/pdf/Synthese_biblio_du_Niger.pdf . consulted 2013/05/06.
- Reva ON, Sorokulova IB, Smirnov VV (2001). Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1361-1371.
- Rosec JP, Gigaud O (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.* 77: 61-70.
- Saidou O, Douma S, Zakou AD, Fortina R (2010). Analyse du peuplement herbacé de la station sahéloenne expérimentale de Toukounous (Niger): composition floristique et valeur pastorale. *Sécheresse.* 21: 154-160.
- Sargeant JM, Leslie KE, Shirley JE, Pulkrabek BJ, Lim GH (2001). Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. *J. Dairy Sci.* 84: 2018-2024.
- (SAS) Statistical Analysis System Institute (2001). SAS/STAT User's Guide, Version 9. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Serleys F (1995). Conditions et limites de l'efficacité du traitement au tarissement de la vache laitière. *Bull. GTV.* 1: 11-16.
- Shitandi A, Sternesjo A (2004). Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large- and small-scale producers in Kenya. *J. Dairy Sci.* 87: 4145-4149.
- Sordelli DO, Buzzola FR, Gomez MI, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M, Reitz AJ, Tollersrud T, Denamiel G, Jeric P, Lee JC (2000). Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *J. Clin. Microbiol.* 38: 846-850.
- Soussy CJ (ed) (2010). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM): Recommandations 2010. Paris: Société Française de Microbiologie. Retrieved June 10, 2010, from <http://www.sfm.asso.fr/>
- Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djuki S, Cirkovic I, Ruzicka F (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 115: 891-899.
- Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, Venkitanarayanan KS (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* 92: 179-185.
- Vias FG, Ilou I, Hamissou A (2005). Compétitivité de la filière laitière au Niger: Stratégie d'acteurs et perspectives. Symposium International sur le développement des filières agropastorales en Afrique. pp. 25-29.
- Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Dapra V, Piccinini R (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb. Pathog.* 40: 177-183.
- Zschock M, Kloppert B, Wolter W, Hamann HP, Lammler C (2005). Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 108: 243-249.

How to cite this article: Ibrahima AI, Bada-Alambedji R, Duprez JN, Djik M, Moula N, Ote I, Bardiau M, Mainil JG (2013). Bacterial mastitis in the Azawak zebu breed at the Sahelian experimental station in Toukounous (Niger): Identification and typing of *Staphylococcus aureus*. *Int. Res. J. Microbiol.* 4(7):168-174

1.3. Article 2: Typing of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in Azawak zebu cows at the Sahelian experimental farm of Toukounous, Niger: a three-year long longitudinal and transversal study.

Soumis pour publication

Abdoulkarim Issa Ibrahim, Jean-Noël Duprez, Rianatou Bada-Alambéji, Mamane Djika, Jacques Georges Mainil*, Marjorie Bardiau

A. Issa Ibrahim • J-N. Duprez • J.G. Mainil* • M. Bardiau

Department of Infectious Diseases (Bacteriology), Faculty of Veterinary Medicine and Institute for Fundamental and Applied Research in Animal Health (FARAH), University of Liège, Campus du Sart Tilman (B43a), Quartier Vallée II, 4000 Liège, Belgium

* Corresponding author / e-mail: jg.mainil@ulg.ac.be / Phone: x-32-4-366 9522 / FAX: x-32-4-366-9261

A. Issa Ibrahim

Department of Diagnosis, Epidemiological Investigations and Applied Research (Bacteriology), Niamey, Niger

R. Bada-Alembéji

Department of Immunology and Infectious Pathology (Microbiology), Interstate school of Veterinary Science and Medicine, Dakar, Senegal

M. Djika

National School of Public Health, BP 290, Niamey, Niger

M. Bardiau's current address

Environment & Public Health Research Group, School of Environment & Technology, University of Brighton, Cockcroft Building, Lewes Road, Brighton BN2 4GJ, United Kingdom.

Keywords: Azawak zebu - mastitis - *Staphylococcus aureus* - Pulsed Field Gel Electrophoresis – virulotyping - PCR

Abstract

Staphylococcus (S.) aureus is one of the most important pathogens causing bovine mastitis. The aim of the present work was to follow in three herds and during three years the clonality of *S. aureus* isolated from California Mastitis Test (CMT)-positive cows at the experimental station of Toukounous (Niger) by (i) comparing their PFGE fingerprints, (ii) identifying their virulotypes by PCR amplification, and (iii) assessing the production of capsule and the formation of biofilm. The 88 *S. aureus* isolates belonged to 14 different pulsotypes, 3 of them being predominant: A (30%), D (27%), B (15%). A and B pulsotypes had the highest profile similarity coefficient (94%), while others had similarity coefficients under 60%. Only A and B pulsotypes were present in the three herds from 2010 to 2012. Most surface factor-, leukocidin- and haemolysin-, but not the enterotoxin-encoding genes were detected in the majority (>75%) of the isolates and were evenly distributed between the A, B and D pulsotype isolates. The majority of the 85 *S. aureus* positive at the PCR for the *cap5H* and *cap8H* genes produced either the CP5 (83%) or the CP8 (87%) capsule. Biofilm production by the 69 *icaA*-positive isolates was strong for 8 isolates, moderate for 38 isolates, but weak for 23 isolates, implying that the *icaA* gene may not be expressed by one third of the positive isolates *in vitro*. Altogether those results confirm that a restricted number of *S. aureus* clones are present within a herd or a farm with mastitis.

Introduction

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is one of the contagious mastitis-causing bacterial pathogens and is responsible for clinical and sub-clinical as well as chronic and acute mastitis (Hodges et al. 1984; Keefe 2012). *S. aureus* produces several putative virulence factors contributing to *S. aureus* pathogenicity: protein adhesins, named “Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules” (or MSCRAMMs) interacting with host extracellular components; polysaccharide intercellular adhesins involved in the production of biofilm; other surface antigens intervening in the evasion of the innate and acquired immune responses (capsules, protein A); and secreted toxins causing cellular and tissue damages, such as haemolysins, leukocidins, and enterotoxins (Projan and Novick 1997; Foster and Höök, 1998; Dinges et al. 2000; Srinivasan et al. 2006 ; Nishifuji et al. 2008).

Besides the virulotyping, a very effective and highly discriminatory technique to characterizing the genetic diversity of *S. aureus* during outbreaks is the pulsed field gel electrophoresis (PFGE), or pulsotyping (Hennekinne et al. 2003; Boerema et al. 2006; Hallin et al. 2007).

The purpose of this work was to follow in time (over three years) and in space (over three herds) the fate of *S. aureus* isolated from subclinical mastitis in Azawak zebu cows at the Sahelian experimental farm of Toukounous in Niger. The clonality of the isolated strains was studied by comparing (i) their pulsotypes by PFGE (ii) their virulotypes by PCR and (iii) their ability to produce a capsule and to form a biofilm.

Materials and methods

Study design and *S. aureus* identification

Three herds of lactating cows are present at the Sahelian experimental farm of Toukounous (Niger) located 220 km North East of Niamey, according to their age and level of milk production: “primiparous” cows, “non-elite” cows (<1400 kg milk/lactation) and “elite” cows (>1400 kg milk/lactation). The milking process is performed manually twice daily with no hygiene or antiseptics measures (Issa et al. 2015).

Between 2010 and 2012, the Californian Mastitis Test (CMT) was performed on all lactating cows of the herds and the CMT-positive cows were sampled for bacteriological analysis (Issa et al. 2013). The procedure was repeated three times on the same cows at two-week intervals in 2010 (Table 1). Isolated colonies were pre-identified at the Laboratory of Bacteriology of the National Public Health School of Niamey and confirmed at the Laboratory of Bacteriology of the Veterinary Faculty of the University of Liège (import permits n° CONT/IEC/FRT/589554 in 2010, CONT/IEC/FRT/813231 in 2011 and CONT/IEC/FRT/1016090 in 2012).

Pulsotyping

After extraction of the whole genome DNA and enzymatic digestion with *SmaI* restriction enzyme (Sigma-Aldrich), the DNA fragments were separated using a CHEF MAPPER (Bio-Rad) at 6.0 V/cm for 21 h, with pulsed times ranging from 5s to 60 s, an angle of 120° and a linear ramp factor. Dendrograms were prepared by the Unweighted-Pair Group Method using arithmetic average Algorithm (UPGMA) (Bardiau et al. 2014),

Virulotyping

S. aureus isolates were tested by PCR as described by Ote et al. (2011) for the presence of genes coding for MSCRAMMs (*clfA*, *clfB*, *fnbA*, *cna*, *ebpS*, *sdrC*), biofilm formation (*icaA*), capsular antigens (*cap5H*, *cap8H*), protein A (*spa*), haemolysins (*hla*, *hly*, *hld*, *hlgAC*), leukocidins (*lukD*, *lukM*, *lukF-PV*, *lukS-PV*), and enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec4*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*) (Dinges et al. 2000; Vasudevan et al. 2003; Hermans et al. 2010).

Capsular serotyping

The existence of 11 capsule serotypes is reported with two of them, CP5 and CP8, being most frequent in mastitis-associated *S. aureus* (O'Riordan and Lee, 2004). Capsular serotyping was performed by ELISA assays with specific monoclonal and polyclonal antibodies detecting the CP5 and CP8 antigens (Bardiau et al. 2014). Optical density (OD) values were compared to those obtained with *S. aureus* reference strains, namely the human CP5-positive strain Lowenstein (ATCC 49521) and the human CP8-positive strain Wright (ATCC 49525).

Biofilm production

Biofilm production was assayed in microtitre plates using safranin staining (Bardiau et al. 2014). The quantitative classification of biofilm production was based on OD values at 490 nm using a microplate reader (Bio-Rad, Belgium). Isolates are classified into non-producers and weak, moderate, or strong producers.

Results

S. aureus identification and pulsotyping

From a total of 148 CMT-positive cows that were sampled, 88 *S. aureus* were identified: 68 in 2010, 8 in 2011, and 12 in 2012. Thirty-seven *S. aureus* were isolated from cows of the elite herd, 29 from cows of the non-elite herd and 22 from cows of the primiparous herd (Table 1).

The 88 *S. aureus* isolates exhibited 14 different PFGE fingerprints arbitrarily designated by a capital letter (Table 2). A and B pulsotypes had the highest profile similarity coefficient (94%), while the other pulsotypes had similarity coefficients ranging between ca. 10% and 60% (Fig. 1). A, D and B pulsotypes were the most frequent: 26 isolates (30%), 24 isolates (27%) and 13 isolates (15%), respectively (Table 2). The remaining 11 pulsotypes were identified in one to five isolates each. A and B pulsotypes were identified during the three years and D pulsotype in 2010 and 2012, while most other pulsotypes were restricted to the year 2010 (Table 2). A and D pulsotype isolates were equally distributed in the three herds whereas B pulsotype isolates were almost restricted to the non-elite and elite herds (12/13 isolates), as were the other 6 pulsotypes identified in more than one isolate (Table 2).

In 2010, 12 of the 14 pulsotypes were identified during at least one of the four sampling events: 7 in the primiparous, 5 in the non-elite and 7 in the elite herds (Table 3). But only A pulsotype was identified in the three herds at the four sampling events.

In five cows of the 13 cows that could be followed through the three years (Table 4), the same pulsotype was identified at least twice in 2010, but the same pulsotype was not identified during two consecutive years in any of the cows.

PCR virulotyping

Apart from the *cap5H* and *cap8H* genes all surface factor-encoding genes were detected in the majority (>75%) of the 88 *S. aureus* (Table 5) and three of them were not equally distributed between the A, B and D pulsotype isolates: the *cna* gene (86% of the isolates) was detected in only two thirds of the B pulsotype isolates and the *spa* and *icaA* genes (75% and 78% of the isolates, respectively) in one third and one half of the D pulsotype isolates. The *cap5H* gene (52% of the isolates) was highly associated with A and B pulsotypes and the *cap8H* gene (44% of the isolates) with D pulsotype.

The *lukD*, *lukM*, *hla*, *hly*, *hld* and *hlgAC* toxin-encoding genes were also detected in the majority of the 88 *S. aureus* (>79%) and, with the exception of the *hlgAC* gene, were equally distributed within the A, B and D pulsotype isolates (Table 5). Conversely the *lukS-PV* and *lukF-PV* genes were present in only one third and one fourth of the isolates, respectively, and were more frequently identified in D, than in A and B pulsotype isolates.

Although 62 *S. aureus* (70%) tested positive for at least one enterotoxin-encoding gene, only the *seg* gene was detected in a majority of the 88 isolates (61%). The *sei* and *seb* genes were identified in one third of the isolates (<34%), but the other genes were detected in a very few or in no isolates (3% of the isolates) (Table 5). The *seg*, *sei* and *seb* enterotoxin-encoding genes were all highly associated with D pulsotype (>90%), compared to A and B pulsotypes (0 to 50%) (Table 5).

Capsular antigen ELISA and biofilm formation

Of the 46 isolates genotyped as *cap5H*, 38 (83%) were CP5 ELISA-positive and of the 39 isolates genotyped as *cap8H*, 34 (87%) were CP8 ELISA-positive (Table 6). Irrespective of

the identity of the capsular antigen the highest correlation was with D pulsotype isolates (100%), followed by B (85%) and A (73%) pulsotype isolates.

All 88 *S. aureus* isolates produced biofilm to some extent: 38 (43%), 42 (48%), and 8 (9%) isolates were weak, moderate, and strong biofilm producers, respectively (Table 7). All 8 strong and 90% of the moderate producer isolates (38/42) harboured the *icaA* gene while 60% of the weak producer isolates (23/38) also tested positive (Table 7). The majority of A and B pulsotype isolates not only harboured the *icaA* gene (96% and 85% respectively) but also were moderate to strong biofilm producers (88% and 69% respectively). In contrast only 9% of D pulsotype isolates were moderate and none were strong biofilm producers though 50% (11/22) tested positive for the *icaA* gene (Table 7).

Discussion

Though the 88 *S. aureus* isolated between 2010 and 2012 belong to 14 different pulsotypes, 3 of them (A, B, D) group together 72% and 5 of them (A, B, D, N, Z), 83% of the isolates, confirming that a restricted number of *S. aureus* clones are present within a herd or a farm (Hata et al. 2006; Aires-de-Sousa et al. 2007; Rabello et al. 2007). Nevertheless, apart from the A and B pulsotypes (>90% similarity), the other pulsotypes are not closely related and represent distinct lineages (Fig. 1), emphasizing different contamination origins and/or ways. The majority of pulsotypes are identified during the four sampling events in 2010 (Table 3), but only A and B pulsotypes are present in the three herds from 2010 to 2012, the latter being isolated only once from the primiparous cows (Table 2). Already in 2009, A, B, and D pulsotypes had been identified, as had C pulsotype (Issa et al. 2013) which was absent in this study, and B pulsotype was restricted to the non-elite and elite herds (Table 2). Time (over years) diversity and distribution of the pulsotypes is also illustrated by the results obtained for the 13 cows followed along the three years (Table 4).

Although some influence of the differences in the sampling methods and in the bacteriological analysis cannot be ruled out, this diversity and distribution of pulsotypes may be explained by different factors, each one emphasizing the lack of hygiene measures during the milking process (no hand washing, no teat disinfection), more especially occasional exchange of the milkers between the herds, mixing of all pregnant cows in only one maternity building, contamination by new strains after the introduction of a new cow or brought in by the milkers from their living environment, ... (Roberson et al. 1994; Middleton et al. 2002; Sommerhauser et al. 2003). Altogether the predominance of a limited number of pulsotypes suggests that those isolates have a greater capacity to infect the mammary gland, to persist over time within the mammary gland and/or to spread between cows (Rabello et al. 2007).

However, according to the PCR results the virulotypes do not greatly differ between pulsotypes (Table 5). The MSCRAMM-, capsule-, haemolysin-, leukocidin (except *lukS-PV* and *lukF-PV*)-, and one enterotoxin (*seg*)-encoding genes are present in a majority of isolates, while the other genes are detected in ca. less than one third of them, similarly to other published results. The most noticeable difference is the much higher prevalence of the *lukS-PV* (36%) and *lukF-PV* (26%) genes coding for the Panton-Valentine leukocidin (PVL) compared to the results of other studies in Europe and Africa (Fueyo et al. 2005; Rainard et al. 2003; Karahan et al. 2009; Ikawaty et al. 2010; Kadja et al. 2010; Ote et al. 2011; Issa et al. 2013). Since the PVL toxin is strongly associated with human *S. aureus* isolates causing skin and soft-tissue infections (Shallcross et al. 2013), the *lukS-PV*- and/or *lukF-PV*-positive isolates in Toukounous might therefore be of human rather than of cattle origin, transferred during fi the manual milking process.

In addition, three of the most frequent genes are unevenly distributed between the most frequent three pulsotypes (Table 5): the *spa*, *icaA* and *cap5H* genes are detected more frequently in A and B pulsotype isolates; the *lukS-PV* and *lukF-PV* genes, in D pulsotype isolates; and the *cap8H*, *seg*, *sei* and *seb* genes, in D pulsotype isolates. To our knowledge, none of these results can actually explain, from the one hand, the higher prevalence of these three pulsotypes, or, from the other hand, the difference of their isolation rates between years and herds. Indeed if some of the hundreds of the *spa* gene variants and if the *seg* and *sei* genes are more frequently present in *S. aureus* associated with persistent infections and subclinical mastitis (Haveri et al. 2007; Mitra et al. 2013; Spa Server Database, 2015), no pulsotype association has been described to our knowledge.

As already reported the vast majority of the 88 *S. aureus* test positive for the *cap5H* or *cap8H* capsule-encoding genes and are not at random distributed between the different pulsotypes (Ikawaty et al. 2010), but the reason for this is unknown. The prevalence of

isolates actually expressing CP5 and CP8 (81%) is high and similar for either antigen (Table 6) in contrast to other studies (Camussone et al. 2012; Bardiau et al. 2014). Several parameters can indeed influence the expression of CP5 and CP8 capsular antigens, including the *S. aureus* growth conditions, the duration of the culture and, of course, mutations in the encoding genes (Poutrel et al. 1995; Hebert et al. 2001; Cocchiario et al. 2006).

Finally the frequency of the *icaA* gene in *S. aureus* isolated from bovine mastitis can be highly different between studies: 15% (Darwish and Asfour 2013), 58% (Chavhan et al. 2012), 86% (Ote et al. 2011), 98% (Castelani et al. 2015) vs. 78% in the present study. Biofilm production by the 69 *icaA*-positive isolates was strong for 8 isolates (belonging to different pulsotypes), moderate for 38 isolates (including most A and B pulsotype isolates), but weak for 23 isolates (including all 11 D pulsotype isolates) (Table 7), emphasizing not only that the *icaA* gene may not be expressed by one third of the positive isolates in this *in vitro* assay, but also that this lack of expression could be related to the pulsotype.

In conclusion, *S. aureus* isolates collected between 2010 and 2012 can be divided into 14 pulsotypes of which three are predominant. The virulotyping identified some differences between them but none could explain the differences observed in their distribution between herds and years, nor their actual association with only sub-clinical mastitis. Additional long-term surveys focusing on the isolation and typing of *S. aureus* from the hands of milkers and from non-milk sites (dairy cow teat skin, teat canals, skin lesion and environment of the cows and of the milkers) may help to better elucidate the epidemiology and the virulence of the different pulsotypes of *S. aureus*-associated mastitis at Toukounous. The results obtained from such surveys will subsequently help to set-up effective control strategies and hygiene education programs throughout the production chain (Castelani et al. 2013).

Acknowledgments Abdoukarim Issa Ibrahim is a PhD student at the University of Liège (Belgium), and is supported financially by the Belgium Technical Cooperation (CTB). We are grateful to the staff of the Sahelian experimental farm in Toukounous and especially to Dr Chanono Mogueza, the manager. We also thank Dr. Jon Caplin of the School of Environment & Technology, University of Brighton, England, UK, and Dr. Damien Thiry of the Faculty of Veterinary Medicine and of FARAH, University of Liège, Belgium, for critical reading and editorial reviewing of the manuscript.

Conflict of interest None.

References

- Aires-de-Sousa, M., Parente, C.E.S., Vieira-da-Motta, O., Bonna, I.C.F., Silva, D.A. and Lencastre, H., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3845-3849.
- Bardiau, M., Detilleux, J., Farnir, F., Mainil, J.G. and Ote, I., 2014. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis, *Veterinary Microbiology*, 169, 74-79.
- Boerema, J.A., Clemens, R. and Brightwell, G., 2006. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Food Microbiology*, 107, 192-201.
- Camussone, C., Rejf, P., Pujato, N., Schwab, A., Marcipar, I. and Calvino, L., 2012. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1010-1014.
- Castelani, L., Santos, A.F., Dos Santos, M.M., Zafalon, L.F., Pozzi, C.R. and Arcaro, J.R., 2013. Molecular Typing of mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 4326-4333.
- Castelani, L., Pilon, L.E., Martins, T., Pozzi, C.R. and Arcaro, J.R., 2015. Investigation of biofilm production and *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis, *Animal Science Journal*, 86, 340-344.
- Chavhan, S.K., Kalorey, D.R., Nagdive, A.A., Purohit, H.J., Barbuddhe, S.B. and Kurkure, N.V., 2012. Molecular characterization of intercellular adhesion gene in *Staphylococcus*

- aureus* isolated from bovine mastitic milk, *Tropical Animal Health and Production*, 44, 247-252.
- Cocchiaro, J.L., M.I. Gomez, M.I., A. Risley, A., R. Solinga, R., D.O. Sordelli, D.O. and J.C. Lee, J.C., 2006. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*, *Molecular Microbiology*, 59, 948-960.
- Darwish, S.F and Asfour, H.A., 2013. Investigation of biofilm forming ability in staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays, *The Scientific World Journal*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/378492> (9 pages).
- Dinges, M.M., Orwi, P.M. and Schlievert, P.M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, *Clinical Microbiological Reviews*, 13, 16-34.
- Foster, T.J. and Hook, M., 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*, *Trends in Microbiology*, 6, 484-488.
- Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., Muniz, J., Alvarez, M.A. and Martin, M.C., 2005. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1278-1284.
- Hallin, M., Deplano, A., Denis, O., De Mendonca, R., De Ryck, R. and Struelens, M.J., 2007. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections, *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 127-133.
- Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., Ogawa, T., Endo, T. and Eguchi, M., 2006. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis milk in Hokkaido, Japan, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 68, 165-170.

- Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L. and Pyörälä, S., 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and non-persistent intramammary infections with different clinical characteristics, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 993-1000.
- Herbert, S., Newell, S.W., Lee, C., Wieland, K.P., Dassy, B., Fournier, J.M., Wolz, C. and Doring, G., 2001. Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides by CO₂, *Journal of Bacteriology*, 183, 4609-4613.
- Hennekinne, J.A., Kerouanton, A., Brisabois, A. and De Buyser, M.L., 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments, *Journal of Applied Microbiology*, 94, 321-329.
- Hermans, K., Devriese, L.A. and Haesebrouck, F., 2010. *Staphylococcus*. In: C.L. Gyles, J.F. Prescott, J.G. Songer and C.O. Thoen (eds.), *Pathogenesis of bacterial infections in animals*, Wiley Blackwell Publishing, Ames, IA, USA, 75-89.
- Hodges, R.T., Jones, Y.S. and Holland, J.T., 1984. Characterization of staphylococci associated with clinical and subclinical bovine mastitis, *New Zealand Veterinary Journal*, 32, 141-145.
- Ikawaty, R., Brouwer, E.C., Van Duijkeren, E., Mevius, D., Verhoef, J. and Fluit, A.C., 2010. Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in The Netherlands, *International Journal of Dairy Science*, 5, 60-70.
- Issa, I.A., Bada-Amlebedji R., Duprez, J.-N., Djika, M., Moula, N., Ote, I., Bardiau, M. and Mainil, J.G., 2013. Bacterial mastitis in the Azawak zebu breed at the Sahelian experimental station in Toukounous (Niger): Identification and typing of *Staphylococcus aureus*, *International Research Journal of Microbiology*, 4, 168-178.
- Issa, I.A., Bada-Alambéji, R. and Mainil, J.G., 2014. Le Zébu Azawak dans l'élevage bovin au Sahel, *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*, 12, 71-77.

- Kadja, M., Kane, Y., Tchassou, K., Kaboret, Y., Mainil, J. and Taminiou, B, 2010. Typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk cows with subclinical mastitis in Dakar, Senegal, *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 58, 195-205.
- Karahan, M., Acik, M.N. and Cetinkaya, B., 2009. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey, *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 1029-1035.
- Keefe, G., 2012. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(2), 203-216.
- Middleton, J., Fox, L., Gay, J., Tyler, J. and Besser, T., 2002. Use of pulsed-field gel electrophoresis for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds with different cattle importation practices, *Epidemiology and Infection*, 129, 387-395.
- Mitra, S.D., Velu, D., Bhuvana, M., Krithiga, N., Banerjee, A., Shome, R., Rahman, H., Ghosh, S.K. and Shome, B.R., 2013. *Staphylococcus aureus* spa type t267, clonal ancestor of bovine subclinical mastitis in India, *Journal of Applied Microbiology*, 114, 1604-1615.
- Nishifuji, K., Sugai, M. and Amagai, M., 2008. Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals, *Journal of Dermatological Science* 49, 21-31.
- O'Riordan, K. and Lee, J.C., 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides, *Clinical Microbiological Reviews*, 17, 218-234.
- Ote, I., Taminiou, B., Duprez, J-N., Dizier, I. and Mainil, J.G., 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis, *Veterinary Microbiology*, 153, 285-292.

- Poutrel, B., Gilbert, F.B. and Lebrun, M., 1995. Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine *Staphylococcus aureus* strains, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2, 166-171.
- Projan, S.J and Novick, R.P., 1997. The molecular basis of pathogenicity. In: K.B. Crossley and G.L Archer (eds.), *The staphylococci in human diseases*, Churchill Livingstone, New York, USA, 55-81.
- Rabello, R.F., Moreira, B.M., Lopes, R.M.M., Teixeira, L.M., Riley, L.W. and Castro, A.C.D., 2007. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds, *Journal of Medical Microbiology* 56, 1505-1511.
- Rainard, P., Corrales, J.C., Barrio, M.B., Cochard, T. and Poutrel, B., 2003. Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10, 272-277.
- Roberson, J.R., Fox, K.L., Hancock, D.D., Gay, J.M. and Besser, T.E., 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites of dairy farms, *Journal of Dairy Science*, 77, 3354-3364.
- Shallcross, L.J., Fragaszy, E., Johnson, A.M. and Hayward, A.C., 2013. The role of the Pantone-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 13, 43-54.
- Sommerhauser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschock, M., Sobiraj, A. and Failing, K., 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme, *Veterinary Microbiology*, 96, 91-102.
- Spa Server Database. Ridom GmbH. <http://spa.ridom.de/index.shtml>. Accessed 24 February 2015.

- Srinivasan, V., Sawant, A.A., Gillespie, B.E., Headrick, S.J., Ceasaris, L. and Oliver, S.P., 2006. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis, *Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 274-283.
- Vasudevan, P., Nair, M.K., Annamalai, T. and Venkitanarayanan, K.S., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation, *Veterinary Microbiology*, 92, 179-185.

RESULTATS

Table 1 Number of CMT-positive cows and of *S. aureus* identified per year and per herd

Year	No. CMT-positive cows /			No. <i>S. aureus</i> -positive cows /		
	No. cows tested			No. cows sampled		
	Primiparous cows	Non-elite cows	Elites cows	Primiparous cows	Non-elite cows	Elite cows
2010-t ⁰ ^a	19/39	20/40	25/65	2/19	5/20	3/25
2010-t+2w	ND ^b	ND	ND	7/19	5/20	7/25
2010-t+4w	ND	ND	ND	7/19	4/20	6/25
2010-t+6w	ND	ND	ND	6/19	7/20	9/25
2011	ND	24/48	19/44	ND	4/24	4/19
2012	ND	19/29	32/51	ND	4/19	8/32

^a 2010-t⁰ = first of four sampling times in 2010; 2010-t+2w = second sampling two weeks later; etc

^b ND = not done

RESULTATS

Table 2 Number of pulsotypes per year and per herd

PFGE profile	Number of isolates	Year			Herd		
		2010 ^a	2011	2012	Primiparous cows ^a	Non-elite cows	Elite cows
A	26 (30%)	24	1	1	9	9	8
D	24 (27%)	20		4	8	9	7
B	13 (15%)	6	2	5	1	5	7
N	5 (6%)	1	4		1	3	1
Z	4 (5%)	4				1	3
W	3 (3%)	3					3
P	3 (3%)	3					3
Q	3 (3%)	3					3
G	2 (2%)	1		1		2	
F	1 (1%)			1			1
O	1 (1%)	1			1		
R	1 (1%)		1				1
T	1 (1%)	1			1		
M	1 (1%)	1			1		

^a Primiparous cows were sampled only in 2010

RESULTATS

Table 3 *S. aureus* pulsotypes according to the sampling times (T0 to T+6W) in 2010

Events	Primiparous cows	Non-elite cows	Elite cows
T0	A (2/2)	A (1/5)	A (1/3)
		B (1/5)	B (1/3)
		D (2/5)	P (1/3)
		Z (1/5)	
T+2W	A (3/7)	A (2/5)	A (2/7)
	D (3/7)	D (3/5)	D (2/7)
	M (1/7)		Q (1/7)
			Z (2/7)
T +4W	A (2/7)	A (2/4)	A (1/6)
	D (2/7)	D (1/4)	D (1/6)
	B (1/7)	G (1/4)	P (1/6)
	N (1/7)		Q (2/6)
	T (1/7)		Z (1/6)
T+6W	A (2/6)	A (4/7)	A (2/9)
	D (3/6)	D (1/7)	D (2/9)
	O (1/6)	B (2/7)	B (1/9)
			P (1/9)
			W (3/9)

RESULTATS

Table 4 Pulsotypes distribution of *S. aureus* isolates from 13 cows over three years (2010 to 2012).

Herds	Cow	2010	2010	2010	2010	2011	2012
		t0*	t+2w	t+4w	t+6w		
Elite	56/11		Q		W	A	
	61/11		Z	Z		R	D
	63/11	A	D	Q		N	B
	65/11			P	P		B
	66/11		A		A	B	
	68/11			D	A		B
	70/11				D		A
	71/11		Z		D		B
	76/11				W		D
Non-elite	79/11	A	A	A	A	B	G
	86/11	D	D		A-D ^a	N	D
	94/11	B		G		N	D
	96/11			A		N	B

^a Two different *S. aureus* colonies were isolated and identified

RESULTATS

Table 5 Relation between virulotypes and pulsotypes

Target genes coding for ...	Total %	Pulsotypes													
		A	D	B	N	Z	W	P	Q	G	F	O	R	T	M
		<i>n</i> =26	<i>n</i> =24	<i>n</i> =13	<i>n</i> =5	<i>n</i> =4	<i>n</i> =3	<i>n</i> =3	<i>n</i> =3	<i>n</i> =2	<i>n</i> =1	<i>n</i> =1	<i>n</i> =1	<i>n</i> =1	<i>n</i> =1
... surface adhesins and antigens															
<i>clfB</i>	96%	26	23	13	5	4	3	3	3	2	1	0	0	1	1
<i>clfA</i>	94 %	26	24	13	4	4	3	1	3	2	1	0	0	1	1
<i>fnbA</i>	94%	25	23	12	5	4	3	2	3	2	1	1	0	1	1
<i>ebpS</i>	93%	26	23	12	3	4	3	3	3	1	1	1	0	1	1
<i>sdrC</i>	87%	25	23	12	5	0	3	1	3	1	1	0	0	1	1
<i>cna</i>	86%	25	23	9	3	2	3	2	3	2	1	0	1	1	1
<i>icaA</i>	78%	25	11	11	5	4	3	2	3	2	1	0	0	1	1
<i>spa</i>	75%	24	7	13	4	4	3	2	3	2	1	1	0	1	1
<i>cap5H</i>	52%	24	2	12	2	0	3	1	0	1	0	1	0	0	0
<i>cap8H</i>	44%	2	21	1	3	4	0	1	3	1	1	0	0	1	1
... leukocidins and haemolysins															
<i>hly</i>	95%	25	24	13	5	4	3	2	3	2	1	0	0	1	1
<i>hly</i>	94%	25	24	11	5	4	3	2	3	2	1	0	1	1	1
<i>lukM</i>	93%	24	24	13	5	4	3	1	3	1	1	0	1	1	1

RESULTATS

<i>lukD</i>	87%	24	22	12	2	4	3	3	3	1	1	0	0	0	1
<i>hla</i>	86%	23	22	10	5	4	3	1	3	2	1	0	0	1	1
<i>hlgAC</i>	79%	19	19	12	5	3	3	2	3	1	1	0	0	1	1
<i>lukS-PV</i>	36%	1	15	6	1	1	3	2	0	1	1	0	0	1	0
<i>lukF-PV</i>	26%	2	12	1	1	0	3	1	0	2	0	0	0	1	0
... enterotoxins															
<i>seg</i>	61%	9	24	7	0	3	3	2	3	1	1	0	0	1	0
<i>sei</i>	37%	0	22	4	0	0	3	1	0	1	1	0	0	1	0
<i>seb</i>	34%	0	23	4	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
<i>sec4</i>	14%	6	3	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
<i>seh</i>	6%	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
<i>sea</i>	4%	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1
<i>sed</i>	3%	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>sej</i>	3%	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>see</i>	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

RESULTATS

Table 6 Comparison of the results of the PCR for the *cap5H* and *cap8H* genes and of the ELISA for the production of CP5 and CP8 capsular polysaccharides

ELISA-positive isolates		Pulsotypes													
		A	D	B	N	Z	W	P	Q	G	F	O	R	T	M
		26 ^a	24	13	5	4	3	3	3	2	1	1	1	1	1
CP5	38 ^b	19	2	10	1	0	3	1	0	1	0	1	0	0	0
antigen	(46) ^c	(24) ^c	(2)	(12)	(2)	(0)	(3)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)
CP8	34 ^b	0	21	1	3	4	0	0	3	0	1	0	0	0	1
antigen	(39)	(2)	(21)	(1)	(3)	(4)	(0)	(1)	(3)	(1)	(1)	(0)	(0)	(1)	(1)

^a Number of isolates belonging to the pulsotype (Table 2)

^b Number of isolates producing the CP5 or CP8 capsular antigens

^c Number of *cap5H* or *cap8H* genes PCR-positive isolates (Table 5)

RESULTATS

Table 7 Comparison of the pulsotypes with the results of the biofilm production and of the PCR for the *icaA* gene.

Production of a biofilm		Pulsotypes													
		A	D	B	N	Z	W	P	Q	G	F	O	R	T	M
		26 ^a	24	13	5	4	3	3	3	2	1	1	1	1	1
Weak	38 ^b	3	22	4	3	1		2	1		1	1			
	(23) ^c	(3) ^c	(11)	(2)	(3)	(1)		(1)	(1)		(1)	(0)			
Moderate	42 ^b	21	2	8	1	3	1		2	1			1	1	1
	(38)	(20)	(0)	(8)	(1)	(3)	(1)		(2)	(1)			(0)	(1)	(1)
Strong	8 ^b	2		1	1		2	1		1					
	(8)	(2)		(1)	(1)		(2)	(1)		(1)					

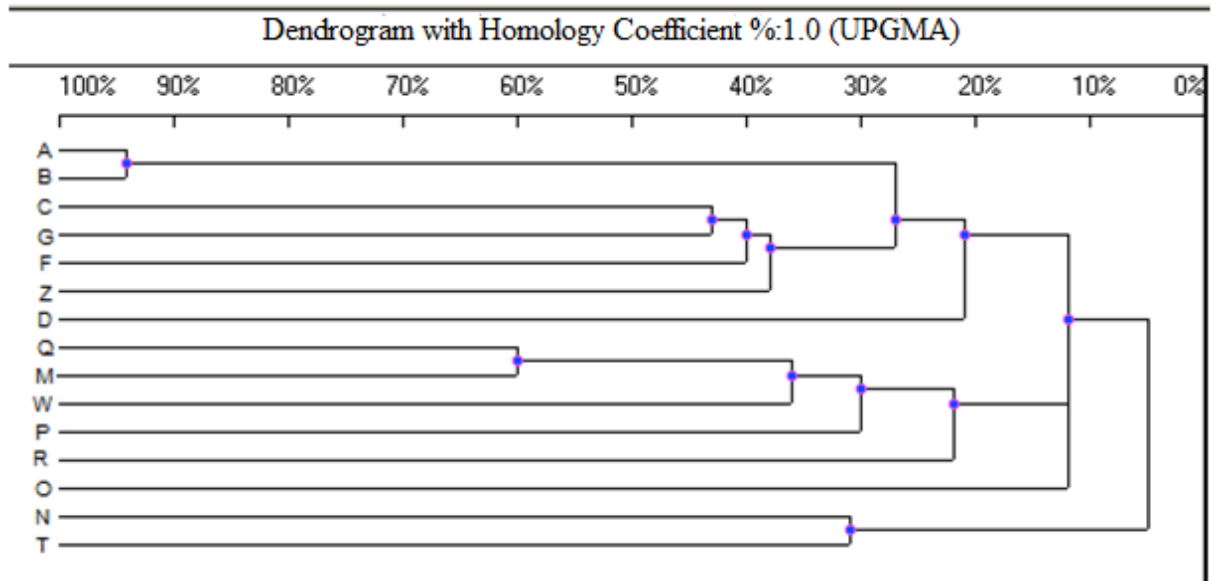
^a number of isolates belonging to the pulsotype (Table 2)

^b number of isolates producing weak, moderate or high levels of a biofilm

^c number of *icaA* gene PCR-positive isolates (Table 5)

RESULTATS

Figure 1 Dendrogram of the *S. aureus* isolates derived from the PFGE profiles



NB : pulsotype C isolate was identified in 2009 (Issa et al. 2013) but not between 2010 and 2012

1.4. Article 3: Antibiotic resistance trends of *Staphylococcus aureus* isolated between 2010 and 2012 from mastitis cases in Azawak zebu in Niger

Abdoulkarim Issa Ibrahim^{1,2,*}, Jean-Noël Duprez¹, Rianatou Bada-Alamedji³, Nassim Moula⁴, Jacques G. Mainil¹, Marjorie Bardiau¹

¹Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Sart-Tilman, B43a, B-4000 Liège, Belgium

²Bacteriology, Department of Diagnosis, Epidemiological Investigations and Applied Research, BP 485, Niamey, Niger

³Microbiology, Immunology and Infectious Pathology, Interstate school of Veterinary Science and Medicine, BP 5077, Dakar, Senegal

⁴Department of Animal Production, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Boulevard de Colonster, 20, building B43, 4000 Liege, Belgium

*Corresponding Author: Abdoulkarim Issa Ibrahim

Publié dans African Journal of Microbiology Research, 8(35): 3271-3275, 2014

Full Length Research Paper

Antibiotic resistance trend of *Staphylococcus aureus* isolated between 2010 and 2012 from mastitis cases in Azawak zebu in Niger

Abdoulkarim Issa Ibrahim^{1,2*}, Jean-Noël Duprez¹, Rianatou Bada-Alambedji³, Nassim Moula⁴, Jacques G. Mainil¹ and Marjorie Bardiau¹

¹Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Sart Tilman, B43a, B-4000 Liège, Belgium.

²Bacteriology, Department of Diagnosis, Epidemiological Investigations and Applied Research, BP 485, Niamey, Niger.

³Microbiology, Immunology and Infectious Pathology, Interstate school of Veterinary Science and Medicine, BP 5077, Dakar, Senegal.

⁴Department of Animal Production, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Boulevard de Colonster, 20, building B43, 4000 Liege, Belgium.

Received 7 July, 2014; Accepted 22 August, 2014

The present study was conducted at the Sahelian Experimental Station in Toukounous Niger, on three herds of Azawak zebu breed in order to evaluate antimicrobial susceptibility of a total of 43 *Staphylococcus aureus* isolated from 164 milk samples of cows with subclinical mastitis from 2010 to 2012. The highest frequency of resistance was observed for the β -lactam family: penicillin (46%) followed by oxacillin (16%). Twenty isolates were sensitive to all tested antibiotics, 12 were resistant to one of them and 11 were multi-resistant (2 to 5 antibiotics). The resistance percentage to oxacillin, enrofloxacin and clindamycin varied significantly over the 3 years ($p < 0.05$) but not to the other antibiotics. Moreover, 90% of *S. aureus* isolates resistant to penicillin detected by *in vitro* disk diffusion possessed the *blaZ* gene. In conclusion, the isolates from cases of mastitis at Toukounous are more resistant to the antibiotics frequently used for treatments at the station than to other antibiotics.

Key words: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance, Azawak zebu, Niger.

INTRODUCTION

Mastitis is the inflammation of the mammary gland most frequently caused by bacterial infection. Bacterial mastitis is a disease causing considerable economic loss in cattle farming. Milk deficits during mastitis vary from 25 to 48%

depending on the intensity of inflammation and the stage of lactation (Gebreyohannes et al., 2009). Treatment (use of antibiotics) costs can be expensive and the incurable cows must be reformed, a preventive method truly efficient

*Corresponding author. E-mail: karimlebelge@yahoo.fr. Tel: +3243664052, +22796573021. Fax: +3243664261, +22720732147.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

but also very expensive (Radostits et al., 2007). At the Sahelian station in Toukounous (Niger) reformed cows are sold to private farmers for fattening before slaughter.

Several bacterial species can cause bovine mastitis (Radostits et al., 2007). In many countries including Niger, *Staphylococcus aureus* is one of the most frequently isolated species from subclinical and clinical mastitis (Pradeep et al., 2003; Bada et al., 2005; Harouna et al., 2009; Issa et al., 2013). As a consequence of the wide use of antibiotics in dairy cattle farms, several mastitis-causing bacterial species have become resistant to the most frequently used antibiotics (Werckenthin et al., 2001). Nevertheless, antimicrobial therapy still plays an important role in mastitis control by reducing the infection levels and preventing new cases (Rabello et al., 2005).

In Niger, zebu cattle of the Azawak breed offer the best dairy aptitude and since 1975 the Niger government has opted for a policy of development and improvement of the breed. The experimental station in Toukounous was therefore set up with the objective of improving the dairy production by genetic selection and of promoting its distribution to individual farmers across the whole country (MRA, 2002). But, according to the available data in the yearly reports, the extensive use of antibiotics of the β -lactam (amoxicillin, ampicillin), tetracyclin (tetracyclin, oxytetracyclin), aminoglycoside (streptomycin, gentamicin) and sulfonamide families is noticeable, more especially for the treatment of intestinal and mammary gland infections (SSET, 2009). However, the influence of this wide antibiotic use on the level of resistance of mastitis-causing bacterial species is unknown. It is therefore important to study not only the prevalence of the different antibiotic resistance profiles of the most frequent mastitis-causing bacterial species, but also their evolution in time to foresee the efficiency of the treatments in the future.

Therefore the objective of this survey was to follow the evolution of antibiotic resistance of the *S. aureus* isolates during a three year period of time (2010-2012) from cases of mastitis in Azawak zebu at the Sahelian experimental station of Toukounous, Niger.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolation and identification

A total of 164 milk samples were collected between 2010 and 2012 from cows of the three Azawak zebu herds (elites, non-elites and primiparous) of the Toukounous station with subclinical mastitis. The bacteriological analysis of milk samples and the identification of *S. aureus* were performed as described previously (Issa et al., 2013).

Antibiotic susceptibility testing and resistance profiles

The susceptibility of the *S. aureus* isolates to seven antibiotics was determined by the disc diffusion method on Mueller-Hinton agar plates (Becton Dickinson, Belgium) as described by Bauer et al. (1966). Isolates were tested with discs with tetracyclin (30 UI),

penicillin G (10 UI), gentamicin (10 UI), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 μ g / 23.75 μ g), enrofloxacin (5 μ g), clindamycin (2 UI) and oxacillin (5 μ g) (Becton Dickinson, Belgium). The diameter in mm of the inhibition zone of each tested antibiotic was compared with the recommendations of the French Committee Guidelines for susceptibility testing (Comité de l'Antibiogramme vétérinaire de la Société Française de Microbiologie, 2010) to determine the susceptibility/resistance profile of each isolate. The data were processed in a spreadsheet program (Excel for Windows, Microsoft).

PCR characterization

All the isolates were tested for the presence of *blaZ* gene (coding for β -lactamase) by polymerase chain reaction (PCR) with forward primer 5'-TAA GAG ATT TGC CTA TGC TT-3' and reverse primer 5'-TTA AAG TCT TAC CGA AAG CAG-3' (Olsen et al., 2006). DNA extraction was carried out using the ChargeSwitch DNA Mini Bacteria Kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions for staphylococci. The PCR reaction mixture contained: 1U of *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, USA), 2.5 μ l of 2 mM deoxynucleoside triphosphates (Eurogentec, Belgium), 2.5 μ l of 10X ThermoPol Reaction Buffer, 1 μ l of each primer (10 μ M) and 1.5 μ l of a DNA template in a total volume of 25 μ l. The PCR reactions were performed using a Mastercycler® (Eppendorf, France). The PCR-amplified DNA fragment of 519 bp was isolated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel and photographed under UV light after ethidium bromide staining.

Statistical analysis

To compare the evolution of the percentages of resistant *S. aureus* to the different antibiotics over the years (2010, 2011 and 2012), the Fisher's Exact Test was performed (SAS, 2001). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 43 *S. aureus* isolates were recovered from the 164 milk samples: 22 isolates in 2010, 9 in 2011 and 12 in 2012, with 7 isolates from primiparous cows, 21 from elite cows and 15 from non-elites cows (Table 1). Twenty isolates (46%) were sensitive to all antibiotics tested, but 23 *S. aureus* isolates (54%) were resistant to at least one antibiotic tested: 14 in 2010 (33%), 5 in 2011 (12%) and 4 in 2012 (9%) ($p < 0.05$).

The average resistance rates over the three years differ according to the antibiotic. As many as 20 of the 43 *S. aureus* isolates (46%) were resistant to penicillin (Figure 1); much less isolates were resistant to oxacillin (16%), gentamicin (9%), trimethoprim-sulfamethoxazole (9%), tetracyclin (7%), clindamycin (5%) and enrofloxacin (2%). The annual resistance rates in 2010 (22 isolates), 2011 (9 isolates) and 2012 (12 isolates) were the following: penicillin (64, 22 and 33%), oxacillin (14, 44 and 0%), gentamicin (4, 0 and 0%), trimethoprim-sulfamethoxazole (14, 11 and 0%) tetracyclin (14, 0 and 0%), clindamycin (4, 11 and 0%) and enrofloxacin (0, 0 and 8%). The Fisher's Exact Test confirmed a significant difference ($p < 0.05$) in the resistance percentages to oxacillin, enrofloxacin and clindamycin over the 3 years but not to the other antibiotics. All but three of the 23 resistant

Table 1. Number of *S. aureus* isolated at Toukounous according to the herd and to the year.

Herd	2010	2011	2012	Total
	No of sampled animal / No of isolated <i>S. aureus</i>			
Elite	25/9	19/4	32/8	76/21
Non-elite	20/7	24/4	19/4	63/15
Primiparous	19/6	6/1	0/0	25/7
Total	64/22	49/9	51/12	164/43

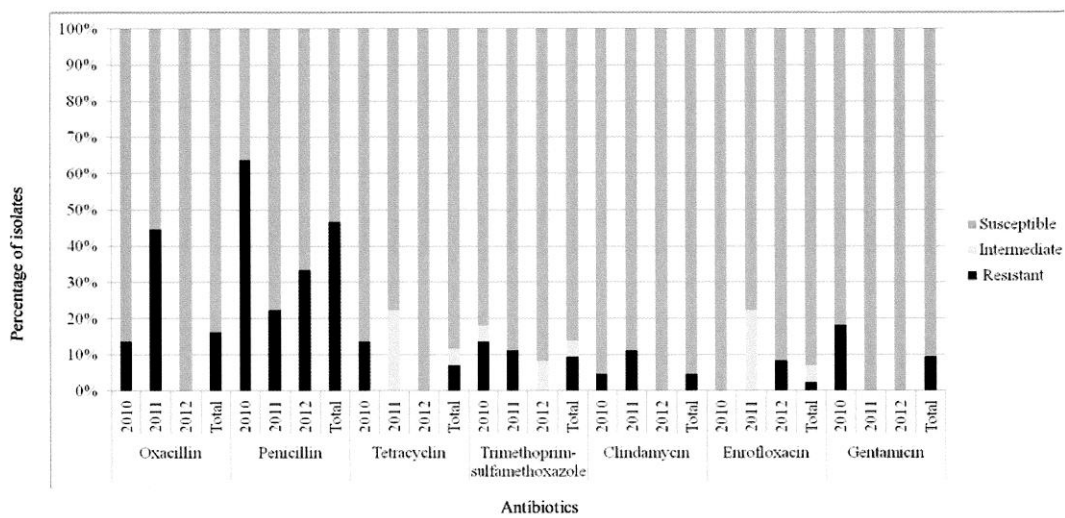


Figure 1. Antibiotic resistance profiles of the 43 *S. aureus* isolates in 2010, 2011 and 2012.

isolates were resistant to penicillin and 11 of them were multidrug resistant (Table 2): six isolates were resistant to two antibiotics, four to three antibiotics and one to 5 antibiotics. These results are probably related to the frequent use of β -lactams in the treatment of any suspected bacterial infection at the station followed by tetracyclins alone or in combination with aminoglycosides in second intention.

The average resistance rates in Toukounous are comparable, sometimes lower, to those obtained in previous studies performed in different African countries and in Pakistan. For instance, 64, 56, 54 and 100% of the *S. aureus* isolates respectively in Tunisia, Pakistan, Senegal and Uganda, are resistant to penicillin (Ben Hassen et al., 2002; Arshad et al., 2006; Kadja et al., 2010; Kateete et al., 2013). The results are also similar for oxacillin and tetracyclin. Oxacillin resistance rate is 7.6, 10 and 15% respectively in Nigeria, Senegal and Morocco (Bendahou

et al., 2008; Kadja et al., 2010; Suleiman et al., 2012); whereas tetracyclin resistance rate is 13 and 15% in two previous studies in Niger in 2007 and 2009 (Harouna et al., 2009; Issa et al., 2013). Finally, 25% of the isolates of this study are multiresistant (resistance to at least two antibiotics), a result also comparable to the 23% reported by Zanette et al. (2010), but lower than the 62% reported by Meideiros et al. (2009), both in Brazil.

Thirteen cows could be followed between 2010 and 2012 to assess the individual antibiotic resistance evolution (Table 3). The antibiotic resistance profiles of the *S. aureus* isolated from the same cow differed from one year to another suggesting that the isolates are not clonal and that reinfection of the udder occurred during the three years. The Pulsed Field Gel Electrophoresis profiles (manuscript in preparation) confirm the hypothesis that isolates from the same cow are indeed not clonal.

Of the 20 isolates of *S. aureus* resistant to the penicillin

Table 2. Resistance profiles of the 23 *S. aureus* isolates resistant to at least one antibiotic.

No. of antimicrobials	Resistance profile					No. of isolates
1	Pen					9
	Oxa					2
	Clin					1
2	Pen	Oxa				2
	Pen	Gen				2
	Pen	Tet				1
	Pen	Eno				1
3	Pen	Oxa	Tet			1
	Pen	Oxa	Tsu			1
	Pen	Tet	Tsu			1
	Pen	Tsu	Gen			1
5	Pen	Oxa	Gen	Tsu	Clin	1
Total						23

Pen = Penicillin, Oxa = oxacillin, Tet = tetracyclin, Tsu = trimethoprim-sulfamethoxazole, Enro = enrofloxacin, Clin = clindamycin, Gen = gentamicin.

Table 3. Antibiotic resistance profiles of the *S. aureus* isolates from 13 cows over three years (2010 to 2012).

Cow identification/ year of isolation	Antibiotic resistance profile		
	2010	2011	2012
56/11	Pen, Oxa, Tsu, Clin, Gen	S	0
61/11	0	Pen, Oxa, Tsu	Pen
63/11	0	Clin	S
65/11 and 68/11	S	0	S
66/11	S	Oxa	0
70/11	Pen, Gen	0	S
71/11	Pen	0	S
76/11	Pen, Tet, Tsu	0	S
79/11	S	S	S
86/11	Pen	Pen, Oxa	Pen, Enro
94/11	0	0	Oxa
96/11	S	Oxa	S

Pen = penicillin, Oxa = oxacillin, Tet = tetracyclin, Tsu = trimethoprim-sulfamethoxazole, Enro = enrofloxacin, Clin = clindamycin, Gen = gentamicin, S = sensitive to all tested antimicrobials, 0 = no *S. aureus* isolated from milk sample.

by the *in vitro* disc diffusion test, 18 (90%) tested positive by PCR for the *blaZ* gene suggesting that the production of β -lactamase by most penicillin-resistant *S. aureus* of this study is encoded by the *blaZ* gene (Zscheck and Murray, 1993).

In conclusion, our study provides recent data on the distribution of antimicrobial resistance at the pilot farm of Toukounous. The massive resort to β -lactam antibiotics to treat any condition is most probably responsible for the high rate of resistance observed at the farm. Besides the resistance problem, it has also been reported that intra-

mammary infection remained significantly more often chronic if it was caused by *blaZ*-positive than *blaZ*-negative isolates of *S. aureus* (Taponen et al., 2003). It is therefore an absolute necessity to be more cautious and strict in the application of treatments with antibiotics, particularly in the use of the β -lactams.

Conflict of Interests

The authors have not declared any conflict of interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

Abdoulkarim Issa Ibrahim is a PhD student at the University of Liège (Belgium), and is supported financially by the Belgium Technical Cooperation (CTB). We are also grateful to the staff of station in Toukounous and especially to Dr Chanono Mogueza, the manager.

REFERENCES

Arshad M, Muhammad G, Siddique M, Ashrafand M, Khan HA (2006). Staphylococcal mastitis in bovines and some properties of staphylococcal isolates. *Pak. Vet. J.* 26:20-22.

Bada R, Kane Y, Issa IA, Vias FG, Akakpo AJ (2005). Bactéries associées aux mammites subcliniques dans les élevages bovins laitiers urbains et périurbains de Niamey (Niger). *Rev. Afr. Sté. Prod. Anim.* 3:119-124.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.

Ben HS, Messadi LA, Ben HA (2002). Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite. *Ann. Méd. Vét.* 147:41-47.

Bendahou A, Lebbadi M, Ennane L, Essadqui FZ, Abid M (2008). Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2:218-225.

Gebreyohannes Y, Tesfaye M, Fekadu GR, Kelay B (2009). Milk yield and associated economic losses in quarters with subclinical mastitis due to *Staphylococcus aureus* in Ethiopian crossbred dairy cows. *Trop. Anim. Health Prod.* 42:925-931.

Harouna A, Zecchini M, Locatelli C, Scaccabarozzi L, Cattaneo C, Amadou A, Bronzo V, Marichatou H, Boettcher PJ, Zanoni MG, Alborali L, Moroni P (2009). Milk hygiene and udder health in the periurban area of Hamdallaye, Niger. *Trop. Anim. Health Prod.* 41:705-710.

Issa IA, Rianatou BA, Duprez J-N, Djika M, Moula N, I Ote, Bardiau M, Mainil JG (2013). Bacterial mastitis in the Azawak zebu breed at the Sahelian experimental station in Toukounous (Niger): Identification and typing of *Staphylococcus aureus*. *Int. Res. J. Microbiol.* 4:168-178.

Kadja M, Kane Y, Tchassou K, Kaboret Y, Mainil JG, Taminiau B (2010). Typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk cows with subclinical mastitis in Dakar, Senegal. *Bull. Anim. Health Prod. Afr.* 58: 195-205.

Kateete DP, KabugoU, Baluk H, Nyakarahuka L, Kyobe S, Okee M, Najjuka CF, Joloba ML (2013). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Bacteria from Milkmen and Cows with Clinical Mastitis in and around Kampala, Uganda. *PLoS One* 8:63413-63436.

Medeiros ES, Mota RA, Santos MV, Freitas MFL, Pinheiro JW, Teles JA (2009). Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus spp.* isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesquisa. Vet. Brasil.* 29:569-574.

MRA (Ministère de Ressources Animales) (2002). Etat des ressources génétiques animales dans le monde : Rapport national de la République du Niger. URL address: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/a1250f/annexes/CountryReports/Niger.pdf>

Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM (2006). Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:450-460.

Pradeep V, Manoj K, Mohan N, Thirunavukkarasu A, Kumar SV (2003). Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from milk samples of Small holder Dairy cows in Tanzania. *J. Res. Vet. Sci.* 69:305-314.

Rabello RF, Souza CRM, Duarte RS, Lopes RMM, Teixeira LM, Castro ACD (2005). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci.* 88:3211-3219.

Radostits OR, Blood DC, Gay CC (2007). Mastitis. *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats and Horses.* 9th Edn., Bailler Tindall, London. pp. 563-614.

Statistical Analysis System Institute (SAS) (2001). SAS/STAT User's Guide. Version 9. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.

SSET (Station Sahélienne Expérimentale de Toukounous) (2009). Rapport annuel. pp 18.

Suleiman AB, Umoh VJ, Kwaga JKP, Shaibu SJ (2012). Prevalence and antibiotic resistance profiles of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from bovine mastitic milk. *Int. J. Microbiol. Res.* 2:264-270.

Taponen S, Jantunen A, Pyörälä E, Pyörälä S (2003). Efficacy of targeted 5-day combined parenteral and intramammary treatment of clinical mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta. Vet. Scand.* 44:53-62.

Werckenthin C, Cardoso M, Martel J, Schwarz 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.

Zanette E, Scapin D, Rossi EM (2010). Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. *Unesc Ciência Joaçaba* 1:65-70.

Zscheck KK, Murray BE (1993). Genes involved in the regulation of beta-lactamase production in *enterococci* and *staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1966-1970.

ERRATUM

Il est apparu suite à la défense privée que deux souches de *S. aureus* isolées en 2011 étaient résistantes à l'oxacilline et sensibles à pénicilline, ce qui s'avère scientifiquement impossible. Aussi, nous avons refait le test de l'antibiogramme sur ces deux souches pour vérification afin d'infirmer ou de confirmer les résultats précédemment obtenus. Les résultats nouvellement obtenus ont montré que ces deux souches sont, en réalité, sensibles à l'oxacilline, ce qui est scientifiquement plus logique et vient infirmer les résultats apparus dans l'article.

Par conséquent, nous avons apporté les corrections nécessaires notamment dans le « Summary », dans la section « Résultats et Discussion », et enfin, adapté « Tables 2 and 3 ».

Summary

Au niveau de la cinquième ligne, veuillez lire: « oxacillin (12%) », au lieu de « oxacillin (16%) ».

Results and Discussion

- Au niveau premier paragraphe. De la quatrième ligne à la fin du paragraphe, veuillez lire : « Twenty-two isolates (51%) were sensitive to all antibiotics tested, but 21 *S. aureus* isolates (49%) were resistant to at least one antibiotic tested: 14 in 2010 (33%), 3 in 2011 (7%) and 4 in 2012 (9%) ($p < 0.05$) », au lieu de « Twenty isolates (46%) were sensitive to all antibiotics tested, but 23 *S. aureus* isolates (54%) were resistant to at least one antibiotic tested: 14 in 2010 (33%), 5 in 2011 (12%) and 4 in 2012 (9%) ($p < 0.05$) ».
- Au niveau deuxième paragraphe:
 - a) **A la quatrième ligne.** Veuillez lire : « oxacillin (12%) », au lieu de « oxacillin (16%) »
 - b) **A la neuvième ligne.** Veuillez lire: « oxacillin (14%, 22% and 0%) », au lieu de « oxacillin (14%, 44% and 0%) ».
 - c) **A la seizième ligne:** Veuillez lire: « All but three of the 21 resistant isolates », au lieu de « All but three of the 23 resistant isolates ».

Table 2 and Table 3

Les tableaux 2 et 3 ont été modifiés afin de les adapter aux nouveaux résultats.

Lisez ces nouveaux tableaux 2 et 3 comme suit :

Table 2. Resistance profiles of the 21 *S. aureus* isolates resistant to at least one antibiotic.

RESULTATS

No. of antimicrobials	Resistance profile	No. of isolates
1	Pen	9
	Clin	1
2	Pen Oxa	2
	Pen Gen	2
	Pen Tet	1
	Pen Eno	1
3	Pen Oxa Tet	1
	Pen Oxa Tsu	1
	Pen Tet Tsu	1
	Pen Tsu Gen	1
5	Pen Oxa Gen Tsu Clin	1
Total		21

RESULTATS

Table 3. Antibiotic resistance profiles of the *S. aureus* isolates from 13 cows over three years (2010 to 2012).

Cow identification/ Year of isolation	Antibiotic resistance profile		
	2010	2011	2012
56/11	PenOxaTsuClinGen	S	0
61/11	0	PenOxaTsu	Pen
63/11	0	Clin	S
65/11and 68/11	S	0	S
66/11	S	Pen	0
70/11	PenGen	0	S
71/11	Pen	0	S
76/11	PenTetTsu	0	S
79/11	S	S	S
86/11	Pen	PenOxa	PenEnro
94/11	0	0	Pen
96/11	S	S	S

Partie 2 : Prévention

2.1. Préambule

Les résultats précédemment obtenus ont permis, dans un premier temps, de montrer une prévalence importante des vaches avec des CMT positifs au niveau de la station sahélienne expérimentale de Toukounous (SSET). Ensuite, de l'ensemble des bactéries isolées et identifiées, le genre *Staphylococcus*, particulièrement l'espèce *S. aureus*, est le pathogène majeur le plus fréquent. Enfin, non seulement un petit nombre de clones des souches de *S. aureus* sont présents dans les trois troupeaux, mais aussi certains de ces quelques clones persistent dans le temps. Ces observations ont été reliées aux pratiques de terrain présentes à la SSET.

Par exemple, au niveau de la SSET, la traite se fait de manière purement manuelle deux fois par jour, matin et soir, sans aucune application de mesures d'hygiène, avant ou après la traite, ni sur les mamelles, ni sur mains des trayeurs. De plus, si des trayeurs sont spécifiquement affectés à chaque troupeau, il est fréquent de voir certains trayeurs d'un troupeau venir en aide aux trayeurs d'un autre troupeau, lorsque ces derniers sont débordés de travail, dans un élan de solidarité. A la lumière de toutes ces informations, l'hypothèse logique est que ces comportements ont une influence sur la transmission et la persistance des bactéries mammopathogènes, en général, et des clones de *S. aureus*, en particulier.

S'il est difficile, voire impossible, de modifier la technique de traite ou les comportements solidaires des trayeurs, il est, par contre, envisageable d'instaurer l'application de mesures élémentaires d'hygiène lors de la traite. Ces mesures concernent non seulement les trayeurs, mais également les vaches en lactation. Pour les trayeurs, il s'agit, avant de commencer la traite, de se laver les mains avec de l'eau propre et, ensuite, d'appliquer une solution de Dakin (hypochlorite de sodium + permanganate de potassium). Cette opération doit être répétée entre chaque animal. En ce qui concerne les vaches, chaque trayeur doit pulvériser la mamelle, après chaque traite, avec une solution à base de la chlorhexidine. L'objectif de cette quatrième étude était donc d'évaluer l'impact de ces mesures d'hygiène sur la prévalence des vaches positives au CMT et sur l'identité des germes isolés.

2.2. Article 4: Efficacy of Antisepsis Measures during Manual Milking on the Prevalence of Bacterial Mastitis at the Sahelian Experimental Station of Toukounous (Niger).

Abdoulkarim Issa Ibrahim^{1,2*}, Rianatou Bada-Alambédji³, Jean-Noël Duprez¹, Nassim Moula⁴, Marjorie Bardiau¹, Jacques G. Mainil¹

¹Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Sart-Tilman, B43a, B-4000 Liège, Belgium

²Bacteriology, Department of Diagnosis, Epidemiological Investigations and Applied Research, BP 485, Niamey, Niger

³Microbiology, Immunology and Infectious Pathology, Interstate school of Veterinary Science and Medicine, BP 5077, Dakar, Senegal

⁴ Department of Animal Production, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Boulevard de Colonster, 20, building B43, 4000 Liege, Belgium

*Corresponding Author: Abdoulkarim Issa Ibrahim

Publié dans African Journal of Microbiology Research, 9(6): 348-354, 2015

Full Length Research Paper

Efficacy of antiseptics measures during manual milking on the prevalence of bacterial Mastitis at the Sahelian experimental station of Toukounous, Niger

Abdoulkarim Issa Ibrahim^{1,2*}, Rianatou Bada-Alambédji³, Jean-Noël Duprez¹, Nassim Moula⁴, Marjorie Bardiau¹ and Jacques G. Mainil¹

¹Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Sart-Tilman, B43a, B-4000 Liège, Belgium.

²Bacteriology, Department of Diagnosis, Epidemiological Investigations and Applied Research, BP 485, Niamey, Niger.

³Microbiology, Immunology and Infectious Pathology, Interstate school of Veterinary Science and Medicine, BP 5077, Dakar, Senegal.

⁴Department of Animal Production, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Boulevard de Colonster, 20, building B43, 4000 Liege, Belgium.

Received 6 November, 2014; Accepted 2 February, 2015

Hygiene conditions during milking are essential in dairy cattle to ensure the highest level of milk production. The aim of this work was to assess the efficacy of hygiene measures during the manual milking process with no pre- or post-milking antiseptics measure at the Sahelian experimental station of Toukounous (Niger), on the prevalence of California Mastitis Test (CMT)-positive cows, on the identity of bacterial pathogens recovered from positive milk samples and on the clonality of the *Staphylococcus aureus* isolated. The application of mammary gland washing prior to milking, of teat dipping with chlorhexidine after milking and of milkers' hand washing and disinfection with sodium hypochlorite significantly decreased the number of CMT-positive cows. However, the percentages of bacteriologically positive milk samples and the relative isolation rates of *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci did not significantly differ according to the presence/absence of antiseptics measure. As for the clonality of the *S. aureus* isolates, the 53 *S. aureus* isolated in the absence of hygiene measures belonged to 10 pulsed field gel electrophoresis (PFGE) fingerprints, while, in comparison, only five PFGE fingerprints were identified amongst the 11 *S. aureus* isolated in the presence of hygiene measures. As a conclusion, the strict application of hygiene and disinfection during hand milking at Toukounous is a major contributor to the decrease of the percentage of CMT-positive cows and, therefore, of mastitis prevalence and incidence. The reasons for the persistence of the remaining *S. aureus* after application of hygiene measures may be numerous; one of them could be that they belong to more resistant clones.

Key words: Mastitis, antiseptics, manual milking, Azawak zebu, Niger.

INTRODUCTION

Preventive measures against bovine mastitis are mainly based on milking hygiene, dry cow therapy and vacci-

nation whereas curative measures are based only on local and general antibiotic treatment. The objective of hygiene measures is to prevent not only intra-mammary infection of any cow during and between milking, but also the spread of the infection within one herd during the milking process (Neave et al., 1969; Radostits et al., 2007; Dufour et al., 2011).

The primary sources of mastitis pathogens can be infected quarters, teat ends, perineal skin, faeces and general environment (Pankey et al., 1987; Roberson et al., 1998; Radostits et al., 2007). Pre- and post-milking teat antiseptics reduces the number of contagious bacterial pathogens transferred to teats during and between milking and of environmental pathogens transferred to teat skin between milking, therefore contributing to the decrease of the incidence rate of subclinical and clinical mastitis during lactation (Pankey et al., 1983; Bramley and Dodd 1984; Oliver et al., 1990).

A variety of bactericidal antiseptics can be used for teat dipping, such as iodine, chlorhexidine, quaternary ammonium, sodium hypochlorite, dodecyl benzene sulfonic acid, chlorine, nisin, hydrogen peroxide, glycerol monolaurate, and fatty acids (Nickerson et al., 1986; Radostits et al., 2007).

In Niger, very few studies have focused on mastitis. For example in Niamey urban and peri-urban farms, the prevalence of subclinical mastitis varies between 44 and 52% and is characterized by a high prevalence of *Staphylococcus aureus*, several of them being resistant to β -lactams and tetracycline (Bada et al., 2005; Harouna et al., 2009).

This may influence the efficiency of antiseptic application since *Staphylococcus sp.*, especially *S. aureus* isolates can form biofilms on the skin and mucosal surfaces (Katsuyama et al., 2005; Moore, 2009).

At the Sahelian experimental station in Toukounous, a prevalence of 39% of mastitis is reported when applying the California Mastitis Test, or CMT (Issa et al., 2013).

Half of the bacteria from CMT-positive milk samples were contagious pathogens belonging to the genus *Staphylococcus*, 82% of them (23/28) being identified as *S. aureus*. The 23 *S. aureus* isolates belong to four Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) profiles, two of which representing 21 isolates. The other half of the bacteria isolated are environmental pathogens belonging to the genus *Enterococcus* and to the family *Enterobacteriaceae*.

Since the milking process at Toukounous is purely manual (Figure 1) with no pre- or post-milking antiseptics measure and since the four to six milkers per herd apply no hand washing or antiseptics between the cows, the objective of the present study was to assess the consequence of the application of antiseptic measures (teat

dipping and hand washing) during the milking process (i) on the prevalence of bacterial mastitis applying CMT, (ii) on the identity of bacterial pathogens recovered from CMT-positive milk samples, and (iii) on the clonality of the *S. aureus* isolates by PFGE.

MATERIALS AND METHODS

Study population

The livestock at Toukounous is essentially consisting of the Azawak zebu breed (Issa et al., 2013). The dairy cows in lactation are divided into three herds according to the level of milk production and age: "primiparous" cows, "non-elite" cows (<1400kg milk/lactation) and "elite" cows (>1400kg milk/lactation). The system of breeding is semi-extensive with feeding based on the exploitation of pasture grazing, while the watering of the animals is ad libitum during the day. The milking process of dairy cows is performed manually twice daily without any hygiene measure (Figure 1).

Hygiene measures

The protocol of hygiene measures includes two main actors of the milking process, the cow and the milker. As far as the cows are concerned, mammary gland washing was applied before the milking and teat dipping after each milking with chlorhexidine, that is active against Gram-positive and Gram-negative bacteria and also against fungi and some enveloped viruses (Hugo and Longworth, 1964; Kampf and Kramer, 2004). As for the milkers, they were asked to wash their hands with clean water and with a solution of hypochlorite of sodium before and after milking each cow. Some studies have shown that hypochlorite sodium has broad-spectrum antimicrobial activity against vegetative bacteria, bacterial spores, fungi, protozoa and viruses (Siqueira et al., 1998; McDonnell and Russell, 1999). These hygiene measures were applied for six months (July to December), respectively to the primiparous herd in 2011 and to the non-elite and elite herds in 2012.

Study design

In 2010, no hygiene measures were applied. All cows in lactation were tested by the CMT and milk samples from the CMT-positive cows were bacteriologically analysed to confirm the results already obtained in 2009 (Issa et al., 2013). In 2011, the hygiene measures were applied for six months in the primiparous herd that is 32 cows in total. At the end of this period (M6), all cows of the three herds were tested with the CMT and milk samples from the CMT-positive cows were further tested for bacterial growth. In 2012, the hygiene measures were applied for six months in the non-elite (29 cows) and elite (51 cows) herds. All cows of both herds were tested with the CMT before the application of the hygiene measures (M0), after three months (M3) and at the end of the period (M6) and, again, milk samples from the CMT-positive cows were further tested for bacterial growth. The CMT result interpretation was performed according to the NMC recommendations (1999): a quarter was considered positive when the score was (++), (+++) or (+++), negative when the score was (-), and doubtful when the score was (+).

*Corresponding author. E-mail: karimlebelge@yahoo.fr.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)



Figure 1. Illustration of manual milking at Toukounous.

Bacteriological analysis

Before sampling for bacteriological analysis, the first milk stream was discarded after which routine teat cleaning and disinfection with 70% alcohol were applied as prescribed by the National Mastitis Council (NMC, 1999). The whole bacteriological analysis procedures in Niger (Laboratory of Bacteriology, National Public Health School, Niamey) and in Belgium (University of Liège, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Infectious Diseases, Bacteriology; import permits CONT/IEC/FRT/589554 in 2010, CONT/IEC/FRT/813231 in 2012 and CONT/IEC/FRT/1016090 in 2013) have already been described (Issa et al., 2013). Briefly, bacteria were pre-identified on the basis of colony shape, presence of haemolysis on Columbia blood agar, growth on different selective agar plates, Gram staining, bacterial cell shape, catalase and peroxidase production. Final identification was performed using appropriate API tests (BioMérieux, France), except for bacilli (Reva et al., 2001).

The whole genomes of the *S. aureus* isolates were compared by PFGE after extraction and digestion with *Sma*I (Sigma-Aldrich) restriction endonuclease according to the procedure described elsewhere (Issa et al., 2013; Bardiau et al., 2014). Restricted fragments were separated through a 1% pulsed-field certified agarose (Bio-Rad) gel in 0.5% TBE buffer by using a CHEF MAPPER (Bio-Rad). The electrophoresis conditions were 6.0 V/cm for 21 h, with pulse times ranging from 5 to 60 s, an angle of 120° and a linear ramp factor. Bacteriophage lambda DNA (Bio-Rad) was used as molecular weight marker. The different PFGE profiles, or pulsotypes, were arbitrarily identified by capital letters.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with SAS Software (SAS Institute, 2001). For calculation of the statistical significance of the observed frequency distributions, contingency tables of the random expected values were determined and Chi-square tests were performed. P values lower than 0.05 were considered significant.

RESULTS

California mastitis test (CMT)

The percentages of CMT-positive cows without any application of hygiene measures were comprised between 38 and 50% in 2010 according to the herd (Table 1). These results did not significantly differ from the percentages of CMT-positive cows in 2009 (33% to 42%; $p=0.307$) (Issa et al., 2013).

The application in 2011 and 2012 of mammary gland washing prior to milking, of teat dipping with chlorhexidine after milking and of milkers' hand washing and disinfection, lead to a decrease of the % of CMT-positive cows after six months (M6): down to 18% of the primiparous cows vs. 43-50% of the non-elite and elite cows (with no hygiene measure) in 2011 ($p=0.0011$) and down to 24-20% of the non-elite and elite cows vs. 62-65% at M0 prior to the application of antisepsis measure ($p=0.001$), respectively (Table 1).

In 2012, a decrease could already be observed at M3 (41-44%) compared to M0. The longitudinal progressive reduction of the percentages of CMT-positive cows observed in 2012 at M3 and M6 following the application of hygiene measures was statistically significant ($p=0.001$).

Bacteriological analysis

All CMT-positive quarters were sampled for bacteriological analysis. Overall, the % of bacteriologically positive

Table 1. Comparison of California Mastitis Test results from 2009 to 2012 without/with application of antiseptics measures during milking (see Materials en Methods for study design).

Year	Herds	% CMT+ve cows without antiseptics (No.+ve cows/Total)	% CMT+ve cows at Mx with antiseptics(No.+ve cows/Total)
2009 (Issa et al. 2013)	Primiparous	33% (24/71)	ND
	Non-Elite	39% (29/74)	ND
	Elite	42% (51/120)	ND
2010	Primiparous	48% (19/39)	ND
	Non-Elite	50% (20/40)	ND
	Elite	38% (25/ 65)	ND
2011	Primiparous*	ND	M6: 18% (6/32)
	Non-Elite	ND	M6: 50% (24/48)
	Elite	ND	M6: 43% (19/44)
	Primiparous	ND	ND
2012	Non-Elite*	65% (19/29)	M3: 44% (13/29) M6: 20% (6/29)
	Elite*	62% (32/51)	M3: 41% (21/51)
			M6: 24% (12/51)

*Herds with application of antiseptics measures (see Materials and Methods). ND, Not done.

milk samples with no application of hygiene measure in 2009 and 2010 did not differ significantly ($p=0.148$) (Table 2). There was no significant difference either in the percentage of bacteriologically positive milk samples according to the presence/absence of antiseptics measure in 2011 and 2012 ($p=0.1080$).

Globally, the genus *Staphylococcus* was the most frequently identified in the 160 bacteriologically positive milk samples, including those of 2009 (Table 2): 64 *S. aureus* (40%) and 58 CNS (36%) (Table 2). The isolation rates of *S. aureus* were not significantly different between 2009 and 2010 ($p=0.70$) (Table 3), and also did not differ according to the presence/absence of antiseptics measure in 2011 and 2012 ($p=0.4391$). However, the isolation rates of CNS were significantly different between 2009 and 2010 ($p=0.0001$), but the difference was not significant according to the presence/absence of antiseptics measure in 2011 and 2012 ($p=0.1969$).

Some variation in the isolation rates of *S. aureus* and CNS in each of the three herds were also observed according to the presence/absence of antiseptics along the four years (Table 3), but none of them was statistically significant: in the primiparous herd, the isolation rates of *S. aureus* were 25% (1 positive sample/4 samples) in the presence of antiseptics vs. 16% (4/25) in its absence ($p=0.5526$) and of CNS, 50% (2/4) vs. 24% (6/25) ($p=0.2361$); in the non-elite herd, the isolation rates of *S. aureus* were 33% (3/9) vs. 39% (20/51) ($p=0.7379$) and of CNS, 55% (5/9) vs. 49% (25/51) ($p=0.4821$); and in the elite herd, the isolation rates of *S. aureus* were 50% (7/14) vs. 51% (29/57) ($p=0.9531$) and of CNS, 28% (4/14) vs. 28% (16/57) ($p=1$).

Pulsotypes

In the absence of hygiene measures in the three herds, the 23 *S. aureus* isolates in 2009 belonged to four pulsotypes (Issa et al., 2013) and the 10 *S. aureus* isolates in 2010 to five pulsotypes (Table 4). Still in the absence of hygiene measures in the non-elite and elite herds, the 8 *S. aureus* isolates in 2011 belonged to four pulsotypes and the 12 *S. aureus* isolates in 2012 to five pulsotypes (Table 4). In summary, in the absence of hygiene measures, these 53 *S. aureus* isolates belonged to 10 pulsotypes. In comparison, only five pulsotypes were identified amongst the 11 *S. aureus* isolated in the presence of hygiene measures in the primiparous herd in 2011 and in the non-elite and elite herds in 2012 (Table 4). Ten of these *S. aureus* belonged to four pulsotypes also detected amongst the 53 *S. aureus* isolated in the absence of hygiene measure (Table 4).

DISCUSSION

In this study, the application of hygiene measures at the experimental station of Toukounous, that is pre-milking washing and post-milking disinfection with chlorhexidine of the udder and milkers' hand washing and disinfection with sodium hypochlorite, contributes to a significant two- to three-fold reduction of the % of CMT-positive cows after 3 and 6 months, compared to the % observed between 2009 and 2012 in the herds with no antiseptics policy or prior to the application of the antiseptics policy. The effectiveness of disinfection of the udder with chlorhexidine in preventing mastitis especially by conta-

Table 2. Comparison of bacteriological analysis results from CMT-positive quarters from 2009 to 2012 without/with application of antiseptis measures during milking (see Materials en Methods for study design).

Year	Herds	% bacteria +ve milk samples without (M0)/ with (M3; M6) antiseptis	Bacterial species identified (No.)
2009 (Issa et al., 2013)	Primiparous	M0: 40 % (20/25)**	<i>S. aureus</i> (2), CNS (1), <i>Bacillus sp.</i> (2), GNB (14), <i>Enterococcus sp.</i> (6)
	Non-Elite	M0: 62% (10/32)***	<i>S. aureus</i> (7), CNS (1)
	Elite	M0: 38% (21/55)**	<i>S. aureus</i> (14), CNS (3), <i>Bacillus sp.</i> (3), <i>Enterococcus sp.</i> (1)
2010	Primiparous	M0: 26%(5/19)**	<i>S. aureus</i> (2), CNS (5)
	Non-Elite	M0: 65% (13/20)**	<i>S. aureus</i> (5), CNS (7), GNB (1)
	Elite	M0: 16% (4/25)	<i>S. aureus</i> (3), CNS (1)
2011	Primiparous*	M0: ND M6: 67% (4/6)	NR <i>S. aureus</i> (1), CNS (2), <i>Ent. sp.</i> (1)
	Non-Elite	M0: ND M6: 54% (13/24)	NR <i>S. aureus</i> (4), CNS (8), <i>Bacillus sp.</i> (1)
	Elite	M0: ND M6: 57% (11/19)	NR <i>S. aureus</i> (4), CNS (5), <i>Bacillus sp.</i> (2)
2012	Primiparous	ND	NR
	Non-Elite*	M0: 78% (15/19) M3: 46% (6/13) M6: 50% (3/6)	<i>S. aureus</i> (4), CNS (9), <i>Bacillus sp.</i> (2) <i>S. aureus</i> (2), CNS (4) <i>S. aureus</i> (1), CNS (1), <i>Bacillus sp.</i> (1)
	Elite*	M0: 65% (21/32) M3: 47% (10/21) M6: 33% (4/12)	<i>S. aureus</i> (8), CNS (7), <i>Bacillus sp.</i> (3), GNB (3) <i>S. aureus</i> (4), CNS (4), <i>Bacillus sp.</i> (1), <i>Micrococcus sp.</i> (1) <i>S. aureus</i> (3), <i>Bacillus sp.</i> (1)

*Herds with application of antiseptis measures (see Materials and Methods); **Samples with two bacterial isolates; *** Two samples with positive bacteriological cultures in which isolates were lost after import; ND, not done; NR, not relevant; CNS, coagulase-negative staphylococci; GNB, gram-negative bacilli.

gious bacterial mammary pathogens such as *S. aureus* or *Streptococcus agalactiae*, has of course already been published (Pankey et al., 1983; Hicks et al., 1981; Gleeson et al., 2006). Since ca. 75% of the mammary gland pathogens in the three herds at the experimental station of Toukounous belong to the gender *Staphylococcus* (Table 2), a dramatic decrease of the frequency of CMT-positive cows like observed in 2011 and 2012 (Table 1) was expected. Still, although the prevention measures were identical in the three herds during this study, the percentages of CMT-positive cows were higher in the elite and non-elite herds than in the primiparous herd, most probably because the teat canal becomes expanded after each lactation, predisposing older cows to mastitis (Oaki, 1990).

Last but not least, chlorhexidine residues in milk after teat dipping or spraying have been demonstrated to be as low as to represent no harm to consumers. Therefore the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products considers that there is no need to establish a Minimal Residue Limit (MRL) for chlorhexidine in dairy farms, a positive conclusion for developing countries

(EAEMP, 1996).

Though the hygiene of the udder is of the upmost importance, when manual milking is performed, the hand hygiene of the milkers is also an important component to ensure a low frequency of mastitis. Hand washing with water followed by disinfection with sodium hypochlorite before and after milking undoubtedly helped to reduce the number of CMT-positive cows in this study. There is now evidence that strict adherence to hand hygiene reduces the risk of cross-transmission of infections by eliminating transient or resident flora and the best results are obtained when washing is applied first and disinfection afterwards (Rotter, 1996; Mathur, 2011).

Conversely, the application of the hygiene measures had no effect on the relative % of the different bacteria isolated and identified, with *S. aureus* and CNS remaining the most frequent pathogens, as they are in the absence hygiene measures or prior to their application (Tables 2 and 3). Together they represent more than 3 out of 4 bacteria isolated from the CMT-positive milk samples. In the same previous two studies conducted in Niger, the frequency of isolation is similar for *S. aureus*

Table 3. Comparison of the isolation rates of *S. aureus* and CNS from bacteriologically positive milk samples according to the year (2009 to 2010) and to the presence/absence of antiseptics measure in 2011 and 2012.

Year	Herds	Antiseptics	% <i>S. aureus</i> in the bacteriologically positive milk samples	% CNS in the bacteriologically positive milk samples
2009*	Primiparous	Absence	10% (2/20)**	5% (1/20)
	Non-Elite	Absence	70% (7/10)	10% (1/10)
	Elite	Absence	66% (14/21)	14% (3/21)
2010	Primiparous	Absence	40% (2/5)	100% (5/5)
	Non-Elite	Absence	38% (5/13)	54% (7/13)
	Elite	Absence	75% (3/4)	25% (1/4)
2011	Primiparous	Presence	25% (1/4)	50% (2/4)
	Non-Elite	Absence	31% (4/13)	61% (8/13)
	Elite	Absence	36% (4/11)	45% (5/11)
2012	Non-Elite	Absence	26% (4/15)	60% (9/15)
		Presence	33% (3/9)	55% (5/9)
	Elite	Absence	38% (8/21)	33% (7/21)
		Presence	50% (7/14)	28% (4/14)

*Issa et al. (2013); ** (No. positive samples/ No. bacteriologically positive samples).

Table 4. Comparison of the pulsotypes of the *S. aureus* isolates according to the year and to the implementation or not of hygiene measures.

Pulsotype	2009*		2010		2011		2012	
	No hygiene measure (n=23)	No hygiene measure (n=10)	No hygiene measure (n=8)	Hygiene measure (n=1)	No hygiene measure (n=12)	Hygiene measure (n=10)		
A	13	4	1				1	1
B	8	2	2				5	5
C	1							
D	1	2					4	3
E								1
F							1	
G							1	
N			4	1				
P		1						
R			1					
Z		1						

*Issa et al. (2013).

(36 and 44%), but lower for CNS (22 and 16%) (Bada et al., 2005; Harouna et al., 2009). Nevertheless the common result of those surveys in different farming systems in Niger is that *S. aureus* is the most frequent mammopathogen bacterial species in Niger.

Some of the bacteriological results nevertheless demand further explanations: the rates of CMT-positive and of bacteriologically positive milk samples, and of isolation of staphylococci highly decreased but never reached the nil percentage; the relative percentages of *S. aureus* and CNS isolated during the four years of the study vary between the three herds as much in presence than in absence of antiseptics measures; and most

percentages of *S. aureus* and CNS isolates even increase in the presence of hygiene measures. All three observations can be explained by: (i) the staphylococci, more especially CNS are ubiquitous on the bovine udder and in the cow environment providing a permanent source of bacteria that come in contact with the teat skin between the milking periods, when the biocidal activity of chlorhexidine has decreased (Pankey et al., 1984); (ii) many staphylococci can form biofilms not only in infected organs, but also on the skin, therefore becoming not accessible to antiseptics (Katsuyama et al., 2005; Moore, 2009); (iii) some *Staphylococcus* species and some *S. aureus* clones may better persist despite the application

of antiseptics measures, as evidenced by the PFGE results (Table 4), and additional studies are right now being conducted to compare the virulotypes of the *S. aureus* isolated at Toukounous before and after the implementation of hygiene measure; and/or (iv) the sizes of the some samples are small causing the % to vary a lot in function of the numbers of positive samples (Table 3).

As a conclusion, the results obtained by this study confirm that the strict application of hygiene and disinfection during hand milking is a major contributor to the significant decrease of the % of CMT-positive cows and, therefore, of mastitis prevalence and incidence, especially. Such results are encouraging, but a study based on the application of hygiene measures on a long-term could lead to even more conclusive results. These results can now be explained to farmers and milkers to ensure not only their willingness to pursue the procedure for a more efficient and higher quality milk production at Toukounous, but also its extension to private farms in other areas of Niger.

Conflict of interest

The authors did not declare any conflict of interest

ACKNOWLEDGEMENTS

Abdoukarim Issa Ibrahim is a PhD student at the University of Liège (Belgium), and is supported financially by the Belgium Technical Cooperation (CTB). We are also grateful to the staff of station in Toukounous and especially to Dr Chanono Mogeza, the manager.

REFERENCES

Bada-Alambedji R, Kane Y, Issa IA, Vias FG, Akakpo AJ (2005). Bactéries associées aux mammites subcliniques dans les élevages bovins laitiers urbains et périurbains de Niamey (Niger). *Rev. Afr. Sté. Prod. Anim.* 3:119-124.

Bardiau M, Detilleux J, Farnir F, Mainil JG, Ote I (2014). Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 169:74-79.

Bramley A, Dodd PH (1984). Reviews of the progress of dairy science: mastitis control-progress and prospects. *J. Dairy. Res.* 51:481-512.

Dufour S, Fréchette A, Barkema HW, Mussell A, Scholl DT (2011). Invited review: Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. *Dairy Sci.* 94:563-579.

EAEMP (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (1996). Committee for veterinary medicinal products: Chlorhexidine. URL address: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=search.jsp&q=CHLORHEXIDINE&btnG=Search&mid=WC0b01ac05800644da>.

Gleeson DE, Meaney WJ, O'Callaghan EJ, O'Brien B (2006). Effect of omitting post-milking teat disinfection on the mastitis infection rate of dairy cows over a full lactation. *Vllth Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, Antalya, Turkey.

Harouna A, Zecchini M, Locatelli C, Scaccabarozzi L, Cattaneo C, Amadou A, Bronzo V, Marichatou H, Boettcher PJ, Zanoni MG,

Alborali L, Moroni P (2009). Milk hygiene and udder health in the periurban area of Hamdallaye, Niger. *Trop. Anim. Health. Prod.* 41:705-710.

Hicks WG, Kennedy TJ, Keister DM, Miller ML (1981). Evaluation of a teat dip of chlorhexidine digluconate (5%) with glycerin (6%). *J. Dairy. Sci.* 64:22-66.

Hugo WB, Longworth AR (1964). Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J. Pharm. Pharmacol.* 16:655-662.

Issa I A, Rianatou BA, Duprez J-N, Djika M, Moula N, Ote I, Bardiau M, Mainil JG (2013). Bacterial mastitis in the Azawak zebu breed at the Sahelian experimental station in Toukounous (Niger): Identification and typing of *Staphylococcus aureus*. *Int. Res. J. Microbiol.* 4:168-178.

Kampf G, Kramer A (2004). Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:863-893.

Katsuyama M, Ichikawa H, Ogawa S, Ikezawa Z (2005). A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. *J. Dermatol. Sci.* 38:197-205.

Mathur P (2011). Hand hygiene: back to the basics of infection control. *Indian. J. Med. Res.* 134:611-620.

McDonnell G, Russell AD (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:147-179.

Moore GE (2009). Biofilm Production by *Streptococcus uberis* Associated with Intramammary Infections. University of Tennessee Honors Thesis Projects. URL address : http://www.trace.tennessee.edu/utk_chanhonoproj/129.

National Mastitis Council (1999). Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Revised edn., Madison, Wisconsin. pp. 1-30.

Neave FK, Dodd FH, Kingwill RG, Westgarth DR (1969). Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J. Dairy. Sci.* 52:696-707.

Nickerson SC, Watts JL, Boddie RL, Pankey JW (1986). Evaluation of 0.5% and 1% iodophor teat dips on commercial dairies. *J. Dairy. Sci.* 69:1693-1698.

Oaki I (1990). Diurnal variation in count and composition of somatic cell in milk and characteristics related to infection mastitis, in: International Symposium Bovine Mastitis, National Mastitis Council, Indianapolis. 13-16 September, pp. 412-418.

Oliver P, King H, Lewis MJ, Torre PM, Matthews KR, Dowle HH (1990). Efficacy of chlorhexidine as a postmilking teat disinfectant for the prevention of bovine mastitis during lactation. *J. Dairy Sci.* 73:2230-2235.

Pankey JW, Eberhart RJ, Cuming AL, Daggett RD, Farnsworth RJ, McDuff CK (1984). Uptake on postmilking teat antiseptics. *J. Dairy. Sci.* 67:1336-1353.

Pankey JW, Philpot WN, Boddie RL, Watts JL (1983). Evaluation of nine teat dip formulation Under experimental challenge to *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *J. Dairy. Sci.* 66:161-167.

Pankey JW, Wildman EE, Drechsler PA, Hogan JS (1987). Field trial evaluation of premilking teat disinfection. *J. Dairy. Sci.* 70:867-872.

Radostits OR, Blood DC, Gay CC (2007). Mastitis. *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats and Horses.* 9th Edn., Baillier Tindall, London. pp. 563-614.

Reva ON, Sorokulova IB, Smirnov VV (2001). Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1361-1371.

Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE (1998). Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in Dairy Heifers at First Parturition. *J. Dairy. Sci.* 81:687-693.

Rotter M (1996). Procedures for hand hygiene in German-speaking countries. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin . Int. J. Occup. Environ. Med.* 199:334-349.

Siqueira JF, Batista MMD, Fraga RC, Uzeda M (1998). Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J. Endodon.* 24:414-416.

Statistical Analysis System Institute (2001). SAS/STAT User's Guide. Version 9. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.

**DISCUSSION
GENERALE**

Le Niger est un pays à vocation essentiellement agropastorale et l'élevage est une activité traditionnelle pratiquée par plus de 87% de la population, soit en tant qu'activité principale soit comme activité secondaire. Le sous-secteur de l'élevage contribue à plus de 11% dans la constitution du PIB national et à plus de 25% du budget des ménages. Cette activité participe à la lutte contre la pauvreté et contre l'insécurité alimentaire permanente et contribue à assurer un apport en protéines animales indispensables au bien-être de la population. Parmi les productions animales, le lait occupe une place de choix. Selon un rapport de la FAO, la consommation de cette denrée a drastiquement chuté au Niger entre 1960 et 1999, passant de 107 litres en moyenne par personne à 27 litres, malgré un effectif pléthorique de bovins estimé à 7 336 088 têtes (RGAC, 2008). La production nationale en lait ne couvre, en fait, que 50% des besoins de la population (RECA, 2010).

Pourtant, il existe une diversité de ressources génétiques bovines au Niger. En effet, cinq races bovines sont rencontrées: les races zébus Azawak, Djelli, Goudali et M'Bororo et la race taurine Kouri. Les performances de production laitière de ces races locales sont, cependant, très faibles comparées à celles des vaches européennes. Par exemple, la race Azawak produit en élevage extensif 7 à 8 litres/jour ; la race M'Bororo, 2 litres/jour ; et la race Djelli, 2 à 3 litres/jour. La race Azawak apparaît donc clairement comme la meilleure productrice laitière au Niger car, selon les conditions d'élevage, la quantité de lait produite peut atteindre jusqu'à 12 litres/jour. Cette production plus élevée est liée au fait que cette race a fait l'objet d'une sélection génétique à la station de Toukounous des années durant.

La station sahélienne expérimentale de Toukounous (SSET) est située dans une zone pastorale au Niger, ce qui lui offre l'atout particulier de disposer d'un fourrage naturel de qualité et dispose d'une clôture complète qui la rend difficile d'accès aux autres animaux. Un autre atout est l'utilisation rationnelle des cinq parcelles, qui permet aux animaux de disposer du pâturage à temps plein tout au long de l'année. Une étude sur le peuplement floristique du pâturage de la station de Toukounous rapporte que la production du parcours est en moyenne de 2733 kg MS à l'hectare avec une valeur pastorale pouvant atteindre 87,5% (Saidou *et al.*, 2010). Par ailleurs, grâce à la coopération bilatérale entre la Belgique et le Niger, la station de Toukounous a bénéficié d'un appui important à travers le "Projet Azawak" entre 2000 et 2008. Ce projet a permis de diffuser 1800 géniteurs auprès des éleveurs à travers le pays. En

plus, 100 géniteurs ont été rétrocedés au Burkina Faso, au Mali, en Côte d'Ivoire et au Nigéria, ce qui dénote l'importance de cette race au niveau de l'Afrique Occidentale.

Malgré son apport inestimable dans l'économie du Niger, le sous-secteur de l'élevage est de plus en plus confronté à de graves difficultés, notamment la persistance de certaines maladies animales, la faible productivité des animaux et l'insignifiance des investissements tant publics que privés. Au Niger, l'un des grands défis de l'élevage, en général, et de la filière de production laitière en particulier est la persistance de maladies infectieuses et parasitaires, qui plombent la performance des animaux. C'est à ce juste titre que cette étude s'est intéressée aux mammites qui sont des maladies récurrentes dans les élevages laitiers, y compris dans les stations expérimentales comme celle de Toukounous. Les données sur les mammites au Niger n'apparaissent, cependant, que dans les rapports annuels des services décentralisés de l'élevage et se limitent à l'enregistrement du nombre de cas traités, sans aucune précision sur la nature du germe en cause. En outre, le nombre de cas rapportés de mammites est ridiculement faible. Par exemple, dans le rapport de 2007 fourni par le Ministère de l'Elevage et des Industries Animales, seulement 134 cas de mammites ont été enregistrés sur l'ensemble du territoire national, malgré le cheptel bovin dont dispose le pays. Et le même constat peut être effectué au niveau de la SSET. Dans le rapport de 2009, il est précisé que seulement deux cas de mammites ont été enregistrés. Cette situation, dans son ensemble, est difficile à admettre et la question est de savoir si les mammites sont bien diagnostiquées au Niger ? L'éloignement par rapport aux zones pastorales des services vétérinaires de proximité qui n'arrivent pas à couvrir l'ensemble du pays (OIE, 2008) et l'absence des moyens adéquats de diagnostic au niveau des laboratoires régionaux peuvent expliquer, en partie, ces faibles nombres de cas rapportés de mammites au niveau national, mais pas ceux d'un élevage à vocation de production de lait comme celui de Toukounous. Une deuxième raison serait le fait que les mammites sévissent davantage chez les vaches ayant des productions laitières plus élevées que celles des races locales au Niger, qui seraient ainsi moins sujettes aux mammites. En effet, une étude menée en Algérie a montré que la prévalence des vaches présentant un CMT positif est plus élevée chez les vaches qui produisent plus de dix litres de lait/jour (Saidi *et al.*, 2001). Mais avec l'exemple de la SSET, où il y a un bon ratio entre le nombre d'animaux et le personnel soignant (vétérinaire et para-vétérinaire), une troisième explication serait que les mammites se développent dans la plupart de cas de manière insidieuse, sub-clinique et chronique, alors que

les méthodes de diagnostic se limitent habituellement à l'observation visuelle des signes cliniques lors de mammites aiguës.

A travers l'objectif général de cette étude, il s'est agi de rechercher les bactéries impliquées dans les mammites au niveau de la SSET dans les troupeaux de vaches en lactation. Les objectifs spécifiques étaient, donc, les suivants : évaluer la prévalence des vaches en lactation positives au CMT ; effectuer l'inventaire des différents agents étiologiques des mammites ; réaliser la caractérisation des espèces bactériennes les plus fréquemment isolées ; et proposer une stratégie idoine de contrôle de cette infection via l'application de mesures d'hygiène au cours de la traite manuelle.

L'année 2009 a été la ligne de base de cette étude pour évaluer la prévalence des mammites via l'application du « Californian Mastitis Test » (CMT) et pour identifier les bactéries responsables dans le but d'orienter de manière plus spécifique nos travaux. C'est ainsi qu'au cours de cette année 2009, toutes les vaches en lactation des trois troupeaux, à savoir « élites », « non-élites » et « primipares », ont été testées au CMT. Les résultats obtenus à partir de 265 vaches, dont 120 élites, 74 non-élites et 71 primipares, montrent une prévalence globale de 39% des vaches positives au test, et des prévalences selon le troupeau de 42%, 39% et 33%, respectivement, alors qu'aucune mammite clinique n'a été diagnostiquée. La prévalence des vaches positives au CMT à la SSET est ainsi proche des résultats précédemment obtenus au Niger en 2005 et en 2009 respectivement 44% et 52% dans les élevages urbains et périurbains de Niamey (Bada *et al.*, 2005 ; Harouna *et al.*, 2009). La situation est aussi globalement identique à celle existant dans les autres pays de l'Afrique Occidentale. Au Sénégal, la prévalence des mammites subcliniques varie entre 55% et 69% dans les élevages intensifs (Shyaka, 2007 ; Tchassou, 2009), alors qu'elle est de 46% dans les élevages semi-intensifs (Konté, 2003). Au Bénin, la prévalence des mammites subcliniques est de 45% (Kadja, 2011).

Les analyses bactériologiques de tous les échantillons de lait des quartiers positifs au CMT de 104 vaches, soit 112 échantillons au total, ont été réalisées à l'Ecole Nationale de Santé Publique (ENSP) de Niamey, Niger. Ce laboratoire, dont la mission première est l'initiation des étudiants à la bactériologie n'a pas une vocation de recherche, mais était la seule alternative possible pour le début de cette étude. Le Niger dispose aussi d'un Laboratoire

Central d'Élevage (LABOCEL), doté d'un service de bactériologie, mais non fonctionnel. Au terme des analyses bactériologiques, 55 souches bactériennes ont été identifiées dont la moitié (51%) appartiennent au genre *Staphylococcus*, avec 42% de *S. aureus* et 9% de staphylocoques à coagulase négative. Les autres bactéries isolées ont été identifiées au genre *Enterococcus* (13%), à la famille des *Enterobacteriaceae* (25%), au genre *Acinetobacter* (2%) et, enfin, au genre *Bacillus* (9%). En 2009, la répartition des bactéries selon les trois troupeaux révèle que la majorité des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* a été isolée du troupeau des primipares et que la majorité des *S. aureus* (21/23) l'a été des troupeaux des multipares, à savoir les élites et les non-élites. Les infections des primipares pourraient être liées à la méthode de gestion des troupeaux mise en place à la station mais également du moment de la réalisation de notre étude. En effet, à la SSET, l'essentiel des mises-bas se passent au cours des mois de mai et juin qui coïncident avec les premières pluviométries, afin de faire mieux profiter les vaches de l'herbe verte. Comme notre étude s'est déroulée vers la fin de cette saison des pluies, il est probable que les primipares étaient déjà infectées au moment de notre passage. Toutefois, l'infection pourrait avoir comme source "la maternité", lieu où toutes les vaches de la station mettent bas. Ce court séjour à la maternité avant que chaque vache ne regagne son troupeau, pourrait être le point de départ des infections des primipares. On retiendra alors une forte fréquence des bactéries contagieuses, particulièrement *S. aureus* (41,8%) par rapport aux bactéries de l'environnement à la station de Toukounous. Cette fréquence de *S. aureus* est légèrement supérieure à celle rapportée au niveau des élevages urbains et périurbains de Niamey, où se concentrent les bassins laitiers qui alimentent les unités laitières. En effet, dans ces élevages, la fréquence de *S. aureus* a été respectivement de 36% en 2005, et 32% en 2009 (Bada *et al.*, 2005 ; Harouna *et al.*, 2009). Des fréquences supérieures ou encore inférieures à celle que nous avons obtenue ont été rapportées dans différents pays en Afrique. Ainsi, la fréquence des mammites à *S. aureus* est de 43% au Sénégal, 30% en Algérie, 28% en Ethiopie (Tchassou, 2009 ; Abera *et al.*, 2011 ; Assnoute *et al.*, 2012).

Les mammites subcliniques à *S. aureus* sont une préoccupation mondiale de nos jours. En effet, à travers le monde, ce germe pathogène continue à induire des pertes au niveau des producteurs laitiers notamment liées à la baisse du niveau de production de lait, aux frais de pénalité à l'achat du lait (dans les pays où des normes sont appliquées) et aux coûts du traitement. Par exemple, les infections subcliniques à *S. aureus* entraînent des pertes de

production de 25% à 48% (Gebreyohannes *et al.*, 2009). En plus, en cas de traitement, les taux de guérison sont généralement faibles (Brouillette *et al.*, 2004), l'une des causes des échecs thérapeutiques étant la résistance de *S. aureus* aux différents antibiotiques utilisés dans le traitement ou la prévention. Malheureusement au Niger, il n'existe pas de telles études qui rapportent les pertes financières engendrées par les mammites. Plusieurs raisons peuvent l'expliquer. Une première raison est l'absence de perception de la réalité du problème des mammites sub-cliniques vu l'absence de signes cliniques et, donc, l'impossibilité de faire un diagnostic visuel. D'autre part, l'achat du lait par les industriels laitiers est basé uniquement sur deux critères : le test d'acidité et la vérification de l'ajout de l'eau. De plus, ces industriels ont plus que jamais besoin de la production locale pour s'affranchir de l'importation du lait en poudre. Une étude rapporte, en effet, que 90% de la matière première utilisée par les unités laitières modernes de transformation au Niger sont du lait en poudre (Vias et Renault, 2009).

Au Niger, les antibiotiques sont bien utilisés dans les traitements de diverses maladies, mais aucune utilisation n'a été constatée dans le cadre du traitement ou de la prévention des mammites à la SSET pendant la durée de l'étude. Les résultats des profils de résistances aux antibiotiques obtenus entre 2009 et 2012 sur les 122 souches de *S. aureus*, dont 66 souches dans l'étude 1 et 2 et 56 souches non publiées, montrent un taux moyen de résistance plus élevé avec les antibiotiques de la famille des β -lactamines, 41% à la pénicilline et 7% à l'oxacilline (souches MRSA). Cependant, aucune des souches résistantes l'oxacilline ne possède le gène *mecA*, qui code pour la production de la protéine PLP2a à l'origine de cette résistance dans de nombreuses souches MRSA. Bien que plusieurs variants alléliques du gène *mecA* existent (Monecke *et al.*, 2012), la PCR utilisée au cours de l'étude permet de détecter l'ensemble de ces variants pour *S. aureus*. Il se pourrait, cependant, que cette résistance à l'oxacilline soit liée au gène *mecC* qui n'est pas détecté par la PCR *mecA* mais qui n'a pas été recherché (Garcia-Alvarez *et al.*, 2011 ; Becker *et al.*, 2014). D'autre part, des mécanismes de résistance de bas niveaux ont été décrits chez certaines souches de *S. aureus*. Il s'agit particulièrement des souches BORSA (BORderline *S. aureus*) et MODSA (MODified *S. aureus*). Ces souches BORSA et MODSA ne possèdent, en effet, pas le gène *mecA* (Chambers *et al.*, 1997). Cependant, une hyperproduction de la pénicillinase staphylococcique est à l'origine du mécanisme de résistance pour les souches BORSA, alors qu'il s'agit d'une modification des protéines PLP endogènes (PLP1, 2 ou 4), sans production de pénicillinase, qui est responsable de la résistance pour les souches MODSA (Eveillard, 2007). La

comparaison des résultats de l'antibiogramme sur les souches nigériennes à ceux obtenus dans d'autres pays montre que la résistance de *S. aureus* à la pénicilline y est plus fréquente : 54% au Sénégal, 64% en Tunisie et 100% en Uganda (Ben Hassen *et al.*, 2002; Kadja *et al.*, 2010 ; Kateete *et al.*, 2013). Quant à la fréquence de la résistance à l'oxacilline, elle est comparable à plus élevée dans des pays d'Afrique de l'ouest : 7,6 % au Nigéria et 10% au Sénégal ; ou encore en Afrique du Nord : 15% au Maroc (Bendahou *et al.*, 2008; Kadja *et al.*, 2010; Suleiman *et al.*, 2012). En ce qui concerne les autres antibiotiques testés, les taux de résistance est inférieur à 5% pour la clindamycine, l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole et l'enrofloxacin, mais il est de 11% tant pour la tétracycline que pour la gentamicine. L'étude de l'antibiorésistance des souches de *S. aureus* isolées des élevages urbains et périurbains réalisée en 2005 au Niger ne rapporte aucune résistance à la gentamicine, au triméthoprim-sulfaméthoxazole ou à la tétracycline, résultats probablement liés à un moindre recours aux antibiotiques dans ces types d'élevages (Bada *et al.*, 2005). Cependant, lors d'une autre étude en 2009, la résistance à la tétracycline était de 15%, (Harouna *et al.*, 2009), antibiotique largement utilisé sur le terrain au Niger.

Ces résultats bruts de sensibilité/résistance sont, cependant, à relativiser dans le cadre des mammites. En effet, les valeurs critiques utilisées pour classer les souches en sensibles, intermédiaires et résistantes n'ont alors finalement que très peu de valeur d'un point de vue thérapeutique. En effet, pour avoir une réelle chance de guérison, l'antibiotique doit atteindre le site de l'infection avec une concentration identique à celle contenue dans le disque correspondant. Les diamètres des zones d'inhibition sont calculés pour établir des posologies recommandées pour l'homme par voie systémique, et non chez les bovins, encore moins lors de l'utilisation par voie diathétique des antibiotiques (Durel *et al.*, 2003). En conséquence, seuls quelques antibiotiques disposent de critères d'interprétation spécifiques ou transposables à l'espèce bovine et très peu concernent les infections de la glande mammaire (CSLI, 2002). La pirlimycine et l'association pénicilline-novobiocine sont deux exemples pour lesquels il existe des valeurs critiques spécifiquement applicables au traitement des mammites bovines en cours de lactation, d'étiologie staphylococcique (*S. aureus*) ou streptococcique (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* et *S. uberis*) (CSLI, 2002). Ainsi, il est préférable dans l'interprétation des résultats d'un antibiogramme que le praticien puisse prendre en compte un certain nombre de paramètres complémentaires, notamment la cinétique de la molécule et sa capacité de concentration dans les tissus mammaires. Néanmoins, l'antibiogramme s'avère

aussi un outil capital en épidémiologie dans le cadre des programmes nationaux de surveillance. Il est tout aussi important lors de mammites contagieuses, particulièrement celles provoquées par *S. aureus*, dans lesquelles peu de souches différentes circulent dans le troupeau.. Ainsi, le caractère sensible ou résistant peut être considéré comme constant et le test d'antibiogramme réalisé sur quelques isolats peut être généralisé, avec les limitations expliquées ci-dessus, à l'échelle de l'exploitation, comme à Toukounous. Toutefois, l'extrapolation de ces résultats à l'échelle des élevages urbains et périurbains de Niamey n'est possible qu'en tenant compte de deux paramètres essentiels supplémentaires : tout d'abord, il faut que les mêmes familles d'antibiotiques soient utilisées ; ensuite, il faut que l'on retrouve dans ces élevages urbains et périurbains des vaches ayant connu plusieurs lactations à la SSET, qui peuvent ainsi propager les mêmes clones bactériens.

Les grands défis qui se posent pour le futur sont, donc, les suivants : diminuer l'utilisation d'antibiotiques à long terme et l'incidence de l'infection dans l'exploitation par une prophylaxie appropriée ; connaître davantage les caractéristiques des relations entre le profil génétique et/ou phénotypique et la capacité des souches à entraîner une mammite subclinique plutôt que clinique et à persister au niveau du pis.

En théorie, la prophylaxie des mammites est simple, puisque les modes d'infection et de transmission sont connus. En effet, *S. aureus* a pour origine la peau de la mamelle et se transmet d'un quartier à un autre ou d'un animal à un autre lors du processus de la traite par le matériel ou les mains du trayeur. L'instauration de mesures d'hygiène lors du processus de traite, surtout manuelle, est donc un facteur déterminant pour diminuer la prévalence et l'incidence de l'infection. Les résultats auxquels nous sommes parvenus le confirment. Par exemple, les prévalences des vaches positives au CMT qui étaient respectivement de 62% (32/51) et 65% (19/29) dans les troupeaux des vaches « élites » et « non-élites » sont passées à 41% (21/51) et 44% (13/29) après trois mois d'application des mesures d'hygiène, puis à 24% (12/51) et 20% (6/29) après six mois. Cependant, ces résultats sont à relativiser par rapport au contexte dans lequel l'étude a été réalisée à Toukounous. L'étude aurait été plus pertinente en constituant un groupe témoin dans chacun des deux troupeaux lors de l'application des mesures d'hygiène. Mais les contraintes du terrain, notamment l'absence de pertinence de l'étude aux yeux des trayeurs et la difficulté d'imposer un ordre de traite en commençant par le lot témoin, sans parler des mouvements possibles des trayeurs entre les

deux troupeaux, nous ont amené à suivre une méthode consensuelle moins rigoureuse, mais quand même efficace afin de juger de l'impact de l'application de ces mesures d'hygiène. En prenant en compte les résultats de CMT en 2009, 2010 et 2011 chez les élites et les non-élites qui correspondent aux années pendant lesquelles les mesures d'hygiène n'étaient pas appliquées dans ces troupeaux, on note une différence significative par rapport à ceux obtenus après six mois d'application des mesures d'hygiène dans ces mêmes troupeaux en 2012. Parallèlement, en comparant les résultats de CMT obtenus chez les primipares en 2011 après six mois d'application des mesures d'hygiène, comparés à ceux obtenus chez les élites et non-élites dans la même année sans application de mesures d'hygiène, on note une fréquence significativement plus élevée des vaches avec des CMT positifs au niveau des élites et des non-élites. Ainsi, malgré l'absence d'un contrôle interne au sein d'un même troupeau, le contrôle externe effectué parallèlement au niveau d'un autre troupeau donne une valeur ajoutée aux résultats auxquels nous sommes parvenus. Il est, par ailleurs, reconnu que les mesures d'hygiène à la traite permettent de réduire le nombre des bactéries présentes sur la peau du trayon, ce qui pourrait dès lors limiter leur transmission (Sheldrake et Hoare, 1955; Hoare et Roberts, 1972; Galton *et al.*, 1984). Ainsi, une bonne application de ces mesures permet de prévenir 50% de nouvelles infections au niveau d'un élevage.

La qualité des produits utilisés lors du processus de la traite a été aussi sans doute déterminante au cours de cette étude. La chorexhidine (1%), qui a été utilisée pour la désinfection des trayons, s'avère effectivement efficace contre les bactéries mammopathogènes. Elle a été privilégiée par rapport aux produits iodés, car ces derniers sont tachant et possèdent une odeur âcre, ce qui pourrait créer une certaine méfiance des trayeurs quant à sa bonne utilisation, contrairement à la chlorhexidine qui est incolore et inodore. L'hypochlorite de sodium qui a, quant à lui, été utilisé pour la désinfection des mains des trayeurs et, aux dilutions recommandées, entraîne très peu de risque pour l'homme (INRS, 2000). Bien entendu, les plus faibles fréquences de vaches avec CMT positif après l'application des mesures d'hygiène peuvent, en partie, avoir d'autres causes : l'existence du phénomène de guérison spontanée lors de mammites, les interventions thérapeutiques à base d'antibiotiques pour des traitements contre d'autres pathologies que les mammites et divers phénomènes environnementaux, ...

L'étude phénotypique et génétique des souches de *S. aureus* isolées des vaches présentant un CMT positif, a tout d'abord permis de réaliser que 16 pulsotypes coexistent au niveau de la station de Toukounous. Cependant, 3 pulsotypes se sont révélés prédominants, A (33%), D (23%) et B (21%). Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études réalisées, qui soulignent que les infections à *S. aureus* sont généralement dues à un nombre limité de pulsotypes dans une exploitation. D'ailleurs, Serieys (2004) rapporte que plus de 80% des infections dans un élevage sont dues à ce petit groupe de souches. De par leur caractère spécifique, les génotypes prédominants vont influencer les caractères des infections notamment la contagiosité, la sévérité, la curabilité et la persistance (Serieys, 2004). Dans notre étude, ces pulsotypes se distinguent par la prédominance des gènes *spa* et *cap5H* au niveau du pulsotype A et B, des gènes *icaA*, *cap8H*, *seg*, *sei* et *seb* au niveau du pulsotype D et, enfin, *lks-PV* présent principalement au niveau des pulsotypes B et D. Le gène *spa* code pour la protéine A dont le rôle est d'inhiber l'opsonisation provoquée par les IgG (Hartleib *et al.*, 2000; Foster, 2005). Les gènes *seg* et *sei* sont significativement associés à des souches isolées des mammites cliniques (Haveri *et al.*, 2007). La production du biofilm (*icaA*), la présence ou l'absence de synthèse d'une capsule (CP5 et CP8) sont considérées comme des propriétés impliquées dans la chronicité d'une infection à *S. aureus*. Des études ont démontré qu'il existe des souches plutôt adaptées à une niche extracellulaire qui expriment la capsule CP8 et envahissent faiblement les cellules MAC-T et les souches plutôt adaptées à une niche intracellulaire qui n'expriment aucune capsule (bien qu'hébergeant le gène *cap5*) et envahissent fortement les cellules MAC-T (Bardiau *et al.*, 2014). Ces différences dans la prédominance des facteurs de virulence notamment impliqués dans la chronicité des mammites pourraient aussi expliquer la fréquence plus élevée et la persistance des pulsotypes A, B et D dans notre étude malgré l'application des mesures d'hygiène, bien que cette dernière puisse aussi être due simplement au fait que ces pulsotypes étaient les plus fréquents. Il a été déjà établi que la capacité de *S. aureus* à provoquer une infection chronique est corrélée à sa faculté à échapper à la réponse immune et à persister à long terme dans des niches particulières au sein de la mamelle. Cependant, les propriétés corrélées au potentiel chronique de certaines souches et/ou leur niveau d'expression dans la mamelle, par rapport aux souches responsables de mammites aiguës, ne sont pas encore identifiées avec certitude (Bardiau *et al.*, 2014).

En résumé, le système d'élevage à la SSET présente quelques similitudes avec l'élevage urbain et périurbain de Niamey, telles que la traite manuelle sans mesures d'hygiène, ou encore l'utilisation des mêmes antibiotiques dans les différents types d'affections bactériennes. Les résultats de l'antibiogramme obtenus dans notre étude peuvent par conséquent être extrapolés à l'échelle de ces types d'élevage. La mise en application des mesures d'hygiène chez ces éleveurs traditionnels périurbains et urbains sera par contre plus difficile à mettre en œuvre que dans les fermes semi-modernes, dont les propriétaires sont issus d'une classe sociale plus apte à comprendre leur intérêt. Néanmoins, tous les éleveurs sont conscients des problèmes liés à l'hygiène, car le lait acheté au niveau des laiteries est sujet à deux contrôles majeurs, l'acidité et le mouillage. Dès lors, ces mêmes éleveurs sont attentifs à l'adoption de toute mesure pouvant réduire la charge bactérienne et contribuant à la diminution de la rapidité de l'acidification du lait. Cette notion a pu être démontrée au niveau des élevages périurbains et urbains de Niamey grâce au projet « Lait sain pour le Niger ». Malgré les mauvaises conditions d'hygiène de la traite, les résultats de ce projet ont démontré, par exemple, une efficacité du traitement avec la lactoperoxydase (LPS) pour la conservation du lait jusqu'à la livraison en laiterie avec une acidité acceptable pour la pasteurisation. Cependant, le recours à l'utilisation de la lactoperoxydase ne permet pas de se passer des mesures d'hygiène, car leur mise en œuvre permet de diminuer la charge bactérienne du lait et d'allonger le temps de conservation. Malgré le succès de ces résultats préliminaires, qui ont d'ailleurs abouti à un arrêté ministériel autorisant l'utilisation officielle de la lactoperoxydase dans la conservation du lait cru au Niger, l'absence des mesures d'accompagnement, notamment la mise en place de l'organisation commerciale pour l'importation et la distribution des activateurs LPS ont fait disparaître la pratique.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Au niveau de la station sahéenne expérimentale de Toukounous (SSET), des dispositions particulières sont nécessaires à prendre dans le cadre de la gestion des troupeaux de vaches laitières dans le but d'améliorer la production en quantité et en qualité. Ces dispositions concernent la gestion de la mise-bas des animaux, la création d'un cadre idéal de la traite, une surveillance régulière des mammites, un contrôle des accouplements des animaux et une meilleure alimentation des animaux.

Au sein de la SSET, toutes les vaches gestantes primipares et multipares mettent bas au même endroit appelé localement « la maternité ». Le temps de regagner le troupeau d'origine, on assiste très souvent à la traite de ces animaux dans des conditions pouvant favoriser la transmission croisée des bactéries entre les animaux. Il serait, dès lors, préférable que ces premières traites soient réalisées pour chaque vache dans son troupeau d'origine avec, en plus, la mise en application des mesures d'hygiène nécessaires. Des études complémentaires pourraient être faites aussi pour connaître l'identité des bactéries rencontrées au niveau de la maternité associé aussi à une comparaison de la prédominance du type de bactéries en fonction des saisons.

En ce qui concerne l'application de ces mesures d'hygiène à la traite justement, un travail de fond doit être entrepris du sommet à la base pour leur mise en place effective à Toukounous. Les différents responsables en charge de la station doivent aussi être convaincus et convaincants quant au bien-fondé de ces pratiques. A défaut de données chiffrées indiquant les pertes liées aux mammites à la SSET, des voyages d'études dans des pays ayant une tradition de cette pratique pourraient créer un déclic capable de donner à la direction une autre vision de la traite et de tendre vers une modernisation de celle-ci. Ainsi, la traite mécanique peut être envisagée, surtout que la docilité des animaux fait partie de l'un des critères de sélection. Tout cela passe aussi par une amélioration préalable de l'aire de traite des vaches laitières en aménageant un local confortable et bien adapté. Une fois engagée dans cette optique, la direction doit aussi mettre en œuvre un mécanisme assurant l'effectivité de l'application des mesures d'hygiène par les trayeurs sur le terrain. Ce dispositif doit prendre en compte la sensibilisation des trayeurs et assurer qu'à chaque traite un membre de la direction assiste à toutes les opérations du début à la fin. Le groupe de trayeurs ayant moins de vaches avec moins de mammites pourrait aussi chaque mois se voir attribuer une prime forfaitaire de motivation. Aussi, faudrait-il que le contrôle laitier effectué mensuellement à la

station soit couplé au test du CMT et à la surveillance de l'état des trayons. Ainsi, tout changement de l'aspect du lait, devrait être systématiquement rapporté à la direction qui doit enregistrer les données relatives à chaque vache pour un suivi individuel. Lors de mammites cliniques détectées, un traitement s'impose tout en évitant les antibiotiques à base de pénicilline (vu les niveaux de résistances), et l'antibiotique utilisé doit être mentionné sur la fiche de l'animal. Par ailleurs, lors de résultats positifs au CMT, des prélèvements doivent être réalisés pour des analyses bactériologiques. Les vaches qui présentent des résultats de CMT régulièrement positifs sur plusieurs mois peuvent être traitées à la fin de la lactation. La persistance de CMT positifs sur plusieurs lactations, nécessite la réforme précoce de la vache, car la durée de la carrière des vaches laitières à Toukounous varie entre 15 et 16 ans. Les cas de réforme précoce constatés sur le terrain concernent les vaches avec une baisse de production, avec un ou des quartier(s) peu à non productif(s) suite à leur fibrose sans doute liée à une infection chronique, et aussi les vaches qui ne répondent pas aux critères de sélection. Une étude rétrospective sur le nombre des vaches réformées pour baisse de production associée au coût des antibiotiques utilisés pour cause de mammites sont des indicateurs faciles à mettre en place, afin d'avoir une idée sur les pertes engendrées par ces infections.

La SSET est un établissement public et la subvention de l'Etat est donc indispensable pour soutenir la politique de la direction lors de la mise en place d'un programme de contrôle de mammites. Bien entendu, l'Etat assure déjà l'équipement des trayeurs en vêtement de traite, bottes et savons, mais il serait nécessaire de mettre en place un petit laboratoire de diagnostic bactériologique fonctionnel et de doter la station en matériels nécessaires pour la réalisation du CMT, pour la désinfection des trayons et des mains des trayeurs, ainsi qu'en antibiotiques sous forme de tubes intra-mammaires.

Au-delà de l'aspect mammites, certains autres points s'avèrent importants à améliorer et/ou à investiguer, car pouvant être en lien d'une manière indirecte ou directe avec les mammites. Depuis sa création, la sélection du zébu Azawak au niveau de la SSET s'est essentiellement orientée sur l'uniformisation de la robe et l'amélioration des productions en lait et en viande. Ces travaux de sélection génétique sagement menés ont fait que cette race est l'une des meilleures races laitières dans la sous-région et est très convoitée par des pays voisins du Niger. Cependant, plusieurs années durant, les croisements entre parents proches ont fait

resurgir des problèmes de consanguinité qui se sont traduits par une diminution de la production laitière, une diminution du taux de fécondité, une augmentation de la fréquence des avortements, un retard de croissance et des malformations congénitales. Le contrôle des accouplements est ainsi plus que nécessaire à Toukounous, en évitant l'appariement entre parents proches et/ou en favorisant l'introduction de sang neuf. La conservation du patrimoine génétique de la race Azawak est capital pour l'élevage au Niger et des recherches doivent continuer dans l'intérêt du progrès génétique.

La qualité de l'alimentation des animaux à la SSET n'a pas fait, quant à elle, l'objet de beaucoup d'études. Par exemple, aucune donnée n'est disponible quant à la qualité physico-chimique et encore moins microbiologique de l'eau de forage utilisée pour alimenter les différents bacs d'abreuvement des animaux. Toutefois, des études ont été menées quant à la composition floristique du pâturage. Ces études s'accordent sur des possibilités d'une couverture adéquate des besoins des animaux. Des études complémentaires s'avèrent cependant nécessaires pour connaître le niveau réel d'apport du pâturage de Toukounous.

De toute évidence, le contrôle de mammites dans un élevage passe par cinq points essentiels : l'établissement d'un ordre de traite des vaches, l'usage de gants en plastique à usage unique pour les travailleurs et de lavettes individuelles pour laver chaque trayon, le trempage des trayons dans une solution désinfectante, le traitement des quartiers atteints par des antibiotiques au tarissement et l'abattage des vaches infectées dans plus de deux quartiers et/ou atteintes d'infection chronique. Ces mesures n'ont jamais été appliquées à la station de Toukounous avant nos travaux. Et, l'application de certaines d'entre elles au cours de cette étude a conduit à une modification de l'organisation de la traite et à une augmentation des temps de travail du personnel. Cette nouvelle approche a rapidement été jugée fastidieuse par les trayeurs, qui sont réfractaires à toute innovation dans le processus de la traite. L'instauration de manière permanente de l'application des mesures d'hygiène à la traite à la SSET s'avère pourtant nécessaire, surtout que le Ministère de l'élevage à travers le Centre de Multiplication du Bétail (CMB) envisage la mise en place d'un système de traite mécanique. Nous espérons donc que la publication de ce travail et de ces quelques articles y aidera.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AALBAEK B., STENDERUP J., JENSEN H.E., VALBAK J., NYLIN B., HUDA A.
Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. *APMIS: Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.*, 1994, **102**, 451-456.
- AARESTRUP F.M., JENSEN N.E. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. *J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 307-312.
- ABERA M., ELIAS B., ARAGAW K., DENBERGA Y., AMENU K., SHEFERAW D.
Major causes of mastitis and associated risk factors in smallholder dairy cows in Shashemene, southern Ethiopia. *Afr. J. Agric. Res.*, 2012, **24**, 3513-3518.
- AKINEDEN O., ANNEMÜLLER C., HASSAN A., LÄMMLER C., WOLTER W., ZSCHÖCK M. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 2001, **8**, 959-964.
- ALEXANDER E.H., HUDSON M.C. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **56**, 361-366.
- ALMEIDA R.A., MATTHEWS K.R., CIFRIAN E., GUIDRY A.J., OLIVER S.P.
Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy sci.*, 1996, **79**, 1021-1026.
- ANDERSON J.C., CHANDLER R.L. Experimental Staphylococcal mastitis in the mouse. Histological, ultrastructural and bacteriological changes caused by a virulent strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Comp. Pathol.*, 1975, **85**, 499-510.
- ASNOUNE Z.B., BUTEL M.J., OUZRUT R. Prévalence des principales bactéries responsables de mammites subcliniques des vaches laitières au nord-est de l'Algérie. *Rev. Elev. Med. vet. Pays trop.*, 2012, **65**, 5-9.

- ATALLA H., GYLES C., JACOB C.L., MOISAN H., MALOUIN F., MALLARD B. Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathog Dis.*, 2008, **5**, 785-799.
- ATYABI N., VODJGANI M., GHARAGOZLOO F., BAHONAR A. Prevalence of bacterial mastitis in cattle from the farms around Tehran. *IJVR.*, 2006, **7**, 1-4.
- AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H. Bactériologie clinique. Ellipses: Paris, 1992, 9-55.
- BADA-ALAMBEDJI R., KANE Y., ISSA IBRAHIM A., VIAS F.G., AKAKPO A.J. Bactéries associées aux mammites subcliniques dans les élevages bovins laitiers urbains et périurbains de Niamey (Niger). *RASPA.*, 2005, **3**, 119-124.
- BANNERMAN T.L., HANCOCK G.A., TENOVER F.C., MILLER J.M. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 551-555.
- BARBU E.M., GANESH V.K., GURUSIDDAPPA S., MACKENZIE R C., FOSTER T.J., SUDHOF T.C., HOOK M. Beta-Neurexin is a ligand for the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM SdrC. *PLoS pathog.*, 2010, **6**, e1000726.
- BARDIAU M., DETILLEUX J., FARNIR F., MAINIL J.G., OTE, I. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, 2014, **169**, 74-79.
- BAUER A.W., KIRBY W.M., SHERRIS J.C., TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.*, 1966, **45**, 493-496.
- BAYLES K.W., WESSON C., LIOU L.E., FOX L.K., BOHACH G.A., TRUMBLE W.R. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun.*, 1998, **66**, 336-342.

- BAYLES K.W., WESSON C.A., LIOU L.E., FOX L.K., BOHACH G.A., TRUMBLE W.R. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 336-342.
- BECKER K., BALLHAUSEN B., KOCK R., KRIEGESKORTE A. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the "mec alphabet" with specific consideration of *mecC*, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2014, **304**, 794-804.
- BECKER K., BALLHAUSEN B., KOCK R., KRIEGESKORTE A. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the "mec alphabet" with specific consideration of *mecC*, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2014, **304**, 794-804.
- BELLI P., TURINI J., HAROUNA A., GARBA I.A., PISTOCCHINI E., ZECCHINI M. Critères de sélection des bovins laitiers par les éleveurs autour de Niamey au Niger. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 2008, **61**, 51-56.
- BELSCHNER A.P., HALLBERG J.W., NICKERSON S.C., OWENS W.E. *Staphylococcus aureus* mastitis therapy revisited. National Mastitis Council, annual meeting, Madison (USA), 1996, 116-222.
- BEN HASSEN S., MESSADI L., BEN HASSEN A. Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite. *Ann. Méd. Vét.*, 2003, **147**, 41-47.
- BENDAHOU A., LEBBADI M., ENNANEI L., ESSADQUI F.Z., ABID M. Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 2008, **2**, 218-225.
- BENNETT R., JASPER D.E. Bovine Mycoplasmal mastitis from intramammary inoculations of small numbers of *Mycoplasma bovis* : local and systemic antibody response. *Am. J. Vet. Res.*, 1978, **41**, 889-892.

- BERGDOLL M.S., BORJA C.R., AVENA R.M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *J. Bacteriol.*, 1965, **90**, 1481-1485.
- BERGMANN A. Experimental *Prototheca* mastitis in the cow and treatment with tetramisol hydrochloride. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 1993, **106**, 257-260.
- BES M., BRUN Y. *Staphylococcus* : actualités taxonomiques et identification. *Revue Française des Laboratoires*. 2002, **20**, 23-30.
- BISMUTH R. Aminosides et bactéries à Gram positif. In : COURVALAIN P., LECLERCQ R., BINGEN E. (Eds.), *Antibiogramme*. ESKA : Paris, 2006, 325-334.
- BODDIE R.L., NICKERSON S.C., OWENS W.E., WATTS J.L. Udder microflora in nonlactating heifers. *Agri. Practice.*, 1987, **8**, 22-25.
- BONAITI B., MOUREAUX S., MATTALIA S. Bilan et paramètres génétiques des mammites cliniques collectées par le contrôle laitier dans les races Montbéliarde, Normande et Prim'Holstein. *Renc. Rech. Ruminants.*, 2005, **12**, 271-274.
- BOTHA F.S., BRAND P.A. A simplified key for identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *S. Afr J. Dairy Sci.*, 1987, **19**, 2, 39-44.
- BOUAZIZ O. Contribution à l'étude des infections intramammaires de la vache laitière dans l'Est Algérien. (Thèse Doctorat d'Etat). Université Mentouri de Constantine: Constantine, 2005, 296p.
- BOYCE J.M., PITTET D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 2002, **23**, 3-40.
- BRADLEY A. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.*, 2002, **164**, 116-128.

- BRADLEY A., GREEN M.J. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. *J. Dairy Sci.*, 2000, **8**, 1957-1965.
- BRADLEY A.J., GREEN M.J. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 2004, **20**, 547-568.
- BRADLEY A.J., LEACH K.A., BREEN J.E., GREEN L.E., GREEN M.J. Survey on the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet. Rec.*, 2007, **160**, 253-257.
- BRAMLEY A.J., DODD F.H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control progress and prospects. *J. Dairy Res.*, 1984, **51**, 481-512.
- BROUILLETTE E., GRONDIN G., SHKRETA L., LACASSE P., TALBOT B.G. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb. Pathog.*, 2003, **35**, 159-168.
- BROUILLETTE E., MARTINEZ A., BOYLL B.J., ALLEN N.E., MALOUIN F. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2004, **41**, 35-41.
- BROWNING J.W., MEIN G.A., BARTON M., NICHOLLS T.J., BRIGHTLING T. Effects of antibiotic therapy at drying off on mastitis in the dry period and early lactation. *Austr. Vet. J.*, 1990, **67**, 440-442.
- BROWNING J.W., MEIN G.A., BRIGHTLING T., NICHOLLS T.J., BARTON M. Strategies for mastitis control: Dry cow therapy and culling. *Aust. Vet. J.*, 1994, **71**, 179-181.

- BRUN Y., BES M., VANDENESCH F. *Staphylococcus*. In : FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R., RIEGEG P. Bactériologie clinique. ESKA : Paris, 2007, 795-835.
- CAPUCO A.V., BRIGHT S.A., PANKEY J.W., WOOD D.L., MILLER R.H., BITMAN A J. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin *J. Dairy Sci.*, 1992, **75**, 2126–2130.
- CAPURRO A., CONHA C., NILSON L., OSTENSSON K. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Vet. Scand.*, 1999, **40**, 315-321.
- CHAFFER M., LEITNER G., WINKLER M., GLICKMAN A., KRIFUCKS O., EZRA E., SARAN A. Coagulase-negative staphylococci and mammary gland infections in cows. *Zentralbl. Veterinarmed.*, 1999, **46**, 707-712.
- CHAMBERS H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997, **10**, 781-791.
- CHEW B.P., HOLLEN L.L., HILLERS J.K., HERLUGSON M.L. Relationship between vitamin A and beta-carotene in blood plasma and milk and mastitis in Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 1982, **65**, 2111-2118.
- CORRIGAN R.M., MIAJLOVIC H., FOSTER T.J. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *Braz J. Microbiol.*, 2009, **9**, 22.
- COSTA E.O., CARCIOFI A.C., MELVILLE P.A., PRADA M.S., SCHALCH U. *Prototheca* sp. outbreak of bovine mastitis. *J. Vet. Med.*, 1996, **43**, 321-324.
- COSTA E.O., CARCIOFI A.C., MELVILLE P.A., PRADA M.S., SCHALCH U. *Prototheca* sp. outbreak of bovine mastitis. *J. Vet. Med.*, 1996, **43**, 321-324.
- COSTERTON J.W., STEWART P.S., GREENBERG E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.*, 1999, **284**, 1318-1322.

- CRAVEN N., ANDERSON J-C. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action in vitro and in vivo. *J. Dairy Res.*, 1984, **4**, 513-523.
- CRAWSHAW W.M., MACDONALD N.R., DUNCAN G. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. *Vet. Rec.*, 2005, **156**, 812-813.
- CUCARELLA C., TORMO M.A., UBEDA C., TROTONDA M.P., MONZON M., PERIS C., AMORENA B., LASA I., PENADES J.R. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 2004, **72**, 2177-2185.
- DAVIDOV I., RADINOVIC M., ERDELJAN M., CINCOVIC M.R., STANCIC I., BELIC B. Relations between blood Zinc concentrations and udder health in dairy cows. *Rev. Méd. Vét.*, 2013, **164**, 183-189.
- DEVRIESE L.A., HOMMEZ J., LAEVENS H., POT B., VANDAMME P., HAESEBROUCK F. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.*, 1999, **70**, 87-94.
- DHANAWADE N., KALOREY B., SRINIVASAN D.R., BARBUDDHE R., KURKURE S.B. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.*, 2010, **34**, 81-89.
- DINGES M., ORWIN P., SCHLIEVERT P. Exotoxines of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, **13**, 16-34.
- DONLAN R.M. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J.*, 2000, **46**, 47-52.

- DOWNER R., ROCHE F., PARK P.W., MECHAM R.P., FOSTER T.J. The elastinbinding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *J Biol Chem.*, 2002, **277**, 243-250.
- DUREL L, FAROULT B, LEPOUTRE D, BROUILLET P, LE PAGE Ph. Mammites des bovins (cliniques et subcliniques) : Démarches diagnostiques et thérapeutiques *Dépêche vét*, 2004, (suppl.87), 39 p.
- ELAD D., SHPIGEL N.Y., WINKLER M., KLINGER I., FUCHS V., SARAN A., FAINGOLD D. Feed contamination with *Candida krusei* as a probable source of mycotic mastitis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1995, **207**, 620-622.
- EL-SAFORY N.S., FAZARY A.E., LEE C.K. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydr Polymers.*, 2010, **81**, 165-181.
- ENRIGHT M.C., SPRATT B.G. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.*, 1999, **7**, 482-487.
- EVEILLARD M. Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission: adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire. Université d'Angers : Angers, 2007, 158p.
- FARNSWORTH R.J., SORENSEN D.K. Prevalence and species distribution of yeast in mammary glands of dairy cows in Minnesota. *Can. J. Comp. Med.*, 1972, **36**, 329-332.
- FOSTER T. Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, **3**, 948-958.
- FOWLER T., WANN E.R., JOH D., JOHANSSON S., FOSTER T.J., HOOK M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur. J. Cell. Biol.*, 2000, **79**, 672-679.

- FOX L.K., GERSHMAN M., HANCOCK D.D., HUTTON C.T. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phage typing: the effect of milking time hygiene practices. *Cornell Vet.*, 1991, **81**, 183-193.
- FRANK E.R. Veterinary surgery. CBS : New Delhi, 2002, 260-261.
- GALTON D.M., PETERSSON L.G., MCRRILL W.G., BUNDLER D.K., SHUSTER D.E. Effects of premilking udder preparation on bacterial population, sediment, and iodine residue in milk. *J. Dairy Sci.*, 1984, **67**, 2580-2589.
- GARCIA-ALVAREZ L., HOLDEN M.T., LINDSAY H., WEBB C.R., BROWN D.F., CURRAN M.D., WALPOLE E., BROOKS K., PICKARD D.J., TEALE C., PARKHILL, J., BENTLEY S.D., EDWARDS G.F., GIRVAN, E.K., KEARNS A.M., PICHON B., HILL R.L., LARSEN A.R., SKOV R.L., PEACOCK S.J., MASKELL D.J., HOLMES M.A. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.*, 2011, **11**, 595-603.
- GEBREYOHANNES Y., TESFAYE M., FEKADU G.R., KELAY B. Milk yield and associated economic losses in quarters with subclinical mastitis due to *Staphylococcus aureus* in Ethiopian crossbred dairy cows. *Trop. Anim. Health Prod.*, 2009, **42**, 925-931.
- GEOGHEGAN J.A., GANESH V.K., SMEDS E., LIANG X., HOOK M., FOSTER T.J. Molecular characterization of the interaction of staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) ClfA and Fbl with fibrinogen. *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 6208-6216.
- GEORGE L.W., DIVERS T.J., DUCHARM N., WELCOM F.L. Diseases of the teats and udder. In : Divers T.J., Peek S.F. (Edts.), Diseases of Dairy cattle. Elsevier : Missouri, 2008, 327-394.

- GILLESPIE B.E., HEADRICK S.I., BOONYAYATRA S., OLIVER S.P. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet. Microbiol.*, 2009, **134**, 65-72.
- GOODGER W.J., GALLAND J.C., CHRISTIANSEN V.E. Survey of milking management practices on large dairies and their relationship to udder health and production variables. *J. Dairy Sci.*, 1988, **71**, 2535-2542.
- GREEN M.J., CRIPPS P.J., GREEN L.E. Prognostic indicators for toxic mastitis in dairy cows. *Vet. Rec.*, 1998, **143**, 127-130.
- HAROUNA A., ZECCHINI M., LOCATELLI C., SCACCABAROZZI L., CATTANEO C., AMADOU A., BRONZO V., MARICHATOU H., BOETTCHER P.J., ZANONI M.G., ALBORALI L., MORONI P. Milk hygiene and udder health in the periurban area of Hamdallaye, Niger. *Trop. Anim. Health Prod*, 2009, **41**, 705-710.
- HARTLEIB J., KOHLER N., DICKINSON R.B., CHHATWAL G.S., SIXMA J.J., HARTFORD O.M., FOSTER T.J., PETERS G., KEHREL B.E., HERRMANN M. Protein A is the vonWillebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood*. 2000, **96**, 2149-2156.
- HAVERI M., ROSLOF A., RANTALA L., PYORALA S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and non persistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, **103**, 993-1000.
- HEBERT A., SAYASITH K., SENECHAL S., DUBREUIL P., LAGACE J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, **1**, 57-62.
- HENNEKINNE J.A., KEROUANTON A., BRISABOIS A., DE BUYSER M.L. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, **94**, 321-329.

- HERRON-OLSON L., FITZGERALD J.R., MUSSER J.M., KAPUR V. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PloS one*. 2007, **2**, e1120.
- HOARE R.J.T., ROBERTS E.A. Investigations in mastitis problem herds. II. Effect of herd size, shed type, hygiene and management practices. *Aust. Vet. J.*, 1972, **48**, 661-663.
- HOGAN J.S., BOGACZ V.L., ASLAM M., SMITH K.L. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 bacterin administered to primigravid heifers. *J. Dairy Sci.*, 1999, **82**, 939-943.
- HUDSON M.C., RAMP W.K., NICHOLSON N.C., WILLIAMS A.S., NOUSIAINEN M.T. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.*, 1995, **19**, 409-419.
- HUMBLET M.F., GODEAU J.M. L'haptoglobine, marqueur protéique de l'inflammation aiguë dans l'espèce bovine. *Ann. Med. Vet.*, 2005, **149**, 20-33.
- INS (Institut National de la Statistique). Annuaire statistique du Niger 2008-2012. Niamey, Niger, Institut National de la Statistique, 2013, 237p.
- JACOB B.M., ANTONY E.K., SREEKUMAR B., HARIDAS M. Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Life. Sci.*, 2000, **66**, 2433-2439.
- JAGIELSKI T., LAGNEAU P.E. Protothecosis. A pseudofungal infection. *J. Med. Myco.*, 2007, **17**, 261-270.
- JANOSI S., RATZ F., SZIGETI G., KULCSAR M., KERENYI J., LAUKO T., KATONA F., HUSZENICZA G. Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *Vet. Q.*, 2001, **23**, 58-61.
- JOST B.H., BILLINGTON S.J. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 2005, **88**, 87-102.

- KADIC S. Latent bacterial and mycotic infections of the cows udder. *Veterinarski arhiv.*, 1978, **48**, 101-105.
- KADJA M., KANE Y., TCHASSOU K., KABORET Y., MAINIL J., TAMINIAU B. Typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk cows with subclinical mastitis in Dakar, Senegal . *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.*, 2010, **58**, 195-205.
- KADJA M.C. Les mammites subcliniques des vaches en Afrique de l'Ouest. Editions Universitaires Europeennes : Sarrebruck, 2011, 184p.
- KARAHAN M., ACIK M.N., CETINKAYA B. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. *Foodborne Pathog Dis.*, 2009, **6**, 1029-1035.
- KARAKAWA W.W., SUTTON A., SCHNEERSON R., KARPAS A., VANN W.F. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 1090–1095.
- KATEETE D.P., KABUGOU, BALUK H., NYAKARAHUKA L., KYOBE S., OKEE M., NAJJUKA C.F., JOLOBA M.L. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala,Uganda. *PloS. One.*, 2013,**8**, 63413-63436.
- KEHRLI M.E., SHUSTER D.E. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 619-627.
- KELLER B., SCHEIBL P., BLECKMANN E., HOEDEMAKER M. Differentiation of yeasts in mastitis milk. *Mycoses.*, 2000, **43**, 17-19.
- KOIVULA M., MÄNTYSAARI E.A., PITKÄLÄ A., PYÖRÄLÄ S. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agric. Scand.*, 2007, **57**, 89-96.

- KONTE M. Etude de la prévalence des mammites chez les bovins métis et locaux des systèmes de production semi-intensifs de Kaolack et de Fatick. Actes de l'atelier de restitution des résultats du projet PROCORDEL, Dakar, Sénégal, 2003, 84p.
- KRUKOWSKI H., LISOWSKI A., ROZANSKI P., SKORKA A. Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in the south-eastern part of Poland. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2006, **9**, 181-184.
- KUUSELA P. Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. *Nature*. 1978, **276**, 718-720.
- LARSEN H.D., AARESTRUP F.M., JENSEN N.E. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet. Microbiol.*, 2002, **85**, 61-67.
- LE GRAND D., POUMARAT F., BEZILLE P. Mycoplasmasoses bovines à *Mycoplasma bovis*. *Point Vét.*, 1996, **28**, 771-778.
- LECLERCQ R. Macrolides-lincosamides-streptogramines. In : COURVALAIN P., LECLERCQ R., BINGEN E. (Eds.), AntibioGramme. ESKA : Paris, 2006, 299-324.
- LEE C.S., WOODING F.B., KEMP P. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy. Res.*, 1980, **47**, 39-50.
- LIJNEN H.R., COLLEN D. Staphylokinase, a fibrin-specific bacterial plasminogen activator. *Fibrinolysis.*, 1996, **10**, 119-126.
- LONGO F., BEGUIN J.C., CONSALVI P.J., DELTOUR J.C. Quelques données épidémiologiques sur les mammites subcliniques de la vache laitière. *Rev. Med. Vet.*, **145**, 43-47.

- LOWY F.D. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen?. *Trends Microbiol.*, 2000, **8**, 341-343.
- MAIDEN M.C., BYGRAVES J.A., FEIL E., MORELLI G., RUSSELL J.E., URWIN R., ZHANG Q., ZHOU J., ZURTH K., CAUGANT D.A., FEAVERS I.M., ACHTMAN M., SPRATT B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, **95**, 3140-3145.
- MAKOVEC J.A., RUEGG P.L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 3466-3472.
- MARQUES S., SILVA E., CARVALHEIRA J., THOMPSON G. Short communication: *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2006, **89**, 4202-4204.
- MARR J.C., LYON J.D., ROBERSON J.R., LUPHER M., DAVIS W.C., BOHACH G.A. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. *Infect. Immun.*, 1993, **61**, 4254-4262.
- MATOS J.S., WHITE D.G., HARMON R.J., LANGLOIS B.E. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 1991, **74**, 1544-1549.
- MEL (Ministère de l'Élevage). Stratégie de Développement Durable de l'Élevage. Niamey, Niger, Ministère de l'Élevage, 2012, 83p.
- MENISSIER F. Effets secondaires indésirables de la sélection chez les bovins pour la production de viande. *Ann Genet Sel Anim.*, 1978, **10**, 143-143.
- MEUNIER D., Infections mammaires à *S. aureus*, caractérisation et évaluation d'antigènes pour le diagnostic immunologique. Thèse de doctorat : Université de Tours, Tours, 1999, 155p.

- MOLLER A., TRUYEN U., ROESLER U. *Prototheca zopfii* genotype 2: the causative agent of bovine protothecal mastitis? *Vet. Microbiol.*, 2007, **120**, 370-374.
- MONECKE S., ENGELMANN I., ARCHAMBAULT M., COLEMAN D.C., COOMBS G.W., CORTEZ DE JACKEL S., PELLETIER-JACQUES G., SCHWARZ S., SHORE A.C., SLICKERS P., EHRICT R. Distribution of SCCmec-associated phenol-soluble modulin in staphylococci. *Mol. Cell. Probes.*, 2012, **26**, 99-103.
- MONZÓNA M., CONCEPCIÓN O., JOSÉ L., BEATRIZ A. Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, **48**, 793-801.
- MORETTI A., PASQUALI P., MENCARONI G., BONCIO L., PIERGILI F.D. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). *J. Vet. Sci.*, 1998, **45**, 129-132.
- NAGAHATA H., ITO H., MARUTA H., NISHIKAWA Y., SUSUKINO H., MATSUKI S., HIGUCHI H., OKUHIRA T., ANRI A. Controlling highly prevalent *Staphylococcus aureus* mastitis from the dairy farm. *J. Vet. Med. Sci.*, 2007, **69**, 893-898.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS : Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard-Second edition. NCCLS document M31-A2. Wayne, PA, 2002.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of dairy cattle. 7th revised edition. National Academy Press: Washington DC, 2001, 408 p.
- NEAVE F.K., DODD F.H., KINGWELL R.G. A method of controlling udder disease. *Vet. Rec.*, 1966, **78**, 521-523.
- NOVICK R.P. Auto-induction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.*, 2003, **48**, 1429-1449.

- OSBORNE A.D., ARMSTRONG K., CATRYSSSE N.H., BUTLER G., VERSAVEL L. An outbreak of *Pseudomonas* mastitis in dairy cows. *Can. Vet. J.*, 1981, **22**, 215-216.
- OSTERÅS O., EDGE V.L., MARTIN S.W. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. *J. Dairy Sci.*, 1999, **82**, 1221-1231.
- OTE I., TAMINIAU B., DUPREZ J-N., DIZIER I., MAINIL J.G. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, 2011, **153**, 285-292.
- OUTTERIDGE P.M., LEE C.S. The defense mechanisms of the mammary gland of domestic ruminants. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.*, 1988, **4**, 165-196.
- PAAPE M.J., MILLER R.H., ZIV G. 1991. Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 363-366.
- PARK P.W., ROBERTS D.D., GROSSO L.E., PARKS W.C., ROSENBLOOM J., ABRAMS W.R., MECHAM R.P. Binding of elastin to *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 23399-23406.
- PERSSON Y., NYMAN A.K., GRONLUND-ANDERSSON U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet. Scand.*, 2011, **53**, 36-44.
- PFÜTZNER H. The tenacity of *Mycoplasma bovis*. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. A.*, 1984, **258**, 38-41.
- PHUEKTES P., MANSELL P.D., BROWNING G.F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2001, **84**, 1140-1148.

- PIESSENS V., VAN COILLIE E., VERBIST B., SUPRE K., BRAE G., VAN NUFFEL A., DE VUYST L., HEYNDRICKX M., DE VliegHER S. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *J. Dairy Sci.*, 2011, **94**, 2933-2944.
- PITKÄLÄ A., GINDONIS V., WALLIN H., HONKANEN-BUZALSKI T. Interlaboratory proficiency testing as a tool for improving performance in laboratories diagnosing bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2005, **88**, 553-559.
- POUTREL B. L'amélioration de la qualité du lait par la lutte contre les mammites bovines. *Méd. Nutr.*, 1986, **22**, 318-324.
- POUTREL B., CAFFIN J-P. Physiological and Pathological Factors Influencing Bovine Immunoglobulin G2 Concentration in Milk. *J. Dairy Sci.*, 1988, **71**, 2035-2043.
- POUTREL B., SOUTRA L. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 1994, **40**, 79-89.
- POYART C. Tétracyclines. In : COURVALAIN P., LECLERCQ R., BINGEN E. (Eds.), Antibiogramme. ESKA : Paris, 2006, 325-334.
- PYORALA S., TAPONEN S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-not so from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microbiol.*, 2009, **134**, 29-36.
- QUINCAMPOIX J.C., MAINARDI J.L. Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation.*, 2001, **10**, 267-275.
- QUINN P.J., MARKEY B.K., LEONARD F.C., FITZPATRICK E.S., FANNING S., HARTIGAN P.J. Veterinary microbiology and microbial disease. Wiley-Blackwell: Chichester, 2011, 893p.

- RABELLO R.F., MOREIRA B.M., LOPES R.M., TEIXEIRA L.M., RILEY L.W., CASTRO A.C. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J. Med. Microbiol.*, 2007, **56**, 1505-1511.
- RADOSTITS O.R., BLOOD D.C., GAY C.C. Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats and Horses. Baillier Tindall: London, 2007, 563-614.
- RAINARD P., 1985. Les mammites colibacillaires. *Rec. Méd. Vét.*, **161**, 529-537.
- RAINARD P., RIOLLET C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.*, 2006, **37**, 369-400.
- RAINARD P., RIOLLET C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.*, 2006, **37**, 369-400.
- RAJALA-SCHULTZ P.J., SMITH K.L., HOGAN J.S., LOVE B.C. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet. Microbiol.*, 2004, **102**, 33-42.
- RECA (Réseau National des Chambres d'Agriculture). Bilan des études des filières rurales au Niger. Analyses sommaires de 9 filières. Rapport final, Niamey, Niger, 2010, 36p.
- REILLY S.S., HUDSON M.C., KELLAM J.F., RAMPW.K. In vivo internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone*, 2000, **26**, 63-70.
- REMY D. Les traitements utilisés lors des mammites suraiguës. In: Conférence sur la prévention médicale et le traitement des mammites. Prague, 23-24 Janvier, 2004, 66-84.
- RGAC (Recensement General de l'Agriculture et du Cheptel). Résultats définitifs. Ministère du Développement Agricole/ Ministère des Ressources Animales. Projet gcp/ner/041/ec, Niamey, 2008, 115p.

- RHEM M.N., LECH E.M., PATTI J.M., MCDEVITT D., HOOK M., JONES D.B., WILHELMUS K.R., 2000. The collagen-binding adhesin is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* keratitis. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 3776-3779.
- RIBEIRO M.G., LARA G.H.B., BICUDO S.D., SOUZA A.V.G., SALERNO T., SIQUEIRA A.K., GERALDO J.S. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2007, **59**, 810-812.
- ROBERSON J.R., FOX L.K., HANCOCK D.D., GAY J.M., BESSER T.E. Prevalence of coagulase positive staphylococci, others than *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, 1996, **57**, 1, 54-58.
- ROBERSON J.R., FOX L.K., HANCOCK D.D., GAY J.M., BESSER T.E. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *J. Dairy Sci.*, 1998, **81**, 687-693.
- RUPP R., BOICHARD D. Numérations cellulaires du lait et mammites cliniques: relations phénotypique et génétique chez les vaches Prim'Holstein. *INRAN Prod. Anim.*, 2001, **14**, 193-200.
- SABAT A., MELLES D.C., MARTIROSIAN G., GRUNDMANN H., VAN BELKUM A., HRYNIEWICZ W. Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding sdr genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, **44**, 1135-1138.
- SAIDI R., KHELEF D., KAIDI R. Evaluation d'un test de dépistage précoce des mammites subcliniques des vaches. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 2010, **63**, 57-61.
- SAIDOU O., DOUMA S., DJIBO A.Z., FORTINA R. Analyse du peuplement herbacé de la station sahélienne expérimentale de Toukounous (Niger) : Composition floristique et valeur pastorale. *Sécheresse*, 2010, **21**, 154-160.

- SALASIA S.I., KHUSNAN Z., LAMMLER C., ZSCHOCK M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J. Vet. Sci.*, 2004, **5**, 103-109.
- SAWANT A.A., SORDILLO L.M., JAYARAO B.M. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.*, 2005, **88**, 2991-2999.
- SCHALM O.W., CARROLL E.J., JAIN N.C. Bovine mastitis. Lea and Febiger : Philadelphia, 1971, 222p.
- SCHUKKEN V.H., MALLARD B.A., DEKKERS J.C.M., LESLIE K.E., STEAR M.J. Genetic impact on the risk of intramammary infection following *Staphylococcus aureus* challenge. *J. Dairy Sci.*, **77**, 1994, 639-647.
- SEARS P.M., MCCARTHY K.K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 2003, **19**, 171-185.
- SEMNANI M.J., KABBUR M.B., JAIN N.C. Activation of bovine neutrophil functions by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 alpha. *Comp. Haematol. Int.*, **3**, 1993, 81-88.
- SERIEYS F. Dépistage systématique des inflammations de la mamelle, un outil de gestion sanitaire In: Mammmites des vaches laitières. Société Française de Buiatrie, Paris 18 et 19 Décembre 1991, 159-162
- SERIEYS F. Rapport d'expertise épidémiologie In : conférence sur la prévention médicale et le traitement des mammmites. Prague, 23-24 Janvier, 2004, 8-22.
- SHARMA N.K., REES C.E.D., DODD C.E.R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 1347-1353.

- SHELDRAKE R.F., HOARE R.T.J. Effects of a disinfectant udder wash and a post-milking teat dip on bacterial population of the teat end and on the rate of new intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, 1955, **47**, 253-258.
- SHYAKA A. Diagnostic des mammites cliniques et subcliniques en enlevage bovin laitier intensif (Cas de la ferme de Wayembam). (Thèse de doctorat vétérinaire). École Inter-États des Sciences et Médecine Vétérinaire de Dakar: Dakar, 2007, 111p.
- SLOVIS N., JONES B., CAVANEY. Disease prevention strategies. In : Cavaney L., Jones B., Ellis K. (Eds.), *Veterinary infection prevention and control*. Wiley-Blackwell: Chichester, 2012, 85-105p.
- SMITH K., HARISSON J., HANCOCK D., TODHUNTER D., CONRAD H. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J. Dairy Sci.*, 1984, **67**, 1293-1300.
- SORDILLO L.M., SHAFER-WEAVER K., DE ROSA D. Symposium: Bovine immunology. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 1851-1865.
- SPIERS A.J., BUCKLING A., RAINEY P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology.*, 2000, **146**, 2345-2350.
- STRANDBERG Y., GRAY C., VUCOLOLO T., DONALDSON L., BROADWAY M., TELLAM R. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine.*, 2005, **31**, 72-86.
- SULEIMAN A.B., UMOH V.J., KWAGA J.K.P., SHAIBU S.J. Prevalence and antibiotic resistance profiles of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from bovine mastitic milk. *Int. Res. J. Microbial.*, 2012, **2**, 264-270.
- SUTRA L., POUTREL B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 1994, **40**, 79-89.

- TANIYAMA H., OKAMOTO F., KUROSAWA T., FURUOKA H., KAJI Y., OKADA H., MATSUKAWA K. Disseminated protothecosis caused by *Prototheca zopfii* in a cow. *Vet pathol.*, 1994, **31**, 123-125.
- TAPONEN S., KOORT J., BJORKROTH J., SALONIEMI H., PYORALA S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. *J. Dairy Sci.*, 2007, **90**, 3301-3307.
- TCHASSOU T. Enquête épidémiologique sur les mammites subcliniques dans les élevages bovins laitiers périurbains à Dakar. (Thèse de doctorat vétérinaire). École Inter-États des Sciences et Médecine Vétérinaire de Dakar: Dakar, 2009, 86p.
- TENHAGEN B.A., KOSTER G., WALLMANN J., HEUWIESER W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.*, 2006, **89**, 2542-2551.
- THERON L., PLUVINAGE P, SERIEYS F., HANZEN CH. Mammites bovines à pathogènes inhabituels, comment les gérer au niveau individuel et du troupeau ? *Bul. GTV.*, 2010, **54**, 41-52.
- THORBERG B.M., DANIELSSON-THAM M.L., EMANUELSON U., WALLER K.P. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Sci.*, 2009, **92**, 4962-4970.
- TIWARI H.K., SAPKOTA D., DAS A.K., SEN M.R. Assessment of different tests to detect methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.*, 2009, **40**, 801-806.
- TRINIDAD P., NICKERSON S.C., ALLEY T.K. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, 1990, **73**, 107-114.

- VEH K.A. Validation de marqueurs de virulence de *Staphylococcus aureus* comme outils de pronostic de persistance intramammaire. (Mémoire de Maître ès sciences). Université de Sherbrooke: Sherbrooke, 2014, 76p.
- VESGA O., GROESCHEL M.C., OTTEN M.F., BRAR D.W., VANN J.M., PROCTOR R.A. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J. Infect. Dis.*, 1996, **173**, 739-742.
- WALLEMACQ H., GIRARD B., LEKEUX P., BUREAU F. La vaccination contre les mammites à *Staphylococcus aureus* chez la vache laitière. *Ann. Méd. Vét.*, 2010, **154**, 16-29.
- WEIGT U. Bovine mastitis refractory to treatment. *Bul. GTV.*, 1984, **5**, 37-45.
- WENZ J.R., BARRINGTON G.M., GARRY F.B., MCSWEENEY K.D., DINSMORE R.P., GOODELL G., CALLAN R.J. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2001, **219**, 976-981.
- WHIST A.C., OSTERA O., SOLVEROD L. Clinical mastitis in Norwegian herds after a combined selective dry-cow therapy and teat-dipping trial. *J. Dairy Sci.*, 2006, **89**, 4649-4659.
- WHO (World Health Organization). 1998. The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WÜST J., MARTINETTI G.D., LÜTHY-HOTTENSTEIN J., BRUN F., ALTWEGG M. Isolation of Gram-positive rods that resemble but are clearly distinct from *Actinomyces pyogenes* from mixed wound infection. *J Clin Microbiol.*, 1993, **31**, 1127-1135.
- YASSIN A.F., HUPFER H., SIERING C., SCHUMANN P. Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend.

Lehnen et al. 2006: proposal for *Trueperella gen. nov.* and emended description of the genus *Arcanobacterium*. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, 2011, **61**, 1265-1274.

ZADOKS R.N., GILLEPSIE B.E., BARKEMA H.W., SAMPINON O.C., OLIVIER S.P., CHUKKEN Y.H. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol. Infect.*, 2003, **130**, 335-349.

ZADOKS R.N., VAN LEEUWEN W.B., KREFT D., FOX L.K., BARKEMA H.W., SCHUKKEN Y.H. VAN BELKUM A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3894-3902.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2015/0480/8

ISBN 978-2-87543-061-8

ISBN 978-2-87543-061-8



9 782875 430618