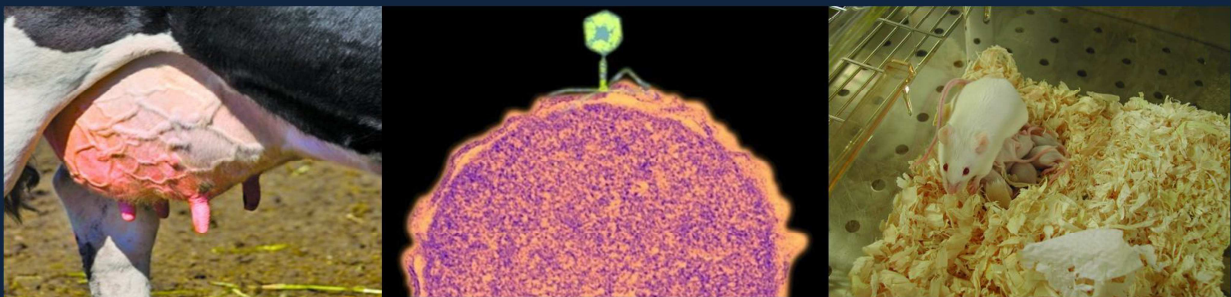


Les staphylocoques d'origine animale : génétique de la résistance à la méticilline et évaluation thérapeutique des bactériophages dans le cadre des mammites bovines

Staphylococci from animal origin: genetics of methicillin resistance and therapeutic assessment of bacteriophages in the context of bovine mastitis



Cyrille NGASSAM TCHAMBA

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences vétérinaires
Année académique 2020-2021



**UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES
SERVICE DE BACTERIOLOGIE**

**Les staphylocoques d'origine animale : génétique de la résistance à la
méticilline et évaluation thérapeutique des bactériophages dans le cadre des
mammites bovines**

**Staphylococci from animal origin: genetics of methicillin resistance and
therapeutic assessment of bacteriophages in the context of bovine mastitis**

Cyrille NGASSAM TCHAMBA

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
Docteur en Sciences Vétérinaires**

ANNEE ACADEMIQUE 2020-2021

Illustrations de couverture :

Photographie de pis de vache Holstein : Copyright 2012, u15360245, SassyStock, FOTOSEARCH®.

Image d'un bactériophage attaquant un staphylocoque : Copyright, Eye of Science, Science Source.

Photographie d'une souris BalB/cJRj allaitante : Cyrille Ngassam, expériences *in vivo* en modèle de mammite murine, FARAH, Université de liège.

DEDICACES

Je dédie ce travail à ma famille :

A mon père **Emmanuel TCHAMBA**, ma mère **Florence DJOFANG NGASSAM** pour l'éducation et le soutien inconditionnel que vous m'avez sans cesse apporté tout au long de ma vie et particulièrement de mes études.

A ma femme et mes enfants pour le bonheur et le soutien que vous m'avez toujours apporté en toute circonstance.

A mes sœurs, ainsi qu'à toute la grande famille SAYIKWET et la grande famille NGASSAM

“Les aptitudes sont ce que vous pouvez faire. La motivation détermine ce que vous faites. Votre attitude détermine votre degré de réussite”.

Karl Max

Remerciements

Au terme de ce long et périlleux parcours de vie, je tiens avant tout à remercier de tout cœur le Professeur Jacques MAINIL, chef du service de bactériologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège. Sans hésitation, vous m'avez accueilli dans votre service, vous m'avez pris sous vos ailes, vous m'avez toujours soutenu et surtout vous avez tenu à votre promesse de transformer celui que j'étais en bactériologiste. Votre rigueur et excellence scientifique, votre disponibilité et surtout vos qualités humaines m'ont énormément marqué tout au long de mon parcours. Moi et toute ma famille, nous tenons à vous exprimer notre profonde reconnaissance.

J'adresse toute ma gratitude au Dr Damien THIRY, promoteur de ce travail. Par vos idées, vos conseils et surtout votre disponibilité, vous avez complètement modelé ce travail et fait de lui ce qu'il est actuellement. Pour toutes ces raisons, je vous suis infiniment reconnaissant.

Mes sincères remerciements vont également à l'endroit des membres de mon comité de thèse, notamment le professeur Sarne DE Vlieghe (UGent) et le Dr Bernard TAMINIAU pour leurs précieux conseils ainsi que leur soutien dans ce travail.

Je ne manquerais pas de remercier tous les autres membres du consortium ANIWHa sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Il s'agit en particulier du professeur Yngvild Wasteson (NMBU) et du Dr Trine L'Abee-Lund (NMBU), qui par leur disponibilité et leur immense bonté m'ont permis de réaliser une grande partie de ce travail avec beaucoup plus de sérénité. Je ne manquerais toutes fois pas de citer le Dr Anneleen DE VISSCHER (ILVO), le Dr Yannick BLANCHARD (ANSES), Mr Fabrice TOUZAIN (ANSES), Mr Pierrick LUCAS, Mr Jean Noel DUPREZ et Mlle Marte FERGESTAD (NMBU) à qui j'adresse mes sincères remerciements pour leur soutien.

Mes remerciements s'adressent également à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la conception et/ou la rédaction de mes différents articles, en occurrence Prof. Freddy HAESBROUCK, Prof. Rob LAVIGNE, Prof. Daniel DESMECHT, Prof. Karsten BECKER, Dr Anne-Sophie RAO, Dr Léonard THERON, Dr Filip BOYEN, Dr Nina CHANISHVILI, Dr Maria ARGUDIN, Dr Dominique CASSART, Mr Didier VESELKO et Mr Michaël SARLET.

Un grand merci à tous mes collègues et collaborateurs du service de bactériologie et de la faune sauvage avec qui j'ai passé de beaux et précieux moments durant cette longue aventure, en occurrence le Prof. Annick LINDEN, les Drs Céline ANTOINE, Fanny LAFORET, Virginie GUERIN, Christophe LESENFANTS, Amaury VAN GOETHEM, Samuel KALPERS, Gautier

GILLIAUX, Mme Audrey HABETS, Audrey DEPAS, Mrs Julien PATERNOSTRE et Nicolas BORBOUX.

J'adresse un remerciement particulier au Professeur Pascal LEROY et au Professeur Laurent GILLET qui m'ont permis d'accéder à ma formation doctorale et m'ont ouvert les premières portes pour la réalisation de mon doctorat. Votre sympathie, votre ouverture d'esprit ainsi que votre bonté m'ont énormément marqué et je vous en serais toujours reconnaissant.

Ce travail n'aurait pu se réaliser sans le soutien financier des projets MAMMISCAN (SPW-DGARNE) et MRSA_BACTERIOPHAGE (ANIHWA ERA-Net et SPF Santé publique) dont je remercie vivement les organismes bailleurs de fond.

Je ne saurais terminer sans adresser mes remerciements aux membres internes ou externes à l'université de Liège ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, ainsi qu'un vibrant remerciement à la firme VESALE PHARMA qui a su très vite reconnaître la valeur de ce travail et de mon parcours.

Enfin j'adresse un remerciement chaleureux à l'endroit de tous mes amis et connaissances ainsi qu'à la communauté camerounaise et africaine de Liège (Belgique) pour leur accueil, leurs conseils et leur soutien durant mon parcours.

Au delà de tout, je rend grâce à Dieu pour le souffle de vie, la santé, la force et la foi m'ayant permis d'arriver à bon port.

Abréviations

°C	Degré celcius
µl	micro litre
30-G	30-gauge
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
Agl.	Agglutination
ANIHWA	Animal Health and Welfare
ANSCI	Animal Sciences
API	Appareils et Procédés d'Identification
ARN	Acide Ribonucleique
ARNr	Acide Ribonucleique ribosomique
BALB	Bagg and Albino Laboratory-bred
BREX	Bacteriophage Exclusion
CA	Community-Acquired
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CC	Clonal complex
ccr	Cassette chromosome recombinase
Cefox.	Cefoxitin
CFU	Colony-forming unit
Cl ⁻	Ion Chlorure
CL	Confluent lysis
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMT	California Mastitis Test
CNS	Coagulase negative staphylococci
Coag.	Coagulase
CPS	Coagulase-positive staphylococci
CRISPR-	
Cas	Clustered, Regularly Interspaced, Short Palindromic Repeat
CS	Cellules somatiques
Ct	Cycle threshold
DISARM	Defense island system associated with restriction modification
DPI	Days post-inoculation
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E.	Escherichia
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
EOP	Efficiency of plating
EUROSTAT	European Statistical Office
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
Fig	Figure
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FWO	Fonds Wetenschappelijk Onderzoek

G.	Galleria
Gent_	Gentamycin and PBS
Genta	Gentamicin
Gt	Gent
h	Hour
HA	Hospital-Acquired
Hémo.	Hémolytique
HPI	Hour post inoculation
I	Inoculum titer
ICTV	International Comittee on Taxonomy of Viruses
ID	Identification
IL	Interleukin
IS	Insertion sequence
ISP	Intravenous Staphylococcal Phage
IWG-SCC	International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements
J	Junction
K	Kappa coefficient
K.	Klebsiella
K+	Ion Potassium
L4/R4	Left/Right fourth abdominal mammary gland pair
LA	Livestock-Associated
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactate deshydrogenase
Lg	Liège
M	Molaire (mol par litre)
M.	Mycoplasma
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption-Ionization- time of flight
Marbo	Marbofloxacin
MBT	MALDI Bio Typer
mg	Milligram
MgSO ₄	Sulfate de Magnésium
MIC	Minimum inhibitory concentrations
min	Minute
MIX	Mix of phages and LB broth
ml	Milli liter
MLST	Multilocus Sequence Typing
mM	millimolaire
MRCNS	Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci
MRCPS	Methicillin resistant coagulase-positive staphylococci
MRNAS	Methicillin-Resistant Non-aureus Staphylococci
MRS	Methicillin Resistant Staphylococci
MRSA	Methicillin Resistant Staphylococcus aureus

MRSP	Methicillin Resistant Staphylococcus pseudintermedius
MSP	Mean spectra projections
MSSA	Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus
Mtase	Methyltransferase
Na ⁺	Ion Sodium
NaCl	Sodium chloride (chlorure de sodium)
NAGase	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase
NAS	Non-aureus staphylococci
NCTC	National Collection of Type Cultures
NI	Not Identified
NJ	New Jersey
nm	Nanomètre
No.	Number
NT	not typable
OD	Optical density
OmpC	Outer membrane porin C
OMVs	Outer Membrane Vesicles
ORF	Open Reading Frame
OS	Oslo
OS	Other species
P	p-value
pAgos	Protéines argonaute
PAM	Protospacer adjacent motif
PBP	Penicillin Binding Protéin
PBS	Phosphate buffered saline
PBS_PBS	PBS twice
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene glycol
PFU	Plaque-forming unit
PGF2 α	Prostaglandin F2 α
PGH	Peptidoglycan hydrolase
pH	Potentiel Hydrogène
PICI	Phage Inductible Chromosomal Island
PLE	PICI Like Element
PMN	Polymorphonuclear neutrophils
PVL	Panton-Valentin Leucocidin
qPCR	quantitative PCR
R	Resistant
RBP	Receptor Binding Protein
Rease	Restriction endonuclease
REM	Remus
R-M	Restriction-modification
ROM	Romulus
rpm	Rotation par minute
RUO	research

	use only
S	Susceptible (sensible)
S.	Staphylococcus
S_Gent	Bacteria and Gentamycin
S_ISP	Bacteria and ISP
S_MIX	Bacteria and the mix of the phages
S_REM	Bacteria and Remus
S_ROM	Bacteria and Romulus
SA	Staphylococcus aureus
SaPIs	Staphylococcus aureus Pathogenicity Islands
SARM	S. aureus résistants à la méticilline
SCC	Somatic Cells Count
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome
SCL	Semi confluent lysis
SNPs	Single polymorphism nucleotide
sp.	Subspecie
SPF	Specific-pathogen-free
SPW	Service publique wallon
ST	Sequence typing
Str.	Streptococcus
T.	Trueperella
TM	Trade mark
TNF- α	Tumour Necrosis Factor alpha
TRIS-HCL	Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane chlorhydrate
USA	United State Of America
UV	Ultra violet
V.	Vibrio
V/V	Volume par volume
VWR	Van Waters and Rogers
w/v	Weight on volume (Masse volumique)
WGS	Whole genome sequencing
WHO	World Health Organization
WMT	Wisconsin Mastitis Test
X10	Tenfold magnification
X100	100fold magnification
β - GlcNAc	β -N-acetylglucosamine

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ - ABSTRACT	1
PRÉAMBULE GÉNÉRAL.....	6
INTRODUCTION.....	8
1. LES STAPHYLOCOQUES RÉSISTANTS À LA MÉTICILLINE (MRS).....	9
1.1. Généralités	9
1.2. La résistance à la méticilline.....	10
1.3. Les MRSA et MRNAS chez l'homme	13
1.4. Les MRSA et MRNAS chez les animaux.....	14
2. LES MAMMITES BOVINES	19
2.1. Généralités	19
2.2. Pathogénie.....	19
2.3. Signes cliniques	20
2.4. Etiologie	22
2.5. Diagnostic des mammites bovines.....	23
2.6. Traitements antibiotiques et alternatives	26
3. LES BACTÉRIOPHAGES.....	30
3.1. Définition.....	30
3.2. Classification des bactériophages.....	30
3.3. Cycle des bactériophages.....	31
3.4. Interactions phage-bactérie	33
3.5. Phagothérapie	36
OBJECTIFS	42
SECTION EXPÉRIMENTALE.....	44
ETUDE 1 : CONSTITUTION DES COLLECTIONS DE STAPHYLOCOQUES.....	45
1.1. Préambule	46
1.2. Collections existantes de diverses origines	47
1.3. Collection « Mammiscan ».....	50

1.4. Collection « ANIHWA »	61
1.5. Résumé des collections	61
ETUDE 2 : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE DE LA RESISTANCE A LA METICILLINE DES MRSA ET MRNAS	62
2.1. Préambule	63
2.2. MRSA et MRNAS de différentes origines	64
2.3. MRSA et MRNAS de la collection « ANIHWA »	84
ETUDE 3 : EVALUATION DE L'EFFICACITE ANTI-STAPHYLOCOCCIQUE ET DE L'INNOCUITE DE BACTERIOPHAGES <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> , EN MODELES DE LARVES DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> ET DE MAMMITE MURINE	99
3.1. Préambule	100
3.2. Evaluation thérapeutique <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des bactériophages contre les souches de <i>S. aureus</i> responsables de mammites bovines	100
DISCUSSION GÉNÉRALE	112
1. IMPACT ÉCONOMIQUE DES MAMMITES BOVINES EN EUROPE.....	113
2. SOLUTIONS NON-ANTIBIOTIQUES DE LUTTE CONTRE LES MAMMITES BOVINES	113
3. PHAGOTHÉRAPIE DES MAMMITES BOVINES.....	114
4. DIAGNOSTIC DES MAMMITES BOVINES	117
5. STAPHYLOCOQUES RÉSISTANTS À LA MÉTICILLINE ET MAMMITES BOVINES	119
CONCLUSION - PERSPECTIVES	121
BIBLIOGRAPHIE	124

Résumé - Abstract

Résumé

La production laitière, une des principales denrées alimentaires en Europe et particulièrement en Belgique, est souvent confrontée à de nombreux problèmes ayant un impact important sur l'économie. Cet impact économique est le résultat d'une baisse de la production laitière, des pénalités infligées suite au nombre élevé de cellules somatiques dans le lait ($>4 \times 10^5$ cellules/ml en citerne), de l'abattage des vaches atteintes de mammites incurables et du traitement aux antibiotiques (Halasa et al., 2007; Stevens et al., 2016; Ashraf and Imran, 2018). Le traitement antibiotique peut induire l'apparition et la sélection des résistances bactérienne dont la résistance à la pénicilline qui est l'une des plus rencontrées dans les cas de mammites bovines et concerne les staphylocoques (*aureus* et *non aureus*) portant le nom de Staphylocoques résistants à la pénicilline (MRS) (Cohn and Middleton, 2010). Les MRS sont de véritables dangers pour la santé publique suite à leur potentiel zoonotique et la transférabilité de la résistance entre différentes espèces de staphylocoques (Becker et al., 2018; Lakhundi and Zhang, 2018).

La nécessité de trouver des alternatives aux antibiotiques pour le traitement des mammites bovines est donc devenue une priorité en termes de santé publique (Ciorba et al., 2015; Leimbach, 2017). Les alternatives potentielles concernent principalement l'utilisation à titre préventif ou curatif de nouveaux produits dont les bactériophages qui, suite à leur nombreux avantages par rapport aux antibiotiques font d'eux des produits de choix (Angelopoulou et al., 2019). En plus, des études récentes ont montré une efficacité de l'utilisation des phages dans la lutte contre les mammites bovines suite à leur effet antibactérien (lyse bactérienne) aussi bien en test *in vitro* et qu'en modèle murin (Zhou et al., 2017; Iwano et al., 2018; Angelopoulou et al., 2019).

Sur la base de ces constats, l'objectif principal de notre travail de thèse a été d'effectuer une évaluation de l'utilisation thérapeutique des bactériophages en tant qu'alternative de lutte contre les mammites bovines dues à *S. aureus*. Pour atteindre cet objectif, plusieurs études ont été menées consistant à constituer une collection de staphylocoques issus de diverses origines (étude 1), à identifier et caractériser les MRS particulièrement responsables de mammites bovines (étude 2) et enfin à évaluer l'efficacité thérapeutique de certains bactériophages sur les souches de *S. aureus* responsables des mammites bovines issues de notre collection (étude 3).

L'étude 1 nous a révélé que 83% des souches de notre collection sont des staphylocoques isolés à partir des échantillons de lait de vaches atteintes de mammites. La plupart de ces souches ont été prélevées en Belgique et montrent une certaine présence des MRS, synonyme de l'utilisation abusive des antibiotiques en production animale. La majorité des souches responsables des mammites bovines identifiées dans cette étude sont représentées par les *S. aureus*, bien que les staphylocoques à

coagulase négative (CNS) constituent également une population bactérienne importante, en particulier chez les souches résistantes à la pénicilline en Belgique. Elle nous révèle également que la comparaison des résultats de la bactériologie classique (MALDI-TOF) et du test de qPCR (Pathoproof[®]) pour le diagnostic des mammites bovines présente un taux de concordance de l'ordre de 67%. Les deux méthodes, présentant chacune des avantages et des inconvénients, ont été jugées complémentaires dans le but d'un meilleur diagnostic.

Dans l'étude 2, la caractérisation des MRS de notre collection a permis d'identifier majoritairement la cassette chromosomique staphylococcique (SCCmec) de type IV chez les bovins en Belgique. Les limites des tests de typage (phénotypiques et génétiques), l'identification de potentielles nouvelles cassettes SCCmec ainsi que la nécessité de réfléchir à instaurer une nouvelle classification des cassettes au sein des CNS ont été mis en évidence.

L'étude 3 a permis quant à elle d'observer une activité *in vitro* de phages dirigés contre certaines souches de *S. aureus* matérialisée par une lyse bactérienne aussi bien en gélose qu'en bouillon. Une efficacité a également été observée *in vivo*, matérialisée par une diminution des titres bactériens aussi bien en modèle de larves *Galleria (G.) mellonella* qu'en modèle de mammite murine ainsi qu'une inflammation partielle des mamelles de souris, dans les groupes infectés et traités par les phages.

En conclusion, notre étude contribue à apporter des éléments de réponse sur les méthodes de diagnostic des mammites bovines et sur les MRS en cause. Cette étude vient compléter les études existantes en ce qui concerne l'évaluation de la phagothérapie des mammites bovines par des tests *in vitro* et *in vivo*. Elle permet également de montrer l'intérêt du modèle expérimental intermédiaire entre l'*in vitro* et l'*in vivo* en larves *G. mellonella* pour l'évaluation de l'efficacité des phages contre les souches de *S. aureus* responsables des mammites bovines. Plusieurs perspectives sont envisageables à la suite de cette étude dans le but d'améliorer nos résultats et d'approfondir nos connaissances sur le sujet. Entre autres, une modification de certains paramètres tels que le rapport phage/bactérie et leur voie d'inoculation par des études complémentaires *in vivo* pourrait permettre d'améliorer les résultats sur l'efficacité des phages. Certains facteurs tels que l'immunité ainsi que la présence dans le lait de substances pouvant influencer l'action des phages devraient aussi être étudiés dans le but de leur maîtrise lors de l'évaluation *in vivo* de l'efficacité des phages. Enfin, l'intégration d'une nouvelle classification de cassette au sein des CNS dans le futur apparaîtra comme l'un des aboutissements de ce travail.

Summary

Milk production, one of the main foodstuffs in Europe and particularly in Belgium, is often faced with problems which each have significant impacts on economies. Indeed, decreases in milk production, penalties imposed for the high number of somatic cells in milk ($> 4 \times 10^5$ cells / ml in tanks), the slaughter of cows with incurable mastitis, and antibiotic treatment each contribute to these economic losses (Halasa et al., 2007; Stevens et al., 2016; Ashraf and Imran, 2018). Antibiotic treatment will lead to the emergence of antimicrobial resistances such as methicillin resistance which is one of the most encountered in bovine mastitis and concerns staphylococci species (*S. aureus* and non-*aureus*) called methicillin resistant staphylococci (MRS) (Cohn and Middleton, 2010). The MRS represents a threat for public health due to their zoonotic potential and the transferability of the resistance between different staphylococcal species (Becker et al., 2018; Lakhundi and Zhang, 2018).

Following these antibiotic resistance problems, farmers are increasingly exploring non-antibiotic alternatives for the treatment of bovine mastitis (Ciorba et al., 2015; Leimbach, 2017). These alternatives nowadays mainly involve the preventive or curative use of new products among which bacteriophages are some of the most promising because of their high advantages relative to antibiotics (Angelopoulou et al., 2019). In addition, recent studies have suggested the efficacy of this approach when using phages and phage endolysins against bovine mastitis both in *in vitro* assays and in mouse models (Zhou et al., 2017; Iwano et al., 2018; Angelopoulou et al., 2019).

Building on these observations, the main objective of this thesis was to carry out an evaluation of the therapeutic use of bacteriophages as an alternative to antibiotics against bovine mastitis mediated by *S. aureus*. To achieve this objective, several studies have been conducted consisting of building up a collection of staphylococci from various origins (study 1), identifying and characterizing the MRS particularly responsible for bovine mastitis (study 2), and finally evaluating the therapeutic efficacy of some bacteriophages on *S. aureus* strains from our collection responsible for bovine mastitis (study 3).

The study 1 revealed that 83% of the staphylococci strains in our collection were isolated from milk sample of cows with mastitis. Most of these samples were collected in Belgium and showed a certain presence of MRS reflecting the overuse of antibiotics in animal production. The majority of the strains responsible for bovine mastitis in this study were identified as *S. aureus*, although coagulase negative staphylococci (CNS) also constitute a large bacterial population, in particular among strains resistant to methicillin in Belgium. This study also reveals that the comparison of two bovine mastitis diagnostic tests results, classical bacteriology (MALDI-TOF) and qPCR (Pathoproof®), showed a concordance rate of around 67%. The two methods, each with advantages and disadvantages, were considered to be complementary for a better diagnosis.

In study 2, the characterization of MRS in our collection enabled the identification of the SCCmec (staphylococcal cassette chromosome) type IV as predominantly present in cattle in Belgium. The limits of typing tests (phenotypic and genetic), the identification of potential new SCCmec as well as the need to think about establishing a new classification of cassettes within the CNS were also highlighted in this study.

The study 3, has made it possible to observe the *in vitro* activity of phages against the strains of *S. aureus* tested, mediated by a bacterial lysis both in agar and broth media. Efficacy was also observed *in vivo*, as shown by a decrease of the bacterial titers both in *Galleria (G.) mellonella* larvae and murine mastitis model and a partial infection of the mice mammary glands in the groups infected and treated with phages.

In conclusion, this study provides some relevant finding as well as for the diagnostic methods of bovine mastitis and the MRS involved. Our work complements the studies carried out with regard to the assessment of phage therapy in bovine mastitis by *in vitro* and *in vivo* tests. It also makes it possible to show the interest of the experimental intermediate model between *in vitro* and *in vivo* using *G. mellonella* larvae when assessing the phage efficacy against *S. aureus* strains responsible for bovine mastitis. Several perspectives are possible following this study in order to improve our results and deepen our knowledge on the subject. Among others, a modification of some parameters such as the phage / bacteria ratio and their inoculation route by additional *in vivo* studies could make it possible to improve the results of the phages efficacy. Others factors such as immune system as well as the presence in milk of some proteins or lipids which can influence the phages effectiveness could be also studied in order to control them during the *in vivo* evaluation of the phages efficacy. Finally, the successful establishing a new classification of cassettes within the CNS in the future will appear as one of the achievements of this work.

Préambule général

Le travail effectué au cours de cette thèse se répartit en 4 grandes parties.

La première partie consiste en une introduction générale consacrée à une synthèse bibliographique sur les staphylocoques résistants à la méticilline, les mammites bovines et les bactériophages ainsi que leur application en tant qu'agent antibactérien particulièrement dans les cas des mammites bovines.

La deuxième partie quant à elle pose et explique de façon détaillée les objectifs de notre travail.

Dans la troisième partie, appelée partie expérimentale, l'ensemble du travail a été réalisé sur des collections de staphylocoques de diverses origines et isolés à différentes périodes, selon le projet spécifique de recherche concerné. Par conséquent, ces souches de staphylocoques n'ont pas suivi exactement le même protocole d'analyse durant notre propre étude. Néanmoins, l'un de nos objectifs principaux étant l'identification des staphylocoques résistants à la méticilline, toutes les souches identifiées au genre *Staphylococcus* et résistantes à la méticilline ont été identifiées à l'espèce, puis typées phénotypiquement et génétiquement, suivant le même schéma. L'ensemble des résultats est présenté en 3 études sous forme d'articles scientifiques ou de travaux non encore publiés. La première étude est consacrée à la constitution d'une collection de staphylocoques issus de diverses origines. La deuxième étude quant à elle vient identifier et caractériser les staphylocoques résistants à la méticilline en mettant un accent particulier sur ceux responsables des mammites bovines. Enfin, la troisième étude consiste en une évaluation de l'efficacité anti-staphylococcique et de l'innocuité de bactériophages *in vitro* et *in vivo*, en modèles de larves de *Galleria mellonella* et de mammite en souris sur les souches de *S. aureus* responsables des mammites bovines de notre collection.

La quatrième et dernière partie consiste en une discussion de l'ensemble de notre travail suivie d'une conclusion et de perspectives éventuelles.

Introduction

1. LES STAPHYLOCOQUES RÉSISTANTS À LA MÉTICILLINE (MRS)

1.1. Généralités

Les staphylocoques sont des bactéries à coques Gram positifs, aéro-anaérobies et catalase positives, dont la plupart des espèces pathogènes produisent une coagulase. Ce sont des bactéries ubiquistes et commensales qui colonisent la peau, les muqueuses, le tractus urogénital et/ou le tractus digestif d'environ un tiers des êtres humains en bonne santé (Kluytmans and Wertheim, 2005). Lorsqu'elles se retrouvent en dehors de leur niche normale, elles peuvent devenir pathogènes, entraînant une inflammation des tissus et diverses maladies chez l'homme et les animaux.

Le genre *Staphylococcus* (S.) dispose de 44 espèces et sous-espèces (Tableau 1) définies sur base de critères reconnus par l'ensemble des taxonomistes (pourcentages de ré-association ADN/ADN, stabilité des ADN hybrides, séquences d'ARNr16S et caractères phénotypiques distinctifs) (Michele Bes al, 2002; Coates-Brown et al., 2018). De façon générale, il est possible de distinguer les staphylocoques à coagulase positive (qui produisent une coagulase), dont l'espèce principale est *S. aureus*, mais qui comprennent également les espèces suivantes : *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae* (Sasaki et al., 2010), et les staphylocoques à coagulase négative (SCN) qui ne produisent pas de coagulase et comprennent le reste des espèces de staphylocoques.

Les antibiotiques utilisés pour lutter contre les infections à staphylocoques peuvent induire une sélection de souches résistantes, dont les staphylocoques résistants à la méticilline (« Methicillin Resistant Staphylococci » ou « MRS »), qui sont répartis en « MRSA » pour « Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* » et « MRNAS » pour « Methicillin-Resistant Non-*aureus* Staphylococci » (Cohn and Middleton, 2010). Les MRS, particulièrement les MRSA, mais aussi certains MRNAS comme *S. epidermidis*, constituent un problème majeur en médecine humaine dans le monde entier, bien que leurs prévalences soient géographiquement très différentes (Sader et al., 2010; Watanabe et al., 2016), variant de 13 et 74% (MRSA) et de 1 à 60% (MRNAS) selon les pays (Stefani and Varaldo, 2003; Johnson, 2011; Hassoun et al., 2017). De plus, l'émergence des MRSA d'origine animale et leur potentiel de transfert vers l'homme constituent une menace pour la santé publique. Un diagnostic approfondi suivi d'une approche prophylactique efficace sont nécessaires pour contrôler, voire résoudre ce problème (Daley et al., 2016).

Tableau 1 : Espèces du genre *Staphylococcus* (Michele Bes al, 2002; Coates-Brown et al., 2018)

Espèces isolées principalement chez les humains	Espèces isolées principalement chez les animaux	Espèces isolées chez les humains et les animaux	Espèces isolées principalement dans l'environnement
<i>S. capitis</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. argenteus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. delphini</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. agnetis</i>
<i>S. leei</i>	<i>S. devriesei</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. caeli</i>
<i>S. pettenkoferi</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. carnosus</i>
<i>S. schleiferi</i>	<i>S. felis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. cornubiensis</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. fleurettii</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. condimenti</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. pasteurii</i>	<i>S. debuckii</i>
<i>S. hominis</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. edaphicus</i>
<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. intermedius</i>
	<i>S. lutrae</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. jettensis</i>
	<i>S. microti</i>		<i>S. kloosii</i>
	<i>S. nepalensis</i>		<i>S. lyticans</i>
	<i>S. pseudintermedius</i>		<i>S. massiliensis</i>
	<i>S. rostri</i>		<i>S. muscae</i>
	<i>S. simiae</i>		<i>S. petrasii</i>
	<i>S. chromogenes</i>		<i>S. pettenkoferi</i>
			<i>S. piscifermentans</i>
			<i>S. pseudolugdunensis</i>
			<i>S. pulvereri</i>
			<i>S. schweitzeri</i>
			<i>S. stepanovicii</i>
			<i>S. succinus</i>
			<i>S. vitulinus</i>

1.2. La résistance à la métricilline

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être liée soit à des facteurs intrinsèques (résistances constitutives), soit à des mutations au sein de gènes présents ou à l'acquisition spontanée de gènes provenant d'une autre bactérie, par transformation (transfert d'ADN libre à partir de

l'environnement), par conjugaison (transfert de plasmides), voire par transduction (transfert d'ADN bactérien par l'intermédiaire de bactériophages) (résistances acquises) (Tenover, 2006).

La pénicilline G et les autres antibiotiques de la classe des β -lactames (dérivés de pénicilline G, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames) agissent sur les staphylocoques en se liant à une transpeptidase, « Protéine Liant la Pénicilline » (PLP) ou « Penicillin Binding Protéin » (PBP), impliquée dans la synthèse du peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne. Cette interaction va entraîner un blocage de la synthèse du peptidoglycane suivi de sa dégradation et, par conséquent, une lyse de la bactérie (Cohn and Middleton, 2010).

Les staphylocoques utilisent deux stratégies principales pour résister aux β -lactames : l'inactivation enzymatique de l'antibiotique ou la modification de sa cible. La première stratégie consiste en la production d'une enzyme (β -lactamase) qui va hydrolyser le cycle β -lactame, désactivant ainsi ses propriétés antibiotiques. Néanmoins, l'action de la β -lactamase peut être contrecarrée par des inhibiteurs tels que le clavulanate et le sulbactam qui agissent en leurre. La seconde stratégie consiste en la production par la bactérie d'une « PBP » modifiée par mutation du gène présent ou par acquisition d'un gène nouveau. Cette dernière bactérie possède une affinité réduite, voire nulle, pour les β -lactames rendant ces molécules moins efficaces, voire inefficaces contre elle (Arias and Murray, 2009).

La méticilline est un antibiotique de la classe des β -lactames non inactivé par la β -lactamase de type pénicillinase BlaZ, produite par les staphylocoques. Elle a été découverte fin des années 1950, mais peu de temps après sa mise sur le marché, en 1961, des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (« MRSA ») ont été signalées dans un hôpital au Royaume-Uni (Rolinson et al., 1961). Les MRSA sont résistants à tous les β -lactames actuellement disponibles (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, monobactames) ainsi qu'aux inhibiteurs de β -lactamase et sont, de nos jours, répandus dans le monde entier chez l'homme et chez les animaux (Aires-de-Sousa, 2017). De plus, des souches de diverses autres espèces de staphylocoques, dont certaines d'importance en santé publique peuvent aussi montrer une résistance à la méticilline (« MRNAS ») (Stefani and Varaldo, 2003).

La base de la résistance à la méticilline des staphylocoques repose sur la production d'une PBP différente, appelée PBP2a, codée par un gène nouvellement acquis. Trois gènes (*mecA*, *mecB* et *mecC*) ont été décrits dans le genre *Staphylococcus* principalement chez *S. aureus*, tandis que deux gènes (*mecB* et *mecD*) ont été décrits dans le genre *Micrococcus* chez *Micrococcus caseolyticus*. Ces 4 gènes *mec* partagent entre 60 et 70% d'homologie de séquence nucléotidique et peuvent se subdiviser également en allotypes qui partagent entre 70 et 95% d'homologie de séquence entre eux, tels que *mecA1*, *mecA2*, *mecC1* et *mecC2* (Fig. 1). Le gène *mec B* peut être soit chromosomique chez

Macrocooccus caseolyticus, soit plasmidique chez *Macrocooccus caseolyticus* ou *S. aureus*, tandis que le gène *mecD* a été identifié sur un îlot de résistance génomique. Quant aux gènes *mecA* et *mecC*, ils sont essentiellement chromosomiques et portés par des éléments génétiques mobiles appelés « Cassette Chromosomique Staphylococcique » ou « Staphylococcal Cassette Chromosome » (SCC*mec*), intégré dans le chromosome bactérien et permettant le transfert, par transduction, de la résistance entre différentes souches et espèces du genre *Staphylococcus* (Becker et al., 2018; Lakhundi and Zhang, 2018).

Les SCC*mec* des staphylocoques (SCC*mecA* et SCC*mecC*) ont une structure génétique commune constituée d'un complexe *mec*, d'un complexe *ccr* (« cassette chromosomique recombinase »), de différentes régions J (régions de jonction) et sont bordées par des séquences répétées directes ou inverses qui leur permettent de s'intégrer par recombinaison site-spécifique à hauteur de l'extrémité 3' du gène *orfX*.

Le complexe *mec* comprend les gènes *mec* (*A* ou *C*), les gènes régulateurs (*mecR1* et *mecI*) ainsi que des séquences d'insertion (IS431 ou IS1272). Le complexe *ccr* est constitué par les gènes *ccr* (*A*, *B* ou *C*) qui codent pour une recombinase d'intégration ou d'excision et est entouré d'un ORF (« Open Reading Frame ») de fonction inconnue (Fig. 2). Les combinaisons des différents éléments présents au sein de chaque complexe permettent de distinguer, d'une part, 5 classes du complexe *mec* (classes A, B, C, D et E) subdivisées elles-mêmes en allotypes et, d'autre part, 9 types du complexe *ccr* (de 1 à 9) issus de la combinaison des allotypes des gènes *ccr* A, B et/ou C (Fig. 3, 4) (Lakhundi and Zhang, 2018). Les régions J sont un troisième élément des SCC*mec* constituées de la région J1 située entre la jonction droite du chromosome et le complexe *ccr*, de la région J2 située entre le complexe *ccr* et le complexe *mec* et de la région J3 située entre le complexe *mec* et la jonction gauche du chromosome (gène *orfX*).

Les combinaisons entre les différents éléments du complexe *mec* et du complexe *ccr* permettent donc de définir le type de cassette spécifique à chaque souche MRSA, tandis que les variations au sein de la région J permettent de définir les sous-types de chaque cassette. Il existe actuellement 14 types de cassettes numérotées en chiffre romain de I à XIII et 5 sous-types définis par le « Groupe international de travail sur la classification des éléments de la cassette chromosomique staphylococcique » (IWG-SCC, 2019) (Fig. 5) (Ito et al., 2009).

Les SCC*mec* contiennent également des séquences d'insertion permettant l'incorporation d'autres gènes de résistance aux antibiotiques. Ces recombinaisons site-spécifiques expliquent pourquoi de nombreux MRS sont également résistants à des molécules autres que les β -lactames, telles que les macrolides (Holden et al., 2004; Barton et al., 2006; Descloux et al., 2008).

<i>mec</i> gene type	<i>mec</i> gene allotype	Same allotype
DNA sequence similarity <70%	DNA sequence similarity ≥70% and <95%	DNA sequence similarity ≥95%
mecA	<i>mecA</i>	<i>S. aureus</i> N315* and numerous others
	<i>mecA1</i>	<i>S. sciuri</i> K11*, <i>S. sciuri</i> TXG-24, and others
	<i>mecA2</i>	<i>S. vitulinus</i> CSB08*, <i>S. vitulinus</i> SVMP01, and others
mecB	<i>mecB</i>	<i>M. caseolyticus</i> JCSC402*, <i>M. caseolyticus</i> KM45013, and others
mecC	<i>mecC</i>	<i>S. aureus</i> LGA251*, and others
	<i>mecC1</i> (<i>S. xylosus</i> S04009*)	
	<i>mecC2</i> (<i>S. saprophyticus</i> 210*)	
mecD	<i>mecD</i> (<i>M. caseolyticus</i> IMD0819*)	

Figure 1 : Gène *mecA* et ses homologues (Lakhundi and zang, 2018)

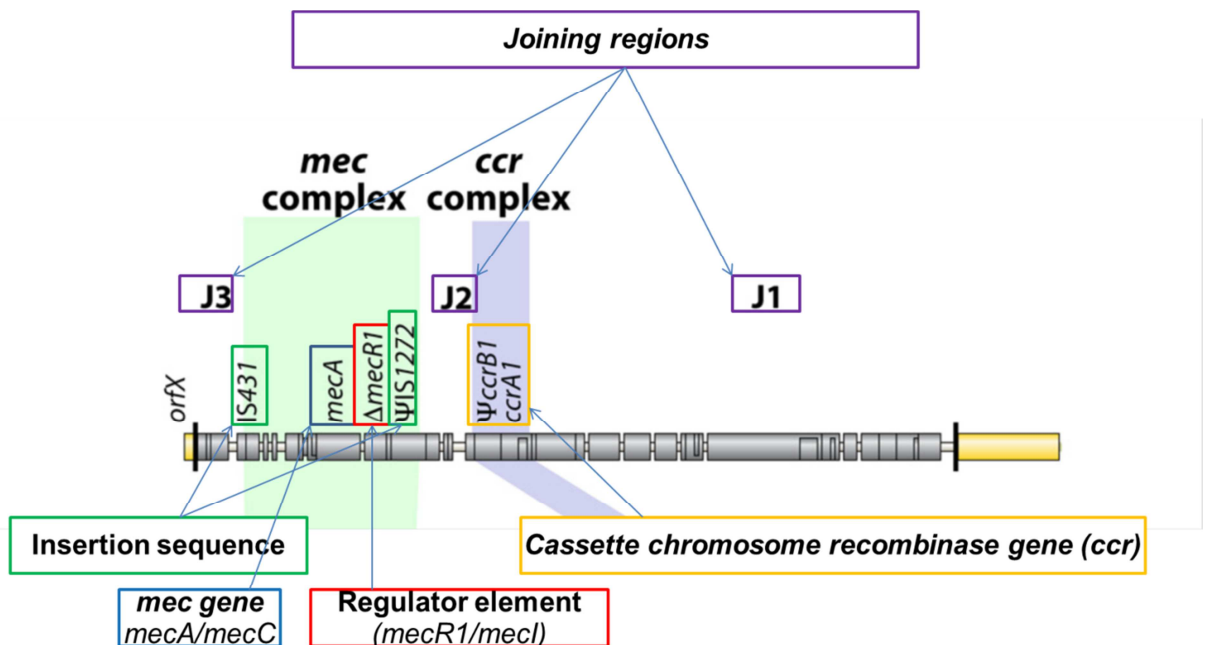


Figure 2. Structure générale de la cassette chromosomique staphylococcique *mec* (*SCCmec*) (adapté de Hiramatsu et al, 2013)

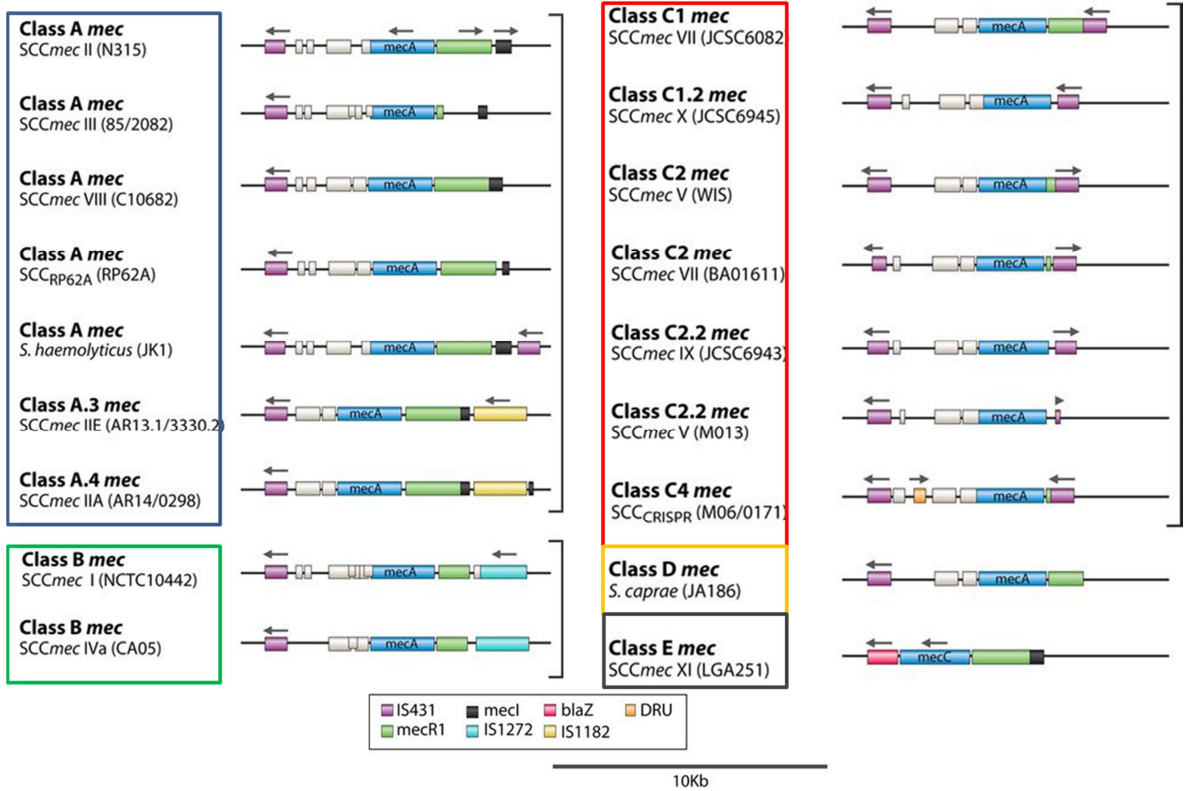


Figure 3. Classes du complexe *mec* (Lakhundi and Zhang, 2018).

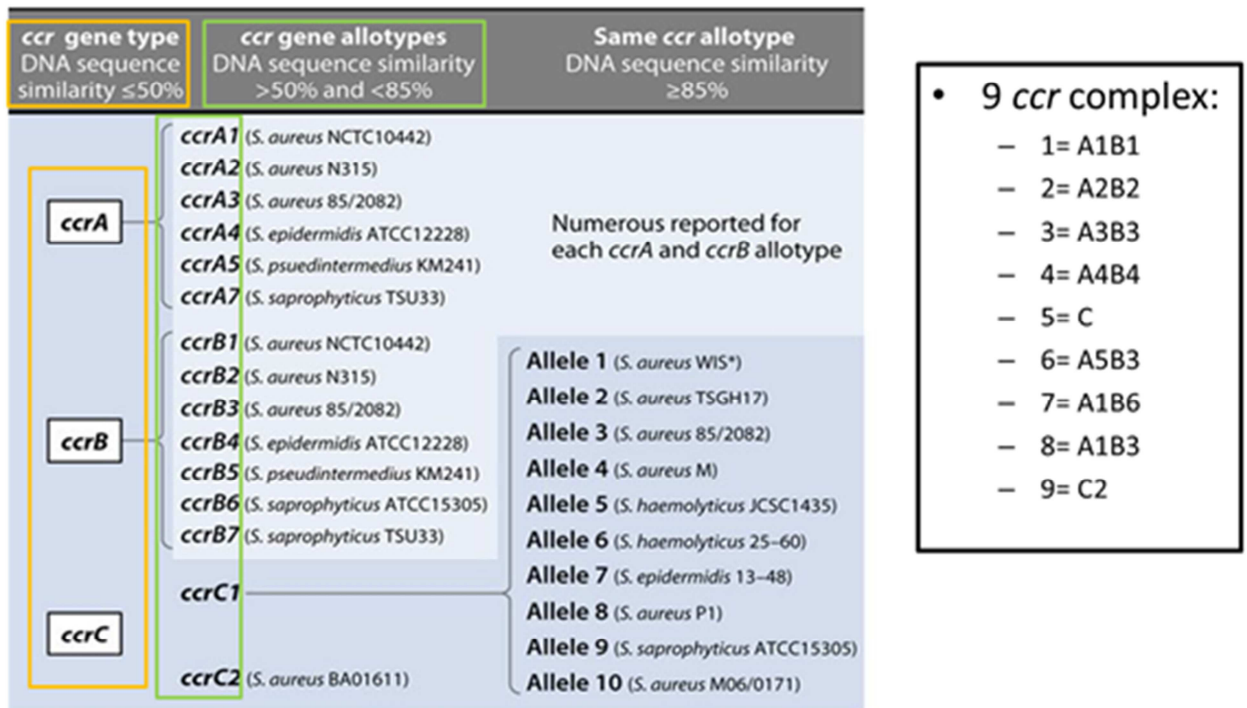


Figure 4. Types de la cassette chromosomique recombinase (adapté de Lakhundi and Zhang, 2018)

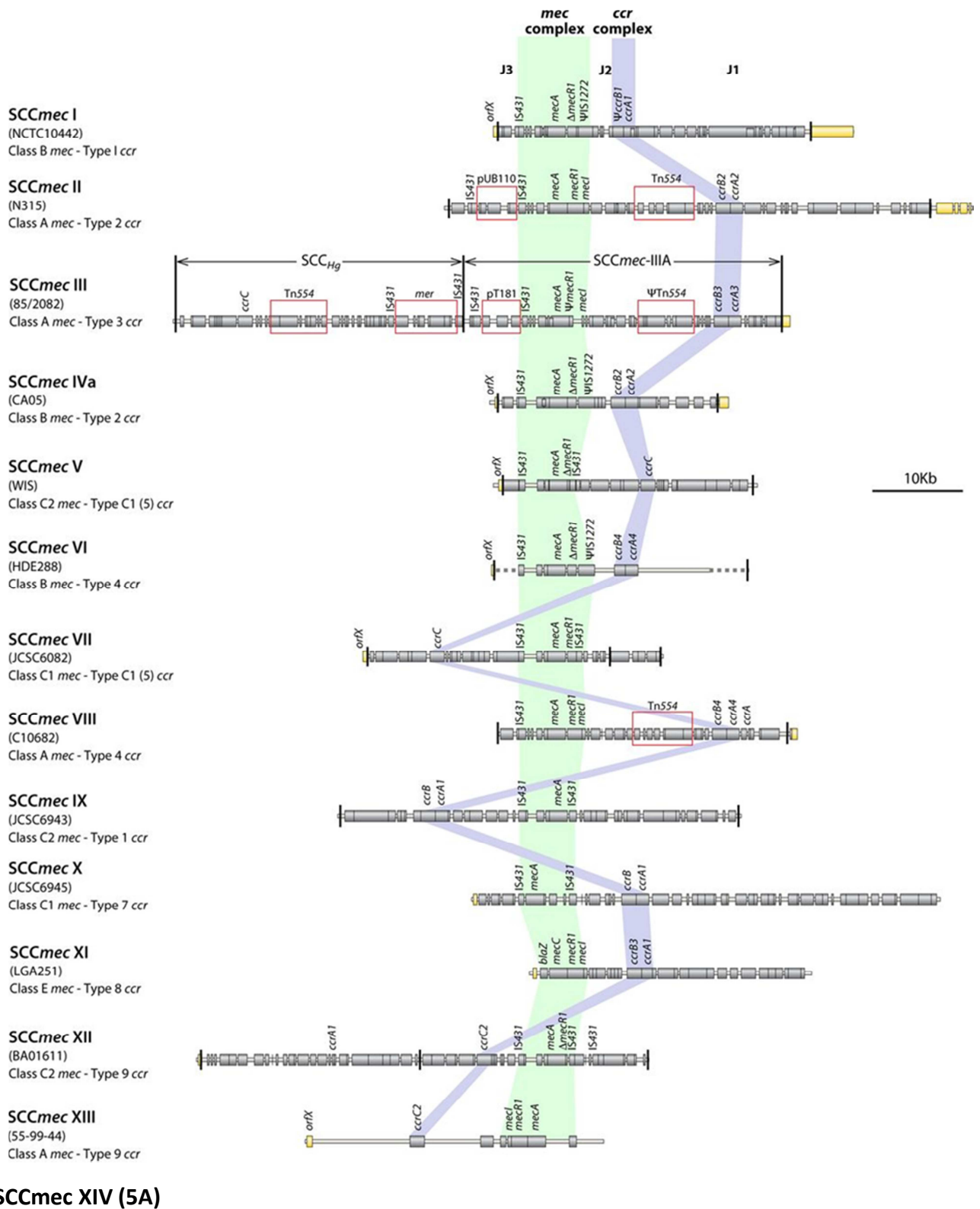


Figure 5. Types de la cassette chromosomique staphylococcique *mec* (SCC*mec*) (Baig et al., 2018)

1.3. Les MRSA et MRNAS chez l'homme

Chez l'homme, deux grands types de MRSA ont été décrits : ceux acquis en hôpitaux « Hospital-Acquired (HA) MRSA » et ceux acquis hors des hôpitaux « Community-Acquired (CA) MRSA ». Les premières souches humaines de MRSA détectées étaient d'origine hospitalière (HA-MRSA), dans un hôpital britannique en 1961. Depuis lors, les HA-MRSA n'ont cessé de poser de nombreux problèmes dans les hôpitaux et les établissements de soins de longue durée (McCarthy and Lindsay, 2010). En 2010, on estimait que plus de 150.000 personnes étaient infectées chaque année par des MRSA dans les établissements de santé dans l'Union européenne (Köck et al., 2010). De nos jours, les HA-MRSA sont répandus dans le monde entier et possèdent cinq lignées majeures ou CC (« complexes clonaux ») identifiées sur base d'une combinaison des tests de typage du gène « *spa* » et de 7 gènes de ménage (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL*) « MLST » (« Multilocus Sequence Typing ») (O'Hara et al., 2016) : CC5, CC8, CC22, CC30 et CC45. La plupart de ces lignées possèdent des *SCCmecA* de types I, II ou III, portant également des gènes de résistance à d'autres antibiotiques. Bien que de nombreuses études montrent que les infections aux HA-MRS ont diminué au cours des dernières années, la menace est toujours présente en raison de la chronicité de l'infection avec persistance de la bactérie dans les tissus pendant de longues périodes (Kourtis et al., 2019). Ces HA-MRSA sont, en effet, responsables de nombreuses maladies, allant de troubles cutanés bénins aux infections invasives, avec un pronostic vital sévère chez les personnes immunodéprimées.

Les CA-MRSA provoquent généralement des problèmes cliniques modérés de la peau et des tissus mous, le plus fréquemment chez des personnes jeunes et en bonne santé. Dans certains cas cependant, ces infections peuvent être plus graves et invasives, en fonction de la virulence des souches qui peuvent appartenir à un virulotype plus agressif. Les CA-MRS ont été signalés pour la première fois en Australie au début des années 90, mais ont rapidement émergé dans d'autres pays, alors qu'auparavant les infections aux CA-MRSA étaient sporadiquement observées dans les communautés extra-hospitalières. Les CA-MRSA possèdent généralement des *SCCmec* plus petits (types IV ou V) et sont sensibles à davantage d'autres classes d'antibiotiques que les HA-MRSA (David and Daum, 2010). Par contre, de nombreuses souches de CA-MRSA produisent une toxine, la « Panton-Valentin Leucocidin » (PVL), qui lyse les globules blancs (neutrophiles, monocytes, macrophages) et n'est pas couramment produites par les HA-MRSA. De nos jours, la véritable différence entre HA-MRSA et CA-MRSA repose principalement sur les différences génétiques révélées par l'identité des *SCCmecA* et par l'appartenance à différents complexes clonaux (CC1, CC8, CC30, CC59, CC80 pour les CA-MRSA), plutôt que par l'origine hospitalière ou communautaire (Otter and French, 2011).

Le transfert de la cassette *SCCmec* entre les souches de *S. aureus* et les autres espèces de staphylocoques telles que les coagulase négatives pourrait expliquer l'existence des staphylocoques non *aureus* résistants à la méticilline chez les humains (Wielders et al., 2002). Les MRNAS, tout

comme les MRSA chez l'homme, sont responsables d'infections de la peau et des muqueuses, mais peuvent dans certaines conditions devenir plus sévères et entraîner des infections cardiovasculaires, des articulations, voir une septicémie (Yamada et al., 2017). Les MRNAS sont largement répandus dans différents pays dans le monde et leur proportion peut varier de 60 à 70% parmi les CNS (Stefani and Varaldo, 2003; Loncaric et al., 2019). Leur typage génétique permet de mettre en évidence les complexes clonaux CC5 et CC11 principalement chez *S. epidermidis* qui en est l'espèce majoritaire (Gómez-Sanz et al., 2019). En ce qui concerne les SCCmec, les types II, III, IV et V ont été détectés chez *S. epidermidis*, le type IX chez *S. haemolyticus*, les types II et VIII chez *S. hominis* et les types III et V chez *S. capitis*. La résistance à la pénicilline a également été détectée chez certaines espèces telles que *S. warneri*, *S. saprophyticus*, et *S. sciuri* (Ho et al., 2016).

La classification des MRSA chez les humains se base sur les typages MLST et *spa* qui définissent les complexes clonaux (CC) avec une particularité en Amérique où l'appellation USA est utilisée pour désigner les CA MRSA (ex: CC5= USA100). Contrairement aux souches MRSA humaines, les souches MRSA animales sont le plus souvent décrites sur base des MLST sans tenir compte du gène *spa*.

1.4. Les MRSA et MRNAS chez les animaux

1.4.1. Généralités

Chez les animaux, les MRSA et MRNAS sont responsables d'infections du bétail, des animaux de compagnie et de certains animaux sauvages. L'épidémiologie et les souches prédominantes diffèrent cependant d'un animal à l'autre (McCarthy et al., 2012; Spiliopoulou and Petinaki, 2015). Le premier cas d'infection par MRSA chez un animal a été détecté en 1972 chez des vaches laitières atteintes de mammite en Belgique (Devriese, 1975). Par la suite, d'autres rapports ont documenté la présence de HA-MRSA et de CA-MRSA chez d'autres espèces animales. Ces premiers cas chez les animaux pourraient résulter de la transmission de souches HA-MRSA ou CA-MRSA de l'homme à l'animal (Hartmann, Trostle, 1997; Seguin et al., 1999; Middleton et al., 2005); En 2003 cependant, une souche MRSA animale, appartenant au type MLST 398 [ou ST (sequence typing) 398] a été détectée pour la première fois chez des porcs aux Pays-Bas et a été désignée comme « MRSA associée au bétail » (« Livestock-Associated MRSA » ou « LA-MRSA ») (van Loo et al., 2007; Fluit, 2012). Cette souche s'était répandue exclusivement en Europe et en Amérique, contrairement à la souche ST9 qui a été la première souche animale à être détectée en Asie (Chine) en 2008 dans une ferme porcine (Wagenaar et al., 2009). Par la suite, des souches LA-MRSA appartenant à d'autres MLST (ST1, ST8) ont été décrites, notamment chez les chevaux (Fitzgerald, 2012).

Des études récentes ont montré que les MRNAS ont une origine plus primitive que les MRSA et concernent *S. fleurettii* qui est une espèce commensale exclusivement animale ainsi que les espèces

S. sciuri et *S. vitulinus* partageants une certaine homologie pour le gène *mecA* (Tsubakishita et al., 2010a). Bien que leur documentation ne soit pas très poussée, les souches MRNAS (*S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. lentus*, *S. pseudo intermedius*, *S. sciuri*) se sont très rapidement répandues chez les animaux (porcs, bovins, chevaux, chiens et chats) et concernaient principalement le ST398 et les cassettes de type I, III, IV, V et VI (Garza-González et al., 2010a; Weese and van Duijkeren, 2010).

1.4.2. Espèce porcine

Même si le porc est l'une des espèces animales les plus infectées par les MRS, les pathologies sont relativement légères à l'exception de certaines telles que des dermatites exudatives, des infections du tractus urinaire et le syndrome de mammité-métrite-agalactie (Atyah MA1, Zamri-Saad M, 2010; Weese and van Duijkeren, 2010). Les cassettes SCC*mec* de types I et V (Zhang et al., 2009) sont les plus majoritaires chez les porcs. La transmission d'un porc à l'autre peut se faire par voie nasale dans le même enclos mais la propagation est facilitée par la taille du troupeau et le grand nombre de porcs importés (Doyle et al., 2012). Les porcs sont majoritairement infectés par la souche LA-MRSA ST398 et constituent un réservoir important de cette souche pour différentes autres espèces animales (Price et al., 2012). De nos jours, la souche LA-MRSA ST398 est répandue principalement sur le continent européen avec des prévalences de 58-79% en Espagne (Denis et al., 2009; Pomba et al., 2010), 70% en Allemagne et 44% en Belgique (Smith et al., 2009) et sur continent américain à raison de 70% aux USA (Khanna et al., 2008; Golding et al., 2011). La souche LA-MRSA ST9 a également été décrite chez les porcs sur le continent asiatique, notamment en Chine avec une prévalence élevée (83,72 %) (Wagenaar et al., 2009). Les MRNAS décrits chez le porc concernent principalement l'espèce *S. sciuri* (Zhang et al., 2009).

1.4.3. Espèce bovine

Les bovins sont principalement infectés par la souche MRS ST398 qui provoque des mammites avec une prévalence différente d'un pays à l'autre et une implication principalement des cassettes SCC*mec* de types III, IV et V (Zhang et al., 2009). Les souches LA-MRSA ST398 bovines ont été identifiées dans divers pays européens (Belgique, Allemagne, Pays-Bas, Norvège), américains (États-Unis, Canada) et asiatique (Corée), mais restent méconnues sur le continent africain (Lozano et al., 2016; Schaumburg et al., 2016; Founou et al., 2019). Par contre, des souches de HA-MRSA et CA-MRSA ont également été détectées chez des vaches présentant des mammites aux États-Unis (Haran et al., 2012), en Hongrie (Juhász-Kaszanyitzky et al., 2007), en Corée (Nam et al., 2011) et en Turquie (Turutoglu et al., 2009). C'est le cas des souches ST1, ST8, ST97, ST126, ST130, ST133, ST705, ST425, ST1943 qui ont été décrites chez vaches laitières et des veaux de boucherie. Dans certains cas, la vache est considérée comme un réservoir pour l'espèce humaine et d'autres espèces animales. C'est le cas des souches ST130, ST425 et ST1943 qui sont porteurs du gène *mecC* et ont été détectée en

Europe (Danemark, Autriche, Belgique, France, Allemagne, Suède, Hollande et Royaumes unis) et en Australie à la fois chez des vaches laitières en bonne santé et chez les hommes. Cependant, la plupart des transmissions chez les bovins se font directement par contact étroit et indirectement (matériel de traite, trayeurs, serviettes, lingettes) (Aires-de-Sousa, 2017). Les staphylocoques non-*aureus* sont aussi impliqués dans la résistance à la pénicilline codée particulièrement par le gène *mecA* dans les cas de mammites bovines impliquant en majorité *S. chromogenes* et *S. epidermidis*. Néanmoins, d'autres espèces de staphylocoques telles que *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. equorum*, *S. fleuretii*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. succinus* et *S. warneri* ont également été détectées chez les bovins (Holmes and Zadoks, 2011).

1.4.4. Espèce équine

Les MRS chez les équidés sont responsables de quelques problèmes cliniques (tels que : infections cutanées, pneumonie, métrite, omphalophlébite, sinusite, septicémie, mammite, ostéomyélite) mais des complications peuvent survenir suite à l'infection par diverses autres bactéries opportunistes aggravant les pathologies initiales (Anderson et al., 2009). Les principales cassettes *SCCmec* décrites chez les équidés sont de types I et II. Les MRSA sont présents chez des chevaux sains ou malades dans des exploitations avec une faible prévalence (0-4,7%) et dans les hôpitaux vétérinaires avec une prévalence plus élevée (jusqu'à 12%) (Tokatelloff et al., 2009). Le premier cas de MRSA dans l'espèce équine a été découvert chez des chevaux présentant des plaies chirurgicales en 1996 (Hartmann FA1, Trostle SS, 1997). Aujourd'hui, le principal clone de MRSA équin est le ST8 (encore appelé USA300 par les américains) qui a été identifié en Europe, en Amérique du Nord et en Australie. Ce MRSA ST8 provenant initialement de l'homme, principalement des éleveurs de chevaux (=CA-MRSA), a été transmis aux chevaux par contact direct et s'y est adapté. Les MRSA ST1, ST22 et ST254 ont également été identifiés chez les équidés en Europe (Aires-de-Sousa M., 2017). Récemment, la souche LA-MRSA ST398 a également été identifiée chez les chevaux dans des cas de sinusites et de pneumonies en Europe (Finlande et Suède) et au Canada faisant suite à un transfert de bactéries par les éleveurs ou les vétérinaires à partir de fermes de porcs (Loeffler and Lloyd, 2010; Cuny et al., 2016). Les souches MRNAS isolées chez les chevaux sont principalement les espèces *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, et *S. lentus* (Corrente et al., 2009).

1.4.5. Animaux de compagnie

L'infection à MRS chez le chien et le chat implique généralement des lésions de la peau et des oreilles, mais parfois aussi des infections invasives peuvent se produire (Weese, 2005; Davis et al., 2012). Entre autres on peut citer les infections des plaies, les pyodermites, les otites, les infections du tractus urinaire. Les souches de MRS des chiens et chats appartiennent généralement aux cassettes *SCCmec* de type I, III, IV et aux ST239, ST43 et ST60 (Malik et al., 2006). La première infection à

MRSA chez un carnivore domestique a été détectée chez un chien en Afrique (Nigeria) en 1972, sans précision sur le type clonal impliqué (Loeffler and Lloyd, 2010). De nos jours, les souches responsables d'infections chez le chien et le chat sont généralement liées à celles de l'homme dans la même région avec, cependant, une faible prévalence (<2%) (Leonard and Markey, 2008). C'est le cas des souches ST5 (CA-MRSA), ST22 et ST36 (HA-MRSA), qui ont été détectés chez des animaux de compagnie respectivement en Amérique du Nord et au Royaume-Uni (Loeffler and Lloyd, 2010). La proximité entre animaux de compagnie et l'homme serait à l'origine de la transmission de l'homme à l'animal. Par contre les souches LA-MRSA ST398 ont également été découvertes chez le chien dans certaines régions, révélant une infection provenant d'animaux destinés à la consommation (Nienhoff et al., 2011).

Bien que les MRSA soient isolés chez les chiens et les chats, la principale espèce pathogène de ces animaux est *S. pseudintermedius* (coagulase positive), qui comporte également des souches résistantes à la méticilline (MRSP). Ces souches sont impliquées dans les infections de la peau et des oreilles, les infections des voies urinaires, les infections postopératoires mais font également partie de la flore normale des chiens et chats (Kjellman et al., 2015). D'autres espèces de MRNAS telles que *S. sciuri*, *S. felis* et *S. schleiferi* (coagulase variable) sont également commune chez les animaux de compagnie (Mustapha et al., 2014).

1.4.6. Petits ruminants

Les MRS sont responsables de mammites chez les petits ruminants et ont été décrits dans différents pays sans implication du ST398 avec comme principales cassettes SCCmec les types I, III et V (Zhang et al., 2009). En effet, le ST133 est le principal clone responsable de l'infection chez les ovins et les caprins (Guinane et al., 2010) mais les souches ST130 et ST1464 ont également été identifiées chez les moutons uniquement (Elbir et al., 2010). La transmission se fait également par contact étroit entre animaux lorsque les mamelles sont infectées. Les MRNAS (*S. sciuri* et *S. lentus*) ont également été impliquées dans des cas de mammites chez les moutons et les chèvres (Zhang et al., 2009).

1.4.7. Volaille

Selon des études récentes, les MRS chez les volailles seraient responsables d'atteintes du squelette entraînant de nombreuses pertes économiques dans l'industrie du poulet avec implication de la SCCmec de type IV comme principale cassette (Zhang et al., 2009). Des études menées en Corée, en Belgique, en Allemagne et en Hongrie ont montré que la principale souche de MRSA responsable de l'infection chez les volailles est le ST5 (CA-MRSA) qui est une adaptation de l'homme à la volaille. Cependant, les souches ST1, ST9, CC385 et ST398 peuvent également fréquemment coloniser les

poulets, la dinde et les oiseaux sauvages (Nemati et al., 2008; Pletinckx et al., 2011). Bien que le ST5 soit prédominant, les souches ST398 ont également été identifiées en Europe chez des poulets et des dindes. En outre, l'espèce *S. haemolyticus* a été également identifiée comme résistante à la méticilline chez la volaille (Garza-González et al., 2010a).

1.4.8. Autres espèces animales

La littérature a jusqu'ici décrit uniquement quelques cas d'infections par les MRSA chez d'autres animaux domestiques et sauvages. Le premier groupe concerne les perroquets, les phoques et les éléphants dont l'origine de l'infection pourrait être des gardiens humains (O'Mahony et al., 2005). Le second concerne des rats sauvages qui auraient été infectés par une souche MRSA provenant de porc (van de Giessen et al., 2009). Le troisième groupe, dont l'origine de l'infection reste inconnue, concerne les poissons d'élevage, les dauphins, les morses, les cobayes, les lapins, les chauves-souris, les tortues, les ânes, les singes, les chimpanzés et les gorilles (Walther et al., 2008; Schaumburg et al., 2014).

2. LES MAMMITES BOVINES

2.1. Généralités

La mammite bovine est une inflammation de la glande mammaire causée par des microorganismes, généralement des bactéries, qui envahissent le pis, se multiplient et produisent des toxines nocives pour la glande mammaire induisant une réaction immune innée (Schroeder, 2012). Les mammites bovines sont responsables d'importantes pertes économiques suite à la chute de la production laitière, au traitement des vaches atteintes, aux pénalités financières pour des comptages de cellules somatiques ou « Somatic Cells Count » (SCC) trop élevés ($>4 \times 10^5$ cellules/ml de lait) et à la réforme des vaches incurables (Halasa et al., 2007; Ashraf and Imran, 2018).

2.2. Pathogénie

Le début de l'infection est marqué par la pénétration des microorganismes dans le canal du trayon suivi de leur multiplication dans la glande mammaire. Cela peut se faire en 3 étapes.

2.2.1. Invasion du trayon

Lorsque la vache n'est pas traitée, le muscle du sphincter ferme hermétiquement le canal du trayon constituant ainsi la première ligne de défense contre la pénétration de bactéries dans le pis. Cependant, après la traite, le canal du trayon reste ouvert pendant une à deux heures favorisant ainsi l'invasion du trayon suite à son contact avec des microorganismes présents sur la peau et l'extrémité du trayon. Le canal d'un trayon endommagé peut aussi rester partiellement ouvert en permanence facilitant ainsi son invasion par des micro-organismes présents dans l'environnement (fumier, litière, etc.) ou sur la peau lésée à l'extrémité du trayon (Wattiaux, 1999).

2.2.2. Etablissement de l'infection et de l'inflammation

Une fois le trayon envahi, l'établissement de l'infection peut être favorisé par le déplacement des micro-organismes avec le courant de lait, mais aussi par la colonisation du tissu épithélial. Après destruction de la muqueuse des grands canaux collecteurs de lait, les bactéries peuvent par la suite rencontrer des leucocytes (neutrophiles, macrophages, lymphocytes) présents naturellement en petite quantité dans le lait. Ceux-ci constituent la deuxième ligne de défense de la vache se matérialisant par la phagocytose (neutrophiles, macrophages) et la destruction des bactéries (Rainard P, 1988). Au cours de ce processus, les leucocytes libèrent des cytokines (TNF- α), des interleukines (IL-8, IL-1) et de la prostaglandine F 2α (PGF 2α) qui provoquent le déplacement supplémentaire des cellules somatiques du sang vers le lait (Viguier et al., 2009). Lorsque cette deuxième ligne de défense est franchie, les bactéries continuent à se multiplier et à envahir les plus petits conduits et les zones alvéolaires (Fig.

6A). Ces alvéoles endommagées par les toxines et d'autres agents irritants vont libérer des enzymes N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAGase) et L-lactate deshydrogenase (LDH) augmentant la perméabilité des vaisseaux sanguins (Fig. 6B) et favorisant ainsi le déplacement des leucocytes supplémentaires vers le site de l'infection. Ces leucocytes pénètrent en masse dans le tissu alvéolaire et s'insèrent entre les cellules de sécrétion du lait endommagées. Le lait ainsi que les minéraux et les facteurs de coagulation se rassemblent dans la zone lésée (Fig. 6C), mais la coagulation du lait peut fermer les conduits et, de ce fait, isoler les régions infectées (Wattiaux, 1999).

2.2.3. Destruction du tissu alvéolaire

En cas d'élimination rapide des microorganismes, l'infection disparaît, les canaux se referment, puis la composition et la production de lait peuvent parfois revenir à la normale après plusieurs jours. Cependant, lorsque que l'infection persiste et que les canaux sont bouchés, le lait piégé provoque le retour des cellules sécrétoires à un état de repos (non productif) et le rétrécissement des alvéoles (Fig. 6D). Les enzymes libérées (NAGase et LDH) entraînent la destruction complète des structures alvéolaires, qui sont remplacées par des tissus conjonctifs et cicatriciels constituant ainsi la troisième ligne de défense (bouchon de kératine) (Fig. 6E et 6F). Ainsi, à mesure que les lésions progressent, le nombre de cellules somatiques dans le lait augmente accompagné d'une réduction (permanente) du rendement en lait (Wattiaux, 1999; Viguiet et al., 2009).

2.3. Signes cliniques

En fonction des signes cliniques observés, on distingue des mammites cliniques et des mammites sub-cliniques (Tableau 2).

2.3.1. Mammites cliniques

La mammite clinique présente des signes cliniques visibles chez les vaches qui peuvent être :

- Légers, comprenant des flocons ou des caillots dans le lait pouvant entraîner un léger gonflement du quartier infecté ;
- Sévères avec une sécrétion de lait d'aspect anormal, un quartier ou un pis chaud et gonflé, une possibilité de fièvre chez la vache, un pouls rapide, une perte d'appétit, une déshydratation et une dépression pouvant entraîner la mort dans certains cas.

Dans ces cas de mammites cliniques, une augmentation du nombre de cellules somatiques d'au moins 3×10^5 /ml et pouvant aller au-delà de 10^6 /ml de lait selon la sévérité de la maladie est toujours

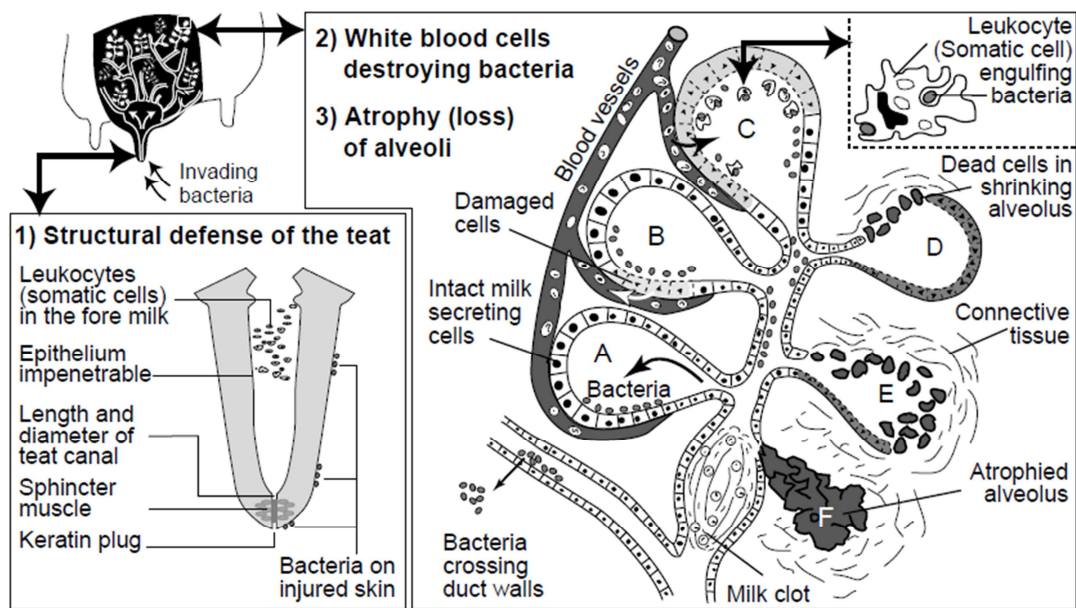


Figure 6. Représentation schématique du développement de la mammite dans un quartier infecté (Wattiaux, 1999).

observée. Les mammites cliniques sont généralement associées aux agents pathogènes responsables de mammites environnementales (Gussmann et al., 2019).

2.3.2. Mammites sub-cliniques

Dans ce type de mammites, il n'y a aucun signe visible de la maladie à l'exception d'une augmentation du nombre de cellules somatiques dans le lait ($>3 \times 10^5/\text{ml}$) et d'une détection de bactéries à la culture bactériologique du lait. La mammite sub-clinique cause une perte financière très importante pour les producteurs laitiers en raison de la chute de la production de lait. Pour chaque cas de mammite clinique, 15 à 40 cas de mammites sub-cliniques se produisent. Les mammites sub-cliniques sont, quant à elles, généralement associées aux agents pathogènes responsables de mammites contagieuses (Reyher et al., 2012; El-Sayed et al., 2017).

Tableau 2. Mammite clinique vs mammite subclinique

Caractéristiques	Mammite subclinique	Mammite clinique sévérité variable		
		Faible	moyen	sévère
Altération de l'état général	-	-	-	+
Inflammation de la mamelle	-	-	+	+
Altération macroscopique du lait	-	+	+	+
Augmentation de la concentration cellulaire somatique	+ ($>3 \times 10^5/\text{ml}$)	+	+	+ ($>10^6/\text{ml}$)
Agent étiologique	staphylocoques (<i>S. aureus</i> , <i>Staph non aureus</i>), streptocoques (<i>Str. agalactiae</i> , <i>Str. dysgalactiae</i>), mycoplasmes (<i>M. bovis</i>)	Staphylocoques (<i>S. aureus</i> , <i>Staph non aureus</i>) streptocoques (<i>Str. uberis</i>), coliformes (<i>E. coli</i>), enterobactérie		

Adapté de (Schukken et al., 2003; Hanzen, 2010)

2.4. Etiologie

En fonction de l'épidémiologie, les agents étiologiques responsables de mammites bovines peuvent être classés en 4 groupes.

2.4.1. Agents pathogènes responsables de mammites contagieuses

Les principaux agents responsables de mammites contagieuses sont *S. aureus*, les CNS, *Streptococcus (Str.) agalactiae* et les mycoplasmes. Ces bactéries vivent sur la peau des vaches, se multiplient à l'intérieur des trayons des quartiers contaminés et sont excrétées avec le lait pendant la traite. Ces bactéries se propagent de vache à vache principalement par le biais d'équipements de traite contaminés, de serviettes ou de lingettes pour le nettoyage ou par les mains du personnel de traite. Elles sont bien adaptées à la colonisation rapide du canal du trayon et du pis en raison de leur grande capacité à s'attacher au tissu mammaire. Cette contamination se poursuit par une multiplication bactérienne entraînant généralement une augmentation du nombre de cellules somatiques. Les bactéries en cause sont également responsables en majorité de mammites sub-cliniques et de quelques cas de mammites cliniques (El-Sayed et al., 2017).

2.4.2. Agents pathogènes responsables de mammites environnementales

Les principaux agents pathogènes responsables des mammites environnementales sont les coliformes tels qu'*Escherichia (E.) coli* et *Klebsiella* spp. ainsi que les streptocoques tels que *Str. uberis* et *Str. dysgalactiae*. Ces bactéries vivent et se multiplient dans l'environnement de la vache (fumier, sol, litière, végétation, eau et peau) et sont, donc, très difficiles à éliminer. Elles sont souvent considérées comme « opportunistes », c'est-à-dire qu'elles tirent parti des conditions qui rendent la glande mammaire plus sensible aux infections favorisant la contamination à partir de l'environnement (El-Sayed et al., 2017). Une forte proportion d'infections survient au cours des deux semaines qui suivent immédiatement le tarissement et des deux semaines qui précèdent le vêlage, lorsque les défenses naturelles de la vache sont les plus faibles. Une mauvaise désinfection des trayons ou l'utilisation d'une canule sale lors d'un traitement intra-mammaire en période de tarissement sont des causes fréquentes d'infection. L'absence de bouchon de kératine (empêchant les bactéries de pénétrer dans le canal du trayon) lors du tarissement augmente également le risque d'infection ou de surinfection. Les bactéries environnementales contaminent les extrémités des trayons entre les traites et infectent les quartiers par un reflux de lait résultant d'une technique de traite inadéquate (mauvais ajustement, glissement). Ce mode de contamination résulte d'une remontée des bactéries responsables provoquant généralement des mammites cliniques (Sylvestre et al., 2008).

2.4.3. Agents pathogènes majeurs et mineurs

Les agents pathogènes majeurs sont ceux qui causent en général des mammites contagieuses ou environnementales, pouvant être accompagnées de signes cliniques sévères, voire de la mort de l'animal. Ils sont constitués de *S. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, *Mycoplasma (M.) bovis*, *E. coli* et *Klebsiella spp.* Ils sont généralement considérés comme plus virulents et dommageables pour le pis, contrairement aux agents pathogènes mineurs qui causent des mammites généralement sub-cliniques associées à une augmentation modérée du nombre de cellules somatiques, avec une perte de production de lait minime, voire nulle. Les agents pathogènes mineurs comprennent essentiellement les CNS et *Corynebacterium spp.* et font partie des bactéries les plus répandues dans les mamelles de vaches en lactation dans un certain nombre de pays (Leelahapongsathon et al., 2014).

2.5. Diagnostic des mammites bovines

La mammite étant une inflammation des glandes mammaires, son diagnostic se base essentiellement sur une approche visant à détecter des indicateurs d'inflammation. Il peut se faire en plusieurs étapes consistant à déterminer dans un premier temps les signes apparents de mammites (diagnostic clinique), dans un 2^e temps les indicateurs biologiques de la mammite (diagnostic biologique) et dans un 3^e temps une détection des microbes responsables (diagnostic étiologique).

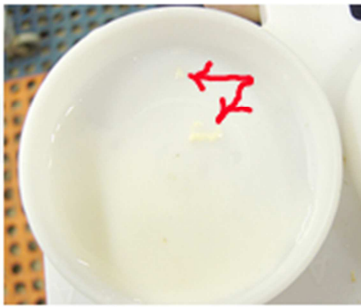
2.5.1. Diagnostic clinique

En cas de mammites cliniques, le pis devient dur, rouge, chaud au toucher et sa palpation peut être douloureuse pour la vache. Dans certaines mammites cliniques, une altération de l'état général peut également être observée (Fig.7). Ces signes cliniques résultent des modifications de la vascularisation et du débit sanguin des glandes suite à l'inflammation (Lam et al., 1993; Riekerink et al., 2008).

Le moyen visuel le plus courant de confirmation des mammites cliniques consiste à extraire les premiers jets de lait de chaque quartier dans un gobelet en métal au début de la traite afin d'y détecter la présence de flocons ou de caillots (Fig. 8) (Lam et al., 2009).



Figure 7. Glande mammaire atteinte de mammite (Vet in training, 2015)



A



B

Figure 8. Exemples de flocons et de caillots de lait (ANSCI, 2016)

A. Image prise dans une palette CMT - présente quelques flocons (flèches rouges).

B. Image prise sur le couvercle d'un gobelet en métal - contient de nombreux caillots et lait séreux d'une vache souffrant de mammite aiguë.

2.5.2. Diagnostic biologique

Comptage des cellules somatiques (SCC)

L'ensemble des cellules qui se retrouvent dans le lait sont appelées « cellules somatiques » et la quantification de leur concentration est appelée « comptage des cellules somatiques ». Plus la SCC est élevée, plus le niveau d'inflammation dans les tissus est important. La SCC dans le lait est donc un indicateur important de l'état d'inflammation du pis (Harmon RJ, 1994). Ces cellules somatiques sont principalement constituées de leucocytes (en majorité les polynucléaires neutrophiles ou PMN) qui entrent dans la mamelle lors d'inflammation (diapédèse) et se retrouvent dans le lait avec les cellules épithéliales mammaires desquamées. Bien que la mammite soit causée le plus souvent par une infection bactérienne, tout traumatisme infligé au tissu, même en l'absence d'un organisme pathogène infectant, entraînera la pénétration de leucocytes dans le tissu. La diapédèse des leucocytes étant localisée, seul le quartier du pis infecté connaîtra une augmentation significative de la concentration de leucocytes (SCC) (ANSCI, 2016). La détection des cellules somatiques dans le lait se fait principalement par le « California Mastitis Test » (CMT) et par le comptage électronique, bien qu'il existe d'autres méthodes empiriques, telles que le « Wisconsin Mastitis Test » (WMT) et le comptage microscopique direct qui ne sont plus utilisées de nos jours.

Conductivité électrique du lait

La conductivité électrique du lait augmente surtout dans les cas de mammites cliniques en raison d'une augmentation de Na^+ et Cl^- et d'une diminution de K^+ et de lactose. Les changements de conductivité peuvent être détectés à l'aide d'instruments portatifs ou intégrés à la ligne de production de lait. Ce dernier est la base des systèmes de traite informatisés qui suivent les mesures de conductivité électrique du lait de vache à chaque traite. Ces données peuvent être analysées par les programmes permettant d'identifier les vaches dont la conductivité électrique du lait est modifiée par rapport à la normale (Norberg et al., 2004).

2.5.3. Diagnostic étiologique des mammites bovines

L'identification des agents pathogènes permet d'établir un diagnostic étiologique définitif de l'infection des animaux. Il se fait principalement par des techniques de bactériologie classiques et des techniques génétiques.

Bactériologie classique

Elle consiste à effectuer une culture bactériologique des échantillons de lait sur des milieux de culture suivi de tests biochimiques en vue de déterminer les différents genres (ou espèces) bactériens qui y sont présents. Cette technique bien que peu coûteuse présente quelques inconvénients dans la mesure où elle ne permet d'obtenir des résultats que dans un délai assez long (entre 3 et 8 jours) avec la possibilité de résultats faussement négatifs. Par exemple, certaines espèces bactériennes nécessitent une longue période de croissance et des milieux sélectifs et enrichis, telles que *Mycoplasma spp.* (Bradley et al., 2007; Koivula et al., 2007; Riekerink et al., 2008). Pour une identification plus précise de la bactérie à l'échelle de l'espèce, la culture bactérienne doit être complétée par des tests d'identification biochimiques tels que les galeries API[®], qui vu leur manque de fiabilité pour certains groupes de bactéries d'origines animales tels que les SCN, ont cédé la place à d'autres méthodes d'identification, comme celles utilisant la spectrométrie de masse telle que le MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption-Ionization- time of flight). Ces derniers tests, plus fiables et rapides, permettent d'identifier des bactéries à l'échelle de l'espèce en moins de 24h à partir de leurs colonies en se basant sur le profil protéique de la bactérie concernée comparé à une base de données (Cameron et al., 2017). Cependant, toutes les bases de données n'ont pas encore été validées pour l'ensemble des familles et genres bactériens.

Identification génétique

Les techniques d'identification génétique ont permis d'améliorer la rapidité et la sensibilité du diagnostic étiologique. Elles se basent d'une part, sur les techniques de PCR (« Polymerase Chain Reaction ») telles que la PCR quantitative (qPCR) et l'amplification isotherme médiée par boucle « Loop-mediated isothermal amplification » (LAMP) et d'autre part sur les techniques de séquençage d'ADNr16S ou d'ARNr16S (Ashraf et Imran, 2018).

Les techniques de qPCR présentent de meilleures sensibilité, rapidité et fiabilité par rapport aux méthodes de cultures bactériennes pour la détection des agents pathogènes responsables de mammites (Cantekin et al., 2015). Un exemple de kit commercial de qPCR multiplexe est le PathoProof[™] Complete-16 qui est utilisé dans le diagnostic de mammites bovines et a été démontré plus sensible et plus spécifique que la bactériologie classique (Koskinen et al., 2009). Il détecte la présence des bactéries mammopathogènes suivantes : *S. aureus*, *Staphylococcus sp.* comprenant tous les principaux espèces non-*aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, *E. coli*, *Corynebacterium bovis*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella (K.) oxytoca* et *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Trueperella pyogenes* et *Peptococcus indolicus*, *M. bovis*, *Mycoplasma sp.*, *Prototheca sp.*, les levures et le gène codant pour la β -lactamase staphylococcique (*blaZ*) (Suisselab AG Zollikofen, 2006; Thermo Scientific, 2015).

L'amplification isotherme à médiation par boucle (LAMP) est une méthode rapide, économique se basant sur le déplacement de brins d'ADN dans des conditions iso-thermiques en présence de la *Bst* polymérase (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008). Il existe aussi d'autres méthodes génétiques telles que le séquençage ADN/ARN et la spectrométrie de masse par ionisation électrospray ou l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH).

2.6. Traitements antibiotiques et alternatives

Afin d'éviter toute apparition de mammites bovines au sein d'un troupeau, des mesures, différentes selon le type d'agent pathogène, doivent être prises en ce qui concerne la conduite de troupeau, principalement sur le plan hygiénique (NMC, 2020). Néanmoins, une fois que des cas de mammites sont déclarés, la mise en place d'un traitement est nécessaire afin d'éviter des conséquences économiques et sanitaires. La principale stratégie utilisée jusqu'à présent pour le traitement des mammites bovines est basée sur l'utilisation des antibiotiques pouvant être administrés pendant et après la lactation.

2.6.1. Traitement des vaches pendant la lactation

Pendant la lactation, le traitement concerne principalement les vaches atteintes de mammites cliniques, mais quelques fois aussi celles atteintes de mammites sub-cliniques.

Le traitement des mammites cliniques a pour but de se débarrasser de l'agent pathogène ainsi que d'améliorer les signes cliniques observés et nécessite parfois une association d'anti-inflammatoires aux antibiotiques utilisés. Une administration concomitante des antibiotiques par voies intra-mammaire et parentérale permet d'obtenir une efficacité accrue du traitement avec un taux de guérison élevé. Néanmoins, chaque voie présente des avantages et inconvénients (Erskine et al., 2003). En effet, bien que la voie intra-mammaire permette d'atteindre une concentration élevée avec une dose minimale administrée d'antibiotiques, elle est limitée par une inégalité de distribution dans la glande mammaire et le risque d'une nouvelle infection lors de l'injection. La voie parentérale, quant à elle, bien que permettant une bonne distribution d'antibiotiques dans l'organisme reste incapable de maintenir la concentration thérapeutique dans la glande mammaire. La durée du traitement des mammites cliniques est en général comprise entre 5 et 7 jours au-delà desquels le cas est considéré comme un échec thérapeutique au traitement (du Preez JH, 2000; Jadhav et al., 2017). Le traitement sélectif est souvent utilisé dans les cas de mammites cliniques et se base sur un système de culture bactériologique à la ferme afin d'orienter le traitement. Il a été démontré que cette méthode permet d'améliorer un certain nombre de facteurs tels que la réduction de l'utilisation d'antibiotiques intramammaires, le temps de rétention du lait, les risques liés aux traitements bactériologiques, les risques de nouvelles infections intramammaires et les risques d'échec du traitement (Lago et al., 2011).

Les mammites sub-cliniques ne sont, en général, pas traitées pendant la période de lactation en raison du coût économique du traitement et du rejet du lait pendant la période de retenue ainsi qu'un taux de guérison très bas. Par contre, un traitement pourrait être envisagé si le lien de causalité est bien établi dans les cas de mammites contagieuses afin de freiner la propagation de l'infection chez les vaches en bonne santé du troupeau (Pyörälä S, 2009). Dans ce cas également, l'utilisation simultanée de la voie intra-mammaire et de la voie parentérale en traitement de longue durée permet d'obtenir de meilleurs taux de guérison (Erskine et al., 2003).

En ce qui concerne le traitement des mammites en période de lactation, une multitude de principes actifs sont généralement utilisés en Belgique en fonction des agents étiologiques responsables : cloxacilline, céfazoline, cefquinome, céfopérazone, céfalonium, (néomycine + pénéthamate + benzylpénicilline procaïne), (kanamycine + céfalexine) ou (amoxicilline + acide clavulanique + prednisolone) (CBIPvet, 2020).

2.6.2. Traitement des vaches hors lactation : thérapie de la vache sèche (« dry cow therapy »)

Après la période de lactation, les défenses immunitaires de la mamelle sont au plus haut niveau, laissant ainsi place à une synergie défensive efficace entre système immunitaire et antibiotiques avec pour conséquence un minimum de coût lié au traitement. Le traitement des vaches en cette période est fondamental pour pallier aux infections résiduelles du pis et contrôler l'apparition de nouvelles infections (O' Rourke D, 2009). La thérapie de la vache sèche, ou « dry cow therapy », est une technique utilisée depuis une trentaine d'années et qui constitue le principal outil de gestion des mammites bovines en élevage intensif. Elle peut être classée en trois types : (i) une thérapie de couverture qui consiste au traitement de tous les quartiers de toutes les vaches du troupeau quel qu'en soit le statut infectieux ; (ii) une thérapie sélective par vache qui consiste au traitement de tous les quartiers (infectés ou non), uniquement des vaches atteintes de mammites dans le troupeau ; et (iii) une thérapie sélective par quartier qui consiste au traitement uniquement des quartiers infectés chez les vaches atteintes de mammites. La thérapie sélective par vache s'avère être la méthode la plus rentable et la plus efficace dans la mesure où elle permet une réduction des coûts liés au traitement et limite l'apparition de résistances aux antibiotiques tout en éliminant les agents pathogènes mineurs (Afifi et al., 2018).

Les principes actifs couramment utilisés en Belgique pour la « dry cow therapy » sont les suivants : cloxacilline, céfazoline, céfalonium, céfalexine, cefquinome, rifaximin et les associations (cloxacilline + ampicilline), (pénéthamate + néomycine), (pénéthamate + pénicilline + framycétine) et (procaïne benzylpénicilline + dihydrostreptomycine) (CBIPvet, 2020). Des études ont montré que le traitement des vaches hors lactation permet d'avoir un taux de guérison supérieur à celui obtenu

pendant la lactation avec également l'avantage de ne pas être confronté aux problèmes de résidus dans le lait (Gruet et al., 2001).

2.6.3. Echec du traitement aux antibiotiques

Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'échec du traitement des mammites par les antibiotiques :

- La diffusion inefficace du médicament dans les mamelles suite à l'œdème ou à l'inflammation qui peuvent bloquer ou comprimer les canaux et alvéoles des glandes mammaires interférant ainsi avec la distribution de l'antibiotique dans les tissus du pis (Gruet et al., 2001).
- La présence de micro-abcès et l'inaccessibilité du médicament à l'agent pathogène.
En effet, la nécrose des tissus suite aux mammites peut empêcher la distribution d'antibiotiques dans les foyers nécrotiques avasculaires où des bactéries vont se multiplier. Par ailleurs, la formation des micro-abcès et la cicatrisation du tissu du pis inhibent à la fois la pénétration et la distribution du médicament et servent également de source d'infection. La nécrose du pis et les micro-abcès sont donc responsables de la diffusion altérée du médicament dans le tissu du pis (du Preez JH, 2000).
- Certaines protéines du lait ou du tissu mammaire sont capables d'interagir avec des antibiotiques et d'entraîner leur inactivation (Sachi et al., 2019).
- Certaines bactéries telles que les staphylocoques et les coliformes peuvent survivre dans les phagolysosomes de macrophages et de neutrophiles, ainsi que dans les cellules épithéliales, les tissus cicatriciels fibreux ou en profondeur des abcès dans le parenchyme mammaire empêchant ainsi leur accessibilité par les antibiotiques (Cain RJ and Va'zquez-Boland JA, 2015).
- Les bactéries peuvent être naturellement résistantes (résistances intrinsèques) ou le devenir après acquisition de gènes de résistance (résistances acquises). Les résistances acquises sont les plus communes et représentent une menace importante lors de l'utilisation d'antibiotiques pour le traitement des mammites. L'une des résistances les plus fréquentes dans le cas des mammites bovines est la résistance à la méticilline des staphylocoques (cfr première partie de l'introduction) (Lakhundi and Zhang, 2018). L'isolement, l'identification correcte de l'agent pathogène ainsi qu'un antibiogramme adéquat sont donc aujourd'hui nécessaires (Jadhav et al., 2017).

2.6.4. Alternatives aux antibiotiques

Les risques de résistance liés à l'utilisation des antibiotiques ont poussé les chercheurs à s'orienter vers des alternatives pour le traitement des mammites. Outre les composés améliorant les défenses immunitaires de la mamelle et les systèmes d'administration permettant aux médicaments d'atteindre les profondeurs des mamelles pour exercer leur activité, les études récentes se focalisent également sur des alternatives aux antibiotiques. Celles-ci concernent l'utilisation de cytokines, de

peptides antibactériens, de bactériocines, de préparations à base de plantes, de protéines mucolytiques recombinantes ainsi que des bactériophages, dont l'intérêt est de plus en plus grandissant (Jadhav et al., 2017).

3. LES BACTÉRIOPHAGES

3.1. Définition

Les bactériophages sont des virus qui peuvent infecter et se répliquer dans les bactéries après injection de leur génome (ADN ou ARN) dans le cytoplasme et conduire à leur destruction (Mc Grath et van Sinderen, 2007). Ce sont des virus omniprésents que l'on trouve partout où il y a des bactéries. C'est l'une des entités les plus communes et les plus diverses de la biosphère (LaFee et Buschman, 2018). La structure générale d'un bactériophage classique est constituée d'une tête et d'une queue (Fig.9). La tête (ou capsid) comprend une coque protéique icosaédrique contenant un ADN double brin. La queue quant à elle peut être formée de fibres disposant de récepteurs permettant la reconnaissance des sites de fixation sur la surface des cellules bactériennes. Néanmoins, différents types de morphologies et de mécanismes de fixations existent en fonction du type de bactériophage (Mansour, 2017).

3.2. Classification des bactériophages

Le Comité international de taxonomie des virus ou « International Committee on Taxonomy of Viruses » (ICTV) a établi une classification des phages. Il en découle que 96% des bactériophages appartiennent à l'ordre des *Caudovirales* (virus avec queue) caractérisés par un ADN double brins, non enveloppé et d'une taille comprise entre 25 à 800 nm (Ackermann, 2009). Les *Caudovirales* se subdivisent en 3 familles en fonction de la morphologie de leur queue. Ainsi, on distingue les *Podoviridae* possédant une queue courte, un génome de 40-50kb et comprenant 50 espèces référencées (ex : phage T7) ; les *Myoviridae* possédant une queue contractile, un génome de 33-244kb et comprenant 93 espèces (ex : phage T4) et les *Siphoviridae* possédant une queue longue, un génome d'environ 50kb et comportant 313 espèces (ex : phage Lambda) (fig.10) (Lefkowitz et al., 2018).

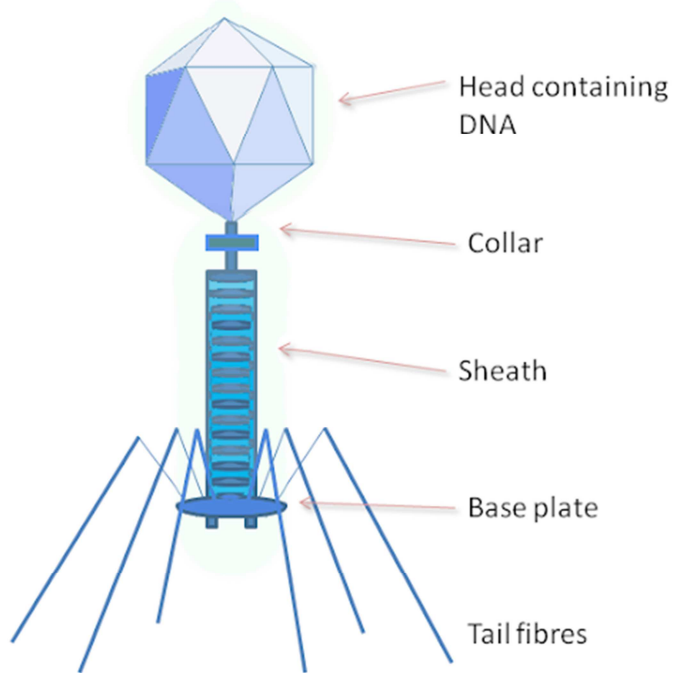


Figure 9. Structure générale d'un bactériophage (Meyer, 2020)

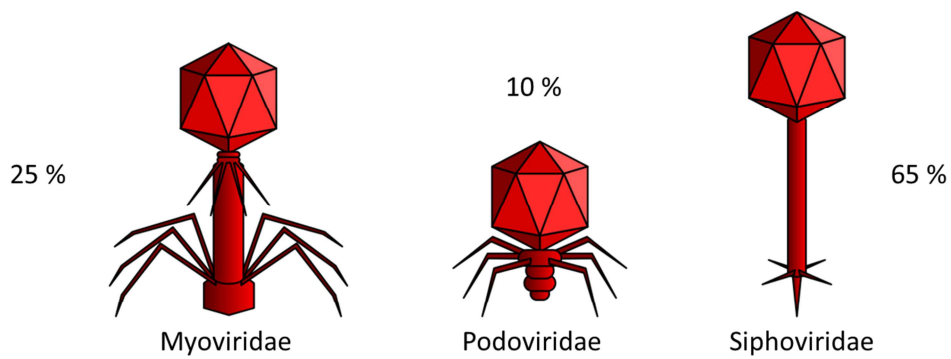


Figure 10. Différentes familles de phages de l'ordre des *Caudovirales* (Lefkowitz et al., 2018).

3.3. Cycle des bactériophages

L'activité des bactériophages à l'intérieur des bactéries peut être illustrée de deux principales manières : un cycle lytique avec réplication de l'ADN à l'intérieur de la bactérie, suivi de la lyse de la bactérie et de l'infection d'autres bactéries et un cycle lysogénique, sans réplication de l'ADN, mais avec formation d'un prophage sans lyse de la bactérie (Fig.11) (Salmond and Fineran, 2015).

3.3.1. Cycle lytique

Le cycle lytique se déroule en plusieurs étapes :

- L'arrimage au cours duquel le phage se lie à la bactérie via des récepteurs spécifiques, qui peuvent être l'un des composants de la membrane bactérienne, notamment les protéines, les oligosaccharides, les acides téichoïques, le peptidoglycane et les lipopolysaccharides (Monk et al., 2010).
- Par la suite, grâce à différents mécanismes, le phage va perforer la paroi et la membrane cytoplasmique bactérienne (Inamdar et al, 2006). Puis la contraction de la queue du phage va permettre le transfert (injection) du matériel génétique du phage dans la cellule hôte (Ravat et al., 2015).
- Le génome viral est ensuite transcrit par l'ARN polymérase de la cellule hôte, produisant un ARNm précoce qui a pour effet de prendre en charge la machinerie métabolique de la bactérie qui va être redirigée vers la fabrication de nouveaux composants viraux qui seront ensuite assemblés en virions (Monk et al., 2010).
- Enfin, les enzymes muralytiques (ou endolysines) produite par les phages dans le cytoplasme vont dégrader le peptidoglycane avec l'aide d'une autre enzyme appelée holine leur permettant de traverser la membrane cytoplasmique. De cette manière, on assistera à une lyse bactérienne et la libération de la descendance virale (Fischetti, 2005).

Les enzymes produites par les bactériophages (depolymérase et endolysines) ont donc respectivement un effet anti-virulent (dégradation des facteurs de virulence de la bactérie) et antibactérien (lyse bactérienne) sur les bactéries (Maciejewska et al., 2018). A l'issue d'un cycle lytique, qui dure environ 30 min, on assiste à une amplification du phage initial pouvant entraîner la production allant jusqu'à 3000 phages (Burst Size = nombre de phages libérés par lyse spontanée d'une bactérie infectée) ce qui est plus rapide et plus productif que le processus de division bactérien qui dure environ 1h (Hyman et Abedon, 2009; Ravat et al., 2015).

3.3.2. Cycle lysogénique

Lors du contact entre phage et bactérie, un cycle lysogène peut également se produire juste après l'étape d'injection du génome du phage dans la cellule hôte. Ce type de cycle est dépendant du rapport entre les différentes protéines régulatrices virales (ex : protéines répresseurs) lui-même lié à l'état physiologique de la bactérie (stade du cycle cellulaire, réserve énergétique disponible) (Blasdel and Abedon, 2017). Ainsi, l'ADN viral injecté dans la bactérie s'intègre à l'ADN de la cellule hôte. L'ADN du prophage ainsi obtenu sera alors répliqué lorsque le génome de la cellule hôte se répliquera et les cellules filles hériteront donc de l'ADN viral (Fischetti, 2005). On parle alors de phages tempérés (exemple : le phage Lambda) qui ont très peu d'intérêt sur le plan thérapeutique. Néanmoins, dans certaines conditions (évolution génétique dans 20% de cas, ou suppression du répresseur transcriptionnel par des manipulations génétiques) ils peuvent devenir lytiques et être utilisé sur le plan thérapeutique. On assistera par exemple lors d'un stress physiologique (irradiation UV, mitomycine) à une induction du prophage qui va se détacher du chromosome bactérien et entamer un cycle lytique classique aboutissant à la lyse de la cellule hôte (Blasdel et Abedon, 2017).

3.3.3. Autres cycles

Outre ces deux principaux cycles, on peut parfois assister soit à :

- un cycle pseudolysogénique dans lequel le génome reste quiescent après son injection, sous forme extra-chromosomique comme un plasmide, sans intégration dans le génome de la cellule hôte. Ce cycle est en général observé dans les conditions non-favorables de l'hôte et par conséquent du phage. Mais une fois les conditions redevenues favorables, on peut de nouveau assister soit à un cycle lytique soit à un cycle lysogénique selon le type de phage (Fig 12) (Łoś Marcin and Węgrzyn Grzegorz, 2012).
- un cycle infectieux chronique qui est un cycle aboutissant à une production chronique de particules virales en petites quantités qui se transmettent à la descendance par bourgeonnement ou extrusion (Fig. 12) (Wilson DR1, 1998).

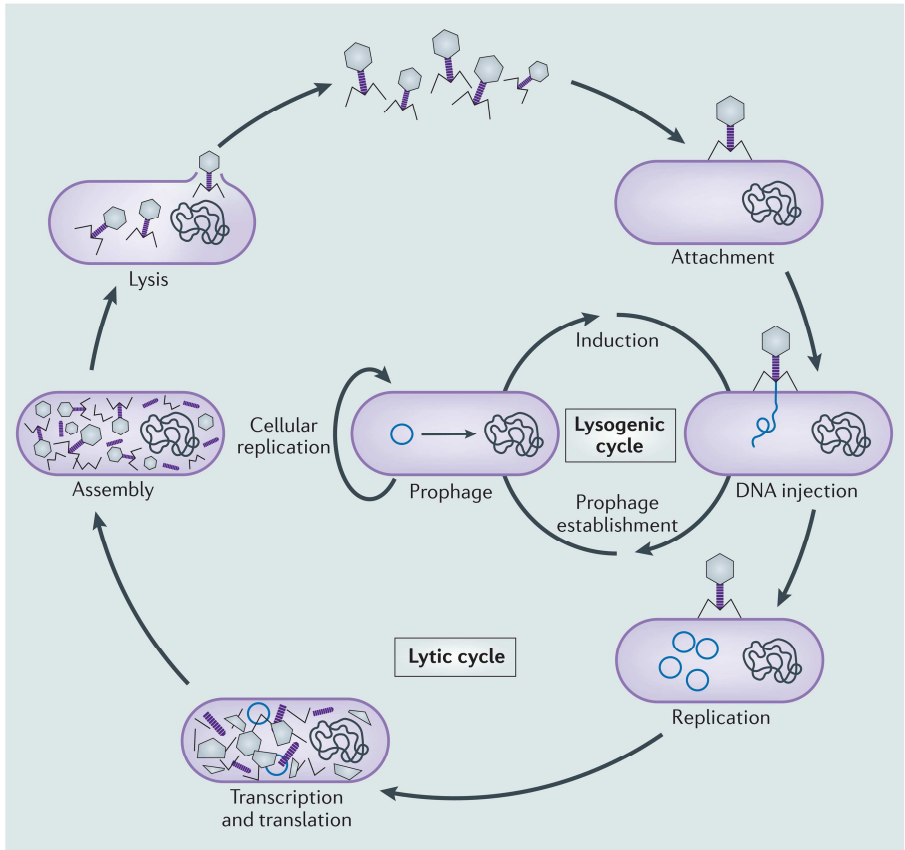


Figure 11. Cycle lytique et cycle lysogénique (Salmond and Fineran, 2015)

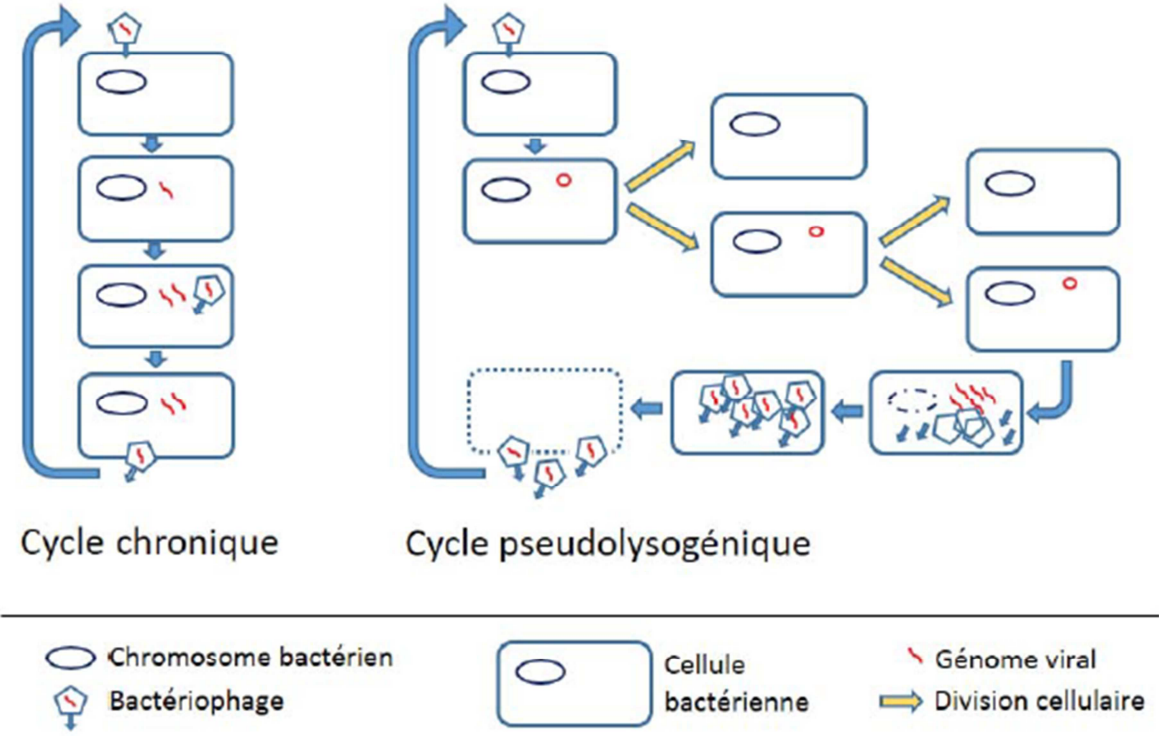


Figure 12. Cycle chronique et cycle pseudolysogénique (Dufour, 2016)

3.4. Interactions phage-bactérie

Tout comme avec les antibiotiques, les bactéries vont développer un certain nombre de mécanismes de résistance pour contrecarrer l'action des bactériophages. A la différence des antibiotiques, les bactériophages vont s'adapter progressivement et eux aussi résister à l'attaque bactérienne. On parle de « course à l'armement raisonné » qui peut se faire aussi bien à distance que lors du contact entre la bactérie et le phage telle que résumée sur la Figure 13 (Azam et Tanji, 2019).

3.4.1. Résistance des bactéries contre les bactériophages

Certaines bactéries, particulièrement des Gram négatives, vont utiliser des cellules appelées « Outer Membrane Vesicles » (OMVs) afin de détourner l'action des agents antibactérien y compris des bactériophages (Grenier et al., 1995). Ces OMVs, de par leurs structures similaires à celle de la bactérie mais ne possédant pas de matériel génétique, vont agir comme leurre contre les bactériophages (Chattopadhyay and Jagannadham, 2015). Leurs actions ont été démontrées chez certaines bactéries telles qu'*E. coli* et *Vibrio cholerae* (Manning and Kuehn, 2011; Reyes-robles et al., 2018).

Suivant les différentes étapes de l'infection par le phage, plusieurs mécanismes de résistance de la bactérie peuvent se mettre en place. En première ligne de défense, on peut assister à une inhibition de l'adsorption du phage qui consiste en l'altération de son récepteur spécifique sur la bactérie l'empêchant ainsi de se fixer à elle et par conséquent son adsorption. Ceci a été observé par exemple chez *S. aureus* SA003 et chez *E. coli* O157: H7 qui ont respectivement supprimé leurs récepteurs β -GlcNAc et OmpC pour contrecarrer l'adsorption des phages ϕ SA039 et PP01 (Takeuchi et al., 2016). Une variation de phase dans l'expression des récepteurs de phages peut également être mise en place par la bactérie afin d'empêcher l'adsorption du phage (Seed, 2015).

Une fois le phage en contact avec la bactérie, l'injection de son ADN peut être bloqué suite à une surproduction de polysaccharide capsulaire ou d'immunoglobuline protéique de la paroi cellulaire jouant ainsi un rôle de barrière pour le phage. Ce système bien que le plus souvent codé par des gènes de prophages a été observé chez les phages lytiques (Labrie et al., 2010). C'est le cas du phage T4 dont l'injection de l'ADN est bloquée chez *S. aureus* par production d'une « immunoglobulin G-binding protein A » se liant au fragment Fc de l'immunoglobuline G (Kim et al., 2015).

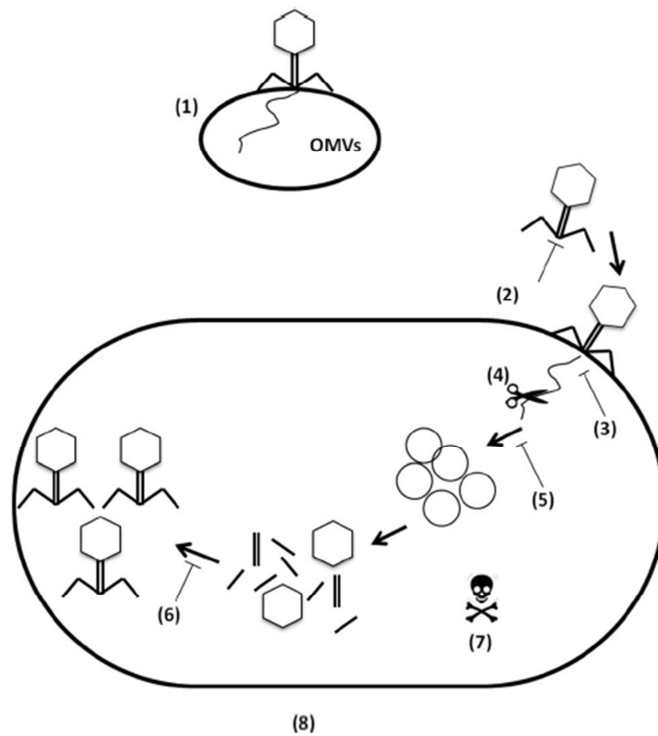


Figure 13. Interactions entre phage et bactérie (Azam and Tanji, 2019). (1) Utilisation des OMVs comme Leurre, (2) Inhibition de l'adsorption du phage, (3) Blocage de l'injection de l'ADN du phage, (4) Clivage de l'ADN du phage injecté, (5) Inhibition de la réplication de l'ADN du phage, (6) Interférence avec l'assemblage du phage, (7) Suicide de la bactérie, (8) Autres systèmes nouvellement découverts.

Même lorsque l'injection de l'ADN du phage se fait, la bactérie peut cliver cet ADN en utilisant un mécanisme de défense inné ou adaptatif. Le système de défense inné consiste principalement en un système de restriction-modification (R-M) impliquant 2 enzymes : une endonucléase de restriction (REase) et une méthyltransférase (MTase). L'injection de l'ADN du phage dans une bactérie possédant un système R-M aura pour conséquence soit sa méthylation par une MTase bactérienne au niveau de certaines séquences de reconnaissance conduisant à l'initiation du cycle lytique soit sa digestion (clivage) par une REase la reconnaissant comme corps étranger suite à une absence de méthylation appropriée (Labrie et al., 2010). Un deuxième cas de figure de système de défense innée est le DISARM « defense island system associated with restriction modification », constitué de plusieurs îlots de défense ayant une fonction similaire à celle du système R-M. La fonction de modification consiste en une MTase similaire à celle trouvée dans le système R-M classique, tandis que sa fonction de restriction dont le mécanisme n'est pas encore bien élucidé semble être unique et nécessite plusieurs composants. Ce système a été rencontré chez *Bacillus paralicheniformis* lui permettant de résister contre les 3 familles de phage de l'ordre des *Caudovirales* (Ofir et al., 2018). Tout récemment, les pAgos (protéines argonaute) ont également été identifiés comme système de défense innée pouvant cliver les acides nucléiques *in vitro*, y compris celle des phages envahissants la bactérie bien qu'à ce jour aucune étude n'a examiné l'activité des pAgos lors de l'infection par les phages (Murugan et al., 2017; Willkomm et al., 2018). D'autre part, il existe un système de défense adaptatif des bactéries appelé CRISPR-Cas « Clustered, Regularly Interspaced, Short Palindromic Repeat » qui consiste en une modification du génome bactérien par une intégration de petits fragments (21–48 pb) d'ADN étrangers appelés « Spacers » dans les loci CRISPR acquis au cours de précédentes rencontres avec des acides nucléiques étrangers (bactériophages, plasmides). Après transcription de ces loci CRISPR en ARN-CRISPR, les séquences des « Spacers » vont orienter les protéines nucléases (Cas) vers un clivage systématique d'acides nucléiques complémentaires pénétrant la bactérie (Fig 14 et 15) (Lindsay, 2010).

Lors de la répllication de l'ADN du phage dans la bactérie, on peut assister à son inhibition par un système d'exclusion de bactériophage appelé « BREX » agissant par une méthylation sur les motifs TAGGAG non palindromiques dans le génome bactérien responsables de l'auto-discrimination (Goldfarb et al., 2015). Bien que son mécanisme reste encore inconnu, une introduction du BREX dans une souche bactérienne pourrait lui conférer une résistance contre une large gamme de phages, tel que démontré avec *Bacillus subtilis* (Goldfarb et al., 2015).

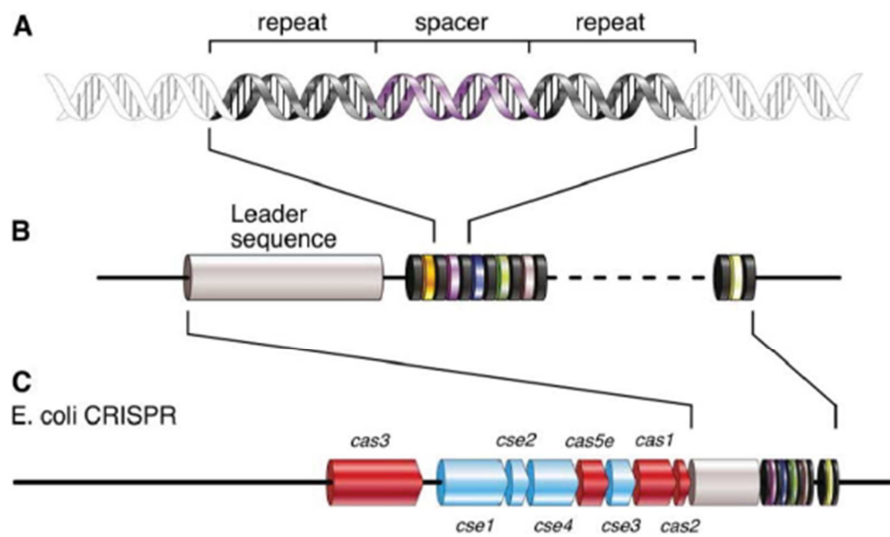


Figure 14. Structure du locus CRISPR-Cas chez *E. coli* (Karginov, Fedor V. and Hannon, 2010).

- (A) Alternance de séquences répétées palindromiques (*repeats*) avec les séquences variables (*spacer*).
- (B) Séquence conservée (*leader sequence*) de plusieurs centaines de paires de base séparant la région codant les gènes associés (à gauche) de la région comportant les *repeats* et *spacers*.
- (C) Gènes *Cas* différents selon l'organisme considéré : les gènes présents dans l'ensemble des espèces sont représentés en rouge, les gènes spécifiques d'*E. coli* en bleu.

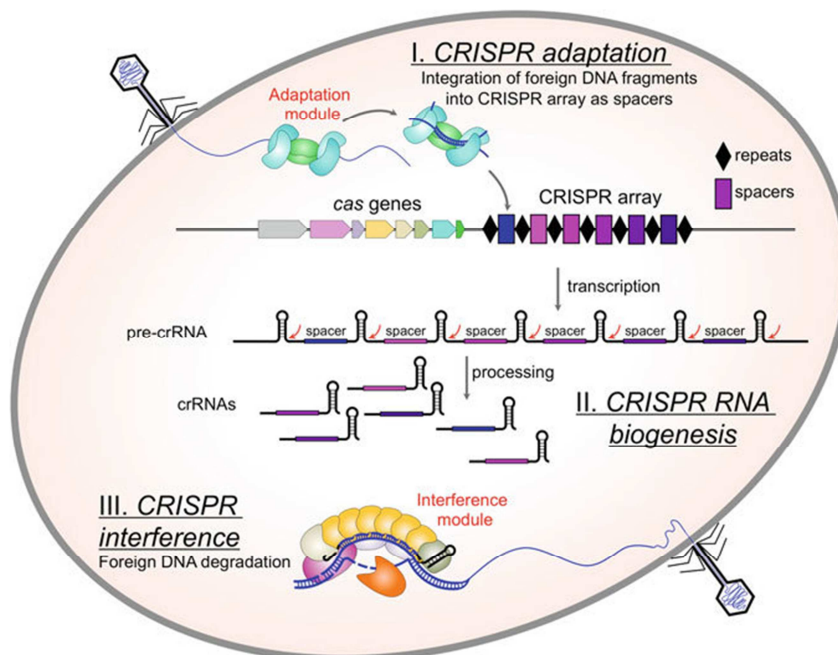


Figure 15. Différentes étapes du système CRISPR-Cas (Semenova, Ekaterina and Severinov, 2017)

L'assemblage des phages dans la bactérie pourrait aussi subir des interférences sous le contrôle d'une région chromosomique bactérienne appelée PICI (*Phage Inductible Chromosomal Island*) (Carpena et al., 2016; Martínez-rubio et al., 2017). Suite à l'infection du phage, le PICI va s'exciser, se mettre en circulation, se répliquer et s'assembler préférentiellement avec les autres particules de virions conduisant ainsi à la formation de nouveaux phages (virions) contenant l'ADN du PICI plutôt que celui du phage mature proprement dit. On assistera tout de même à une lyse de la bactérie initiale et à la libération de ces virions qui vont à leur tour infecter les bactéries voisines et propager l'ADN détourné (PICI) codant pour des facteurs de virulence bactérienne. Des exemples typiques de cette interférence ont été observés chez *S. aureus* et *Vibrio (V.) cholerae* où les PICIs portent respectivement les noms de SaPIs (*Staphylococcus aureus* Pathogenicity Islands) et de PLE (PICI Like Element) qui véhiculent et diffusent d'importants facteurs de virulence (Carpena et al., 2016; O'Hara et al., 2016).

De façon plus radicale, la bactérie peut résister à l'attaque des bactériophages par un mécanisme d'infection abortive (ou suicide) consistant en sa mort programmée afin d'empêcher son infection par le phage et protéger ainsi les autres bactéries voisines. Ce système souvent codés par des éléments génétiques mobiles (ex : plasmides, prophage) permet d'interrompre le développement du phage à n'importe quel moment de son cycle (Snyder, 1995; Emond et al., 1998). Bien que non encore répandu chez les bactéries, des cas d'infections abortives ont été observés chez *Lactobacillus lactis* et *E. coli* (Labrie et al., 2010; Dy et al., 2014).

Outres les mécanismes cités plus hauts, de nouveaux systèmes de résistance des bactéries contre les phages existent, mais ne sont pas encore bien étudiés. C'est le cas des systèmes Zorya, Thoeris et Druantia impliquant différentes régions du génome bactérien (Baker and O'Toole, 2017; Doron et al., 2018).

3.4.2. Adaptation des bactériophages à la résistance bactérienne

Suite à la résistance bactérienne, les bactériophages vont eux aussi trouver des voies de contournement leur permettant d'exécuter leur action. Face à l'inhibition de leur adsorption par les bactéries et aux variations de phase des récepteurs bactériens, les phages vont effectuer des mutations dans les gènes codant pour leurs protéines de liaison « Receptor Binding Protein » (RBP) afin de se fixer à d'autres récepteurs apparentés à ceux initialement prévus et ainsi déjouer la résistance bactérienne. Pour contrecarrer le blocage de l'injection d'ADN, les phages vont produire une enzyme capable de dégrader la barrière physique créée par la bactérie. Pour contourner le système R-M, le phage peut se priver des sites de reconnaissance de la REase sur son génome (Azam and Tanji, 2019). Les phages vont également être capable de contourner le système CRISPR/Cas bactérien soit par une acquisition de mutation ponctuelle dans les séquences des « Spacers » (ou région PAM); soit par

production d'une protéine anti- CRISPR qui interfère avec le système (Deveau et al., 2008; Bondy-Denomy et al., 2013). En ce qui concerne l'inhibition de la réplication de l'ADN du phage, une résistance du phage au système BREX a été observée dans certaines situations, indiquant que les phages peuvent développer un mécanisme anti-BREX (Goldfarb et al., 2015; Chaudhary et al., 2018). Des études montrent également que les phages spécifiques de *V. cholerae* pourraient utiliser le système CRISPR / Cas de leur génome pour neutraliser les mécanismes de défense bactériennes contre les phages, y compris ceux liés à leur assemblage tels que les PICI / PLE (O'Hara et al., 2016).

Enfin, pour résister contre l'infection abortive, les phages vont développer un certain nombre de mécanismes tels que la production d'une protéine agissant comme antitoxine (Otsuka and Yonesaki, 2012) ou l'échange d'une large région génomique avec le prophage résiduel qu'ils exploitent pour contourner le système d'infection abortive (Labrie and Moineau, 2007).

3.5. Phagothérapie

3.5.1. Evolution de la phagothérapie

L'effet antibactérien des bactériophages a été découvert en 1896, par le bactériologiste britannique Ernest Hanbury Hankin (1865-1939) qui avait constaté qu'un agent présent dans les eaux des fleuves Gange et Yamuna en Inde avait une action antibactérienne contre les vibrions cholériques et pouvait traverser des filtres en porcelaine très fins (Abedon et al., 2011). Par la suite, en 1915, un autre bactériologiste britannique, Frederick Twort (1877-1950) découvrait que de petits agents ultra-filtrables, inactivés par la chaleur, ne se développant qu'en présence de bactéries pouvaient infecter et détruire les bactéries (Duckworth, 1976). En 1917, le microbiologiste franco-canadien Félix d'Hérelle (1873-1949) découvrit "un microbe invisible et antagoniste du bacille de la dysenterie" qu'il isola et mit en évidence la spécificité et les plages de lyse (Hans-W. Ackermann, 2011). D'Hérelle a appelé ce virus « mangeur de bactérie » (bactériophage) et a mené de nombreuses recherches conduisant à l'introduction du concept de « thérapie par les phages » en 1919. Cette thérapie se concrétisa par le traitement d'enfants victimes de dysenterie bacillaire à l'hôpital Necker de Paris en 1919 et aussi par le traitement de *Salmonella enterica* chez des volailles (Dublanche, 2009; Keen, 2012). Elle permettra par la suite au traitement de la peste en Égypte durant l'année 1925 et du choléra en Inde en 1926 (D'Hérelle F., 1925; Morison J., 1935). Les découvertes de Twort et d'Herelle ont ainsi révolutionné la recherche sur les phages et ont permis une application de la phagothérapie dans différentes disciplines, allant de la médecine humaine à la médecine vétérinaire en passant par l'agriculture (Sulakvelidze and Barrow, 2004). Ce succès avait incité le monde médical à s'intéresser à la phagothérapie dans les années 30, si bien qu'en 1933 Georgi Eliava, un élève de Félix D'Hérelle, crée à Tbilissi la première institution mondiale intégralement consacrée aux bactériophages et à la phagothérapie « l'institut du bactériophage » (Dublanche, 2009). La découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928,

les polémiques de chercheurs tels que Jules Bordet mettant en doute la véracité de la phagothérapie et enfin la seconde guerre mondiale de 1939 générant des besoins immenses en traitements anti-infectieux ont mené à l'abandon progressif de la phagothérapie. Ceci a profité à l'antibiothérapie jusque dans les années 80 qui ont été marquées par la destruction des collections de bactériophages de l'institut Pasteur de Paris et de Lyon (Dublanche and Fruciano, 2008). L'avènement de la guerre froide a également contribué à l'abandon total et l'oubli de la phagothérapie par les pays occidentaux suite à la fermeture de toutes les frontières (y compris les échanges de savoir-faire) entre les pays de l'Europe de l'Est et de l'Occident. Dans les années 90, la fin de la guerre froide et l'apparition de nombreuses antibio-résistances ont contribué à un regain progressif d'intérêt pour la phagothérapie dans les pays occidentaux. Depuis les années 2000 jusqu'à nos jours, on assiste à une augmentation des recherches et à un intérêt accru des firmes pharmaceutiques pour la phagothérapie en Occident (Ravat et al., 2015).

3.5.2. Utilisation thérapeutique des phages

La volonté croissante à utiliser des phages en tant qu'agents thérapeutiques s'explique par le fait qu'ils offrent plusieurs avantages par rapport à l'utilisation des antibiotiques. En effet, i) les phages ne ciblent que les agents pathogènes d'intérêt tout en maintenant intacte la microflore normale ; ii) leur mécanisme d'action est complètement différent de celui des antibiotiques et ils sont également actifs sur les bactéries multi-résistantes, constituant de ce fait une dernière ligne de défense très utile; iii) contrairement aux antibiotiques, les effets lytiques des phages sont tous localisés au site d'infection (Veiga-Crespo and Villa, 2009); iv) on assiste à une augmentation exponentielle de la dose initiale de traitement par un bactériophage au fur et à mesure que le virus se multiplie au sein de la bactérie sensible suivi de sa libération ; v) dans certaines situations, une seule dose de phage peut être suffisante pour éliminer une infection bactérienne; vi) il a été également prouvé que les phages peuvent pénétrer dans les tissus mal vascularisés et même traverser la barrière hémato-encéphalique (Alisky et al., 1998); vii) en outre, très peu de cas d'effets secondaires ou de réactions allergiques ont été révélés suite au traitement par les phages bien que des effets immunologiques puissent survenir à doses multiples (Deresinski, 2009); viii) en raison de leur abondance dans l'environnement, il est beaucoup moins compliqué et moins coûteux d'isoler et d'amplifier de nouveaux bactériophages que de produire de nouveaux antibiotiques ou vaccins (Veiga-Crespo and Villa, 2009).

Par ailleurs, la phagothérapie peut également présenter un certain nombre d'inconvénients pouvant être liés soit :

- A la sélection de phages à utiliser qui doit être obligatoirement un phage lytique, compte tenu du fait que l'utilisation des phages tempérés peut entraîner le transfert à la bactérie de gènes de résistance aux antibiotiques ou de virulence et induire la production de toxines bactériennes

(Skurnik et al., 2007). Cette sélection devrait également exclure les phages à faible « virulence » ainsi que les phages à faible pharmacocinétique (absorption, distribution et survie *in situ*) (Dabrowska and Abedon, 2019). En résumé le phage sélectionné devrait avoir une bonne pharmacodynamique primaire (virulence antibactérienne), minimiser la pharmacodynamique secondaire (effet néfaste sur l'homme ou l'animal) et une bonne pharmacocinétique (capacité à cibler les bactéries *in situ*).

- Au spectre d'hôte du phage qui est généralement étroit et limité à quelques souches, quelques espèces ou encore quelques genres bactériens, ce qui limite son utilisation lors du traitement présomptif (avant l'identification de la sensibilité de la bactérie pathogène au phage). C'est la raison pour laquelle des cocktails de phages ou une combinaison des phages aux antibiotiques sont généralement utilisés afin de contourner le problème de spectre étroit (Kutter, 2009; Kutateladze and Adamia, 2010).
- Au fait que d'autres produits pharmaceutiques à base de protéines (antibiotiques) ayant les mêmes propriétés que les phages (lyse bactérienne) peuvent encore être utilisés au détriment des phages. De plus, les particularités des phages font que leur utilisation a encore du mal à être validée et standardisée. En outre, les phages étant connus comme des virus ont encore du mal à être accepté par les populations comme médicament potentiel, mais qui les considèrent plutôt comme des agents pathogènes (Kutter et al., 2010).

De façon générale, l'utilisation thérapeutique des phages peut se faire de quatre manières (Viertel et al., 2014): (i) la phagothérapie conventionnelle utilisant principalement des phages afin de produire une lyse des espèces bactériennes cibles; (ii) la phagothérapie modifiée utilisant des phages génétiquement modifiés afin de favoriser certaines propriétés telles que la réplication non lytique et d'éviter la possibilité d'un choc endotoxinique lorsque les cellules bactériennes sont lysées; (iii) le traitement avec des enzymes dérivées de phages, telles que l'administration des endolysines permettant une dégradation de la paroi bactérienne (peptidoglycane) ainsi qu'une lyse bactérienne (Fig. 16); (iv) l'association de phages et d'antibiotiques, dans laquelle les phages permettent de dégrader les composants polysaccharidiques des biofilms, permettant ainsi aux antibiotiques de pénétrer et d'agir dans la bactérie (Bedi et al., 2009; Maciejewska et al., 2018).

Les produits à base de phage développés de nos jours par des firmes pharmaceutiques sont le plus souvent utilisés dans les secteurs agricoles, agro-alimentaires et de plus en plus vétérinaires (fig. 17).

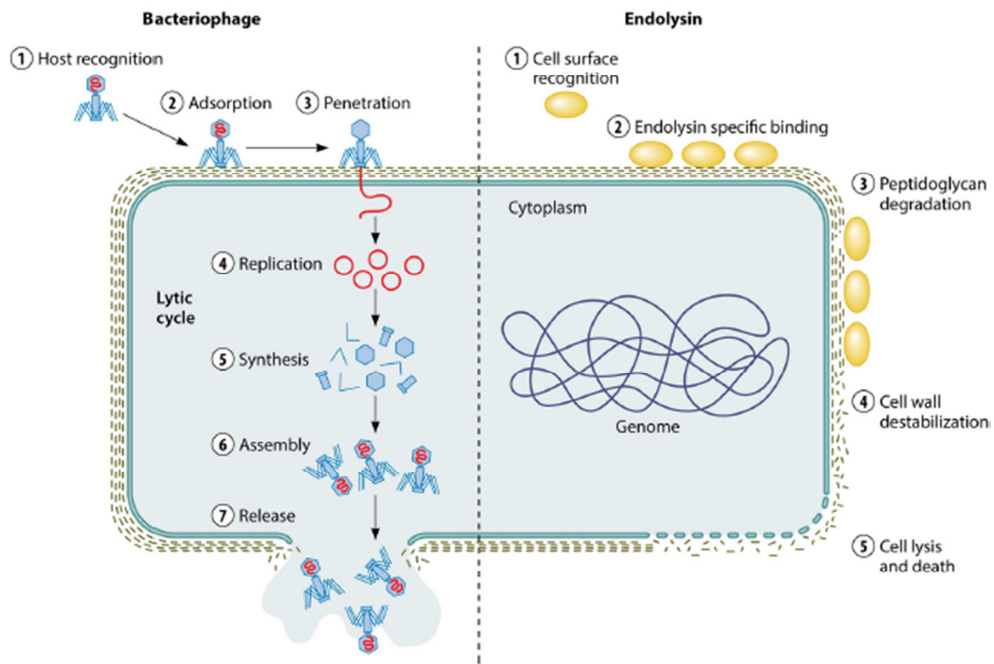


Figure 16. Utilisation thérapeutique de bactériophage vs endolysine (Álvarez et al., 2019).

Name of phage preparation	Target bacterial species	Animal species or food products	Administrative organs and legal regulations permitting the product's use	Countries where the product is approved for use	Company website or references
SalmoLyse®	<i>Salmonella</i> spp.	Poultry (turkey, chicken), tuna, cantaloupe, lettuce, pets food products	FDA	USA	Soffer <i>et al.</i> (2016)
SalmoPro®	<i>Salmonella</i> spp.	Food products	FDA, GRN 603	China, Canada	Moye <i>et al.</i> (2018)
PLSV-1™	<i>Salmonella</i> spp.	Pets, livestock	FDA	USA	Moye <i>et al.</i> (2018)
SalmoFresh™	<i>S. enterica</i>	Poultry, red meat	FDA-2013 (GRAS) Notice No. GRN 000435 FDA, GRN 435; USDA, FSIS Directive 7120.1; Israel Ministry of Health; Health Canada	USA, Canada, Israel	Moye <i>et al.</i> (2018); Intralytix Corp. website
Salmonalex™, Phage Guard S	<i>Salmonella</i> spp.		FSANZ	USA, EU, Canada, Australia, New Zealand, Switzerland, Israel	Phage Guard Corp.
SalmoPro®	<i>S. enterica</i>	Food control	FDA, GRN 603	Canada	Phagelux Corp. website
INT-401™	<i>C. perfringens</i>	Poultry	FDA, FSIS	USA,	Intralytix Corp. Website;
Secure Shield E1	<i>E. coli</i> O157:H7	Human food application: beef products, turkey	FDA, GRN 724	USA	Woolston and Sulakvelidze (2015)
BAFASAL®	<i>S. Enteritidis</i> & <i>S. Typhimurium</i>	Feed supplement in poultry, other livestock	EU	European Union countries	Proteon Pharmaceuticals S.A. (PL)
ListShield™	<i>Listeria monocytogenes</i>	Beef and poultry meat products	GRAS Notice No. 000528; FSIS Directive 7120.1;	USA	Intralytix Corp. website; Moye <i>et al.</i> (2018)
Listex™	<i>L. monocytogenes</i>	Beef and turkey products	GRAS Notice No. 000218; FSIS Directive 7120.1	USA	Intralytix Corp. website; Moye <i>et al.</i> (2018)
PhageGuard Listex™	<i>L. monocytogenes</i>		FDA, GRN 198/218; FSANZ; EFSA; Swiss BAG; Israel Ministry of Health; Health Canada	USA, Canada, Switzerland, Israel	Moye <i>et al.</i> (2018)
EcoShield™	<i>E. coli</i> O157:H7	Various food including ground beef	FDA, FCN No. 1018; FSIS Directive 7120.1; Health Canada; National Food Service of Israel Ministry of Health Ref: 70275202; Health Canada	Canada, Israel, USA	Intralytix Corp.
Finalyse®	<i>E. coli</i> O157:H7 and other Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>	Feed supplement or aerosol disinfection in cattle	Food Safety and Inspection Service	USA	West Des Moines, IA, USA
Ecolicide® (EcolicidePX™)	<i>E. coli</i> O157:H7		USDA, FSIS Directive 7120.1	USA	Moye <i>et al.</i> (2018)
ShigaShield™ (ShigActive™)	<i>Shigella</i> spp.	Ready-to-eat (RTE) meats, fish and shellfish, fruits, vegetables, dairy products	FSIS Directive 7120.1; GRAS notification	USA	Intralytix Corp. website
AgriPhage™	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	Plant food products	EPA Reg. No. 67986-1	USA	Intralytix Corp. website

Figure 17. Produits commerciaux à base de bactériophages dans les secteurs agricoles, agro-alimentaires et vétérinaires (Dec *et al.*, 2020)

3.5.3. Phagothérapie et mammites bovines

Suite aux avancées de la recherche sur les phages, la thérapie par phages apparaît comme l'une des mesures les plus durables de lutte contre la mammite bovine. Néanmoins, il s'avère essentiel de bien connaître la pathologie ainsi que le cycle du phage utilisé (Basdew et Laing, 2011). Quelques études récentes ont déjà mis en évidence l'utilisation thérapeutique des phages pour le traitement des mammites bovines. L'utilisation de la phagothérapie dans ce cadre se fait soit par l'administration de bactériophages (seul ou en cocktail), soit par l'administration d'endolysines, avec pour cible principale *S. aureus* (agent majeur de mammites bovines) (Angelopoulou et al., 2019).

Traitement par les bactériophages

Le traitement par l'administration des phages exploite les propriétés antimicrobiennes (lyse de bactéries) des phages présentant un spectre d'hôte le plus souvent étroit leur permettant de cibler de façon spécifique certains genres, espèces voire souches bactériennes. Cette administration de bactériophages pour le traitement des mammites bovines à titre curatif ou préventif peut se faire par lavage, trempage ou infusion intra-mammaire. En fonction des agents pathogènes ciblés, différents types de phages sont distingués :

- **Les phages anti-staphylococciques** qui possèdent un spectre d'hôte assez large contre la majorité des espèces du genre *Staphylococcus*. L'un des premiers phages anti-staphylococcique identifié était le phage K qui possédait des propriétés lytiques contre les souches de *S. aureus* d'origine humaine mais n'était pas actif dans le lait cru, montrant ainsi son inefficacité contre les souches provenant de mammites bovines (O'Flaherty et al., 2005; Gill et al., 2006). Puis le phage MSA6 isolé à partir de mammites bovines, ayant une morphologie proche du phage K avait été identifié comme ayant une activité lytique aussi bien sur les souches de *S. aureus* bovines que sur les souches humaines (Kwiatak et al., 2012). Par la suite, de plus en plus d'études ont permis d'identifier des phages ayant une bonne activité lytique sur les souches de *S. aureus* mammapathogènes tels que les phages SPW (Li and Zhang, 2014), le phage SA (Hamza et al., 2016), les phages ϕ SA012 et ϕ SA039 (Iwano et al., 2018) et les phages SAJK et IND/MSP (Ganaie et al., 2018). Ces phages isolés pour la plupart à partir d'eaux d'égoûts ou du lait de vache présentent une bonne stabilité du point de vue pH et température avec un spectre d'hôte de plus en plus large.
- Un seul **phage anti-streptococcique**, le phage JX01 a jusqu'ici été identifié contre *Str. agalactiae* qui est un agent majeur de mammite bovine. Ce phage isolé à partir du lait de vache atteinte de mammite présente une bonne stabilité du point de vue pH, mais une sensibilité à la chaleur (Bai et al., 2016; Angelopoulou et al., 2019).

- **Contre les souches *E. coli*** d'origine bovine, un cocktail de phages (deux phages de type T4, un phage apparenté à rV5 et un phage apparenté au phi92) a été étudié et présentait une réduction de plus de 50% des souches d'*E. coli* dans le lait cru *in vitro* (Porter et al., 2016). Puis, plus récemment encore, le phage UVF13 a été identifié comme permettant de réduire de 10 fois l'infection par les souches d'*E. coli* mammopathogènes en modèle murin (V. Da Silva Duarte et al., 2018)
- Contre *Trueperella pyogenes* qui est un agent majeur de mammites, il a également été démontré que le phage UVF13 permettait la réduction de la production de biofilm, principal mécanisme par lequel cette bactérie résiste à l'action des antibiotiques (V. Da Silva Duarte et al., 2018).

Traitement par les endolysines de phage

Les endolysines sont des enzymes synthétisées par les phages capables de lyser la cellule infectée à la fin du cycle lytique afin de libérer la descendance des virions. Bien que les endolysines agissent généralement de l'intérieur de la bactérie par dégradation du peptidoglycane, cette propriété est exploitée chez les bactéries Gram positives en les appliquant à l'extérieur étant donné l'absence de membrane externe (Schmelcher et al., 2012a). Les endolysines des bactéries Gram positives sont composées de 2 domaines : un domaine actif sur la paroi cellulaire permettant la reconnaissance du substrat et un domaine enzymatique par lequel elles agissent. En fonction du mode d'action du domaine enzymatique, elles sont classées en plusieurs groupes : les N-acétyl-béta-d-muramidases, les transglycosylases lytiques; les N-acétyl-béta-d-glucosaminidases; les N-acétylmuramoyl-l-alanine amidases et les endopeptidases (Schmelcher et al., 2012a). Dans le cadre des mammites bovines, elles sont classées en 2 groupes en fonction des bactéries Gram positifs sur lesquelles elles agissent :

- Les **endolysines agissant contre les staphylocoques** responsables de mammites bovines ont pu être identifiées lors de plusieurs études. Il a été démontré que les endolysines Phi11 et LysK (provenant du phage K) présentaient une activité lytique sur les souches de *S. aureus* mammopathogènes respectivement *in vitro* et en modèle murin (Donovan et al., 2006; Schmelcher et al., 2012b). De même, l'endolysine CHAP_K a été identifiée comme ayant les capacités de détruire les biofilms de staphylocoques mammopathogènes ou d'empêcher leur formation, permettant ainsi leur utilisation à titre curatif ou préventif contre les mammites bovines (Fenton et al., 2013). Plus récemment encore les effets de l'endolysine LysK delta amidase ont été prouvés sur les staphylocoques résistants et sensibles à la méticilline (Zhou et al., 2017).
- Les **endolysines actives contre les streptocoques** responsables de mammites bovines sont principalement les Lambda SA2 et B30 qui ont montré une efficacité aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (modèle murin) contre les souches de *Str. agalactiae* et *Str. uberis* (Schmelcher et al., 2015). De même, l'endolysine PlyC (peptidoglycane hydrolase) dérivée du phage du streptocoque C1 a été

identifiée comme ayant une action lytique sur la paroi de *Str. uberis* et provoquant une diminution des PMN lors de son administration à des vaches atteintes de mammite (Scholte et al., 2018).

Objectifs

Au vu des importantes pertes économiques engendrées par les mammites bovines (chute de la production laitière, pénalités financières, traitement des vaches et réforme des vaches incurables) et des risques pour la santé publique suite à l'utilisation des antibiotiques, il s'avère urgent de trouver une alternative de lutte contre les mammites bovines afin de contrer la sélection et la diffusion de bactéries résistantes.

Dans cette optique, ce travail de thèse a consisté en l'évaluation de l'utilisation thérapeutique de bactériophages en tant qu'alternative de lutte contre les mammites bovines dues à *S. aureus*. Afin d'atteindre cet objectif général, le travail s'est divisé en 3 volets.

Le premier objectif spécifique a été de constituer des collections de MRS isolés d'animaux domestiques, y compris de cas de mammites bovines. Ce premier volet a permis d'établir une collection conséquente, nécessaire au deuxième objectif spécifique qui a été d'identifier et de comparer les mécanismes génétiques de résistance à la méticilline de ces MRS isolés de ces différentes espèces animales et conditions cliniques. Enfin, le troisième objectif spécifique a été d'évaluer l'utilisation thérapeutique de bactériophages contre des souches de *S. aureus*, MRSA et MSSA (« Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* »), responsables de mammites bovines. Ce dernier volet a contribué à la compréhension de l'efficacité et de l'innocuité des bactériophages dans différents modèles, *in vitro* et *in vivo*.

Section expérimentale

———— Section expérimentale

ETUDE 1 : CONSTITUTION DES COLLECTIONS DE STAPHYLOCOQUES

1.1. Préambule

L'objectif de cette première partie du travail était de constituer des collections de staphylocoques pour en identifier les souches MRSA et MRNAS. Ces souches de staphylocoques utilisées dans cette étude ont été obtenues, d'une part, à partir de diverses collections existantes dans le laboratoire de bactériologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège et, d'autre part, à partir de nouveaux prélèvements réalisés au cours de deux projets.

Les souches de staphylocoques existantes dans notre laboratoire avaient été isolées dans différents pays (Belgique, Italie, Suisse, Canada, Sénégal, Niger, Japon) à partir de divers hôtes (bovins, chiens, chats, animaux sauvages, environnement, humains) dans le cadre de différentes études précédentes. Elles ont été conservées à -80°C en bouillon glycérolé. Elles ont été ré-ensemencées sur trois milieux gélosés (gélose LB ou Luria-Bertani/lysogeny broth, gélose Columbia au sang de mouton et gélose Mannitol-Salt ou de Chapman), purifiées et ré-identifiées au genre *Staphylococcus* par nos soins, afin d'être utilisées pour la suite de nos études.

Quant aux nouvelles souches, elles ont été isolées à partir d'échantillons de lait de vaches atteintes de mammites, d'une part, en Belgique dans le cadre du projet « Mammiscan » (en collaboration avec le service thériogenologie des grands animaux de la faculté de médecine vétérinaire ; Dr. A-S Rao) et, d'autre part, en Belgique et en Norvège dans le cadre du projet « MRSA_BACTERIOPHAGE » (ANIHWA ERA-Net - Animal Health and Welfare ERA-Net) coordonné par le service de bactériologie de la faculté de médecine vétérinaire. Ces nouvelles souches ont également été identifiées au genre *Staphylococcus* pour la suite de notre étude. Les souches isolées dans le cadre du projet « Mammiscan » font l'objet d'un article publié dans « Journal of Applied Microbiology ».

Les résultats de cette première partie nous ont permis d'avoir un profil général des espèces de staphylocoques présents dans différents pays et issus de différents hôtes.

1.2. Collections existantes de diverses origines

1.2.1. Matériels et méthodes

Collecte des souches

Entre 2005 et 2012, un total de 1425 souches de staphylocoques ont été reçues de différents pays : Belgique (n=653), Italie (n=45), Suisse (n=25), Canada (n=91), Niger (N=287), Sénégal (n=91) et Japon (n=233). Les souches Belges avaient été isolées à partir des échantillons lait provenant de mammites bovines (n=584), des écouvillons nasaux d'hommes (n=50), des ganglions de sanglier (n=6), d'une plaie de chien (n=1), d'une plaie de chat (n=1), d'une plaie de cheval (n=1), d'un ganglion de cervidé (n=1), d'un ganglion de lièvre (n=1), d'un encéphale chevreuil (n=3) et de l'environnement (n=5) (Ote et al., 2011; Bardiau et al., 2013a, 2016). Les souches d'Italie, de Suisse et du Canada avaient été isolées à partir d'échantillons de lait provenant de mammites bovines (Bardiau et al., 2016). Les souches du Niger avaient été isolées d'une part à partir d'échantillons de lait provenant de mammites bovines (n=282) et d'autre part à partir d'écouvillons provenant des mains des trayeurs de vaches (n=3) (Issa et al., 2013). Les souches du Sénégal provenaient exclusivement des mammites bovines (Kadja et al., 2010), tandis que les souches japonaises avaient été isolées à partir de plaies de chats (n=49) et de chiens (n=184) (Bardiau et al., 2013b)

Identification au genre *Staphylococcus*

A partir des bouillons glycérolés congelés à -80°C, les 1425 souches ont étéensemencées sur milieux gélosés pour identification au genre *Staphylococcus*. La gélose LB a étéensemencée pour mettre en évidence la croissance bactérienne et la pureté de la culture, tandis que la gélose Columbia à 5% de sang de mouton (BioMérieux, France) a été utilisée pour mettre en évidence les différentes hémolyses (alpha, bêta ou gamma) et la gélose Chapman (Oxoid, Belgique) sélective pour les staphylocoques a été utilisée pour mettre en évidence la dégradation du mannitol. Ensuite, des tests biochimiques, tels que le test de coagulase (VWR, Belgique) et le test d'agglutination de particules de latex (Pastorex®, Bio-Rad, France) ont été appliqués, respectivement, pour la détection de la coagulase et pour celles du facteur d'agglutination spécifiques à *S. aureus*.

Les souches identifiées au genre *Staphylococcus* ont été réensemencées dans du bouillon LB, dont 500µl ont été stockés à -80°C dans 500µl de glycérol stérile à 80% jusqu'à utilisation ultérieure.

1.2.2. Résultats

Une croissance de colonies typiques de staphylocoques a été obtenue pour 1350 échantillons glycérolés sur les 1425 ré-ensemencés. Les 75 autres échantillons étaient soit contaminés, soit n'ont

pas donné de croissance. La caractérisation de ces 1350 souches de staphylocoques a permis d'obtenir les résultats résumés dans la Tableau V. Ainsi, les hémolyses de types alpha, bêta et gamma ont été obtenues respectivement avec 17, 1184 et 149 souches de staphylocoques, tandis que 1214 souches ont été mannitol positives sur milieu Chapman. D'autre part, 1193 et 879 souches ont été positives, respectivement, aux tests de coagulase et d'agglutination de particules de latex. De ces résultats, il en découle une pré-identification de 879 *S. aureus* et 471 staphylocoques non *aureus*, dont 314 sont coagulase positives. Les 1350 souches de staphylocoques obtenues provenaient de (Tableau V) :

- Belgique (n=611) : mammites bovines (n=545), écouvillons nasaux d'hommes (n=48), ganglions de sanglier (n=6), plaie de chien (n=1), plaie de chat (n=1), plaie de cheval (n=1), ganglion de cervidé (n=1), ganglion de lièvre (n=1), encéphale chevreuil (n=3) et l'environnement (n=4) (Ote et al., 2011; Bardiau et al., 2013a, 2016);

- Italie (n=45), Suisse (n=25), Canada (n=90) : mammites bovines (Bardiau et al., 2016);

- Niger (N=256) : mammites bovines (n=253) et mains des trayeurs (n=3)(Issa et al., 2013);

- Sénégal (n=90) : mammites bovines (Kadja et al., 2010);

- Japon (n=233) : plaies de chats (n=49) et de chiens (n=184) (Bardiau et al., 2013b)

Tableau V : Caractérisation des 1350 souches de staphylocoques de diverses origines*

ORIGINE	ESPECES	Gélose de sang (hémolyse)			CHAPMAN		Staphaurex		Coagulase	
		Alpha	Béta	Non hémo.	Mannitol+	Mannitol-	Agl. (+)	Agl. (-)	Coag+	Coag-
SENEGAL	BOVIN	0	86	4	87	3	89	1	90	0
NIGER	BOVIN	14	134	105	146	107	181	72	214	39
	HOMME	0	1	2	3	0	2	1	3	0
Belgique	BOVIN	2	521	22	533	12	422	123	460	85
	HOMME	0	44	4	45	3	29	19	44	4
	SANGLIER	0	6	0	3	3	4	2	6	0
	CHIEN	0	1	0	0	1	1	0	1	0
	CHAT	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	CHEVAL	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	CERVIDE	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	LIEVRE	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	CHEVREUIL	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	ENVMT	1	2	1	4	0	3	1	3	1
CANADA	BOVIN	0	82	8	88	2	58	32	80	10
ITALIE	BOVIN	0	45	0	45	0	23	22	37	8
SUISSE	BOVIN	0	25	0	25	0	5	20	15	10
JAPON	CHIEN	0	184	0	179	5	24	160	184	0
	CHAT	0	46	3	49	0	31	18	49	0
Total		17	1184	149	1214	136	879	471	1193	157

*Hémo.= hémolytique, Agl.= agglutination, Coag.= coagulase

1.3. Collection « Mammiscan »

Les souches de la collection Mammiscan sont décrites dans l'article publié « Comparison of quantitative PCR and MALDI-TOF mass spectrometry assays for identification of bacteria in milk samples from cows with subclinical mastitis ». Les échantillons de lait récoltés à partir des vaches atteintes de mammites subcliniques en Wallonie (Belgique) dans le cadre du projet Mammiscan ont été étudiés en vue d'une identification des bactéries mammopathogènes par deux techniques : une qPCR multiplexe (Pathoproof[®]) et le « matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry » (MALDI-TOF MS) après culture des échantillons sur quatre milieux gélosés. Les résultats montrent ainsi une certaine concordance entre les deux techniques, bien que présentant chacune des avantages et des inconvénients. Cet article a, par conséquent, permis de constituer une nouvelle collection de 112 souches de staphylocoques belges dont 60 *S. aureus* et, donc, de mettre en évidence l'espèce *S. aureus* comme espèce majoritaire de mammites bovines, confirmant ainsi sa position mondialement connue d'agent pathogène majeur des mammites sub-cliniques.

Article 1: Comparison of quantitative PCR and MALDI-TOF mass spectrometry assays for identification of bacteria in milk samples from cows with subclinical mastitis.

C. Ngassam Tchamba¹, A.S. Rao², F. Boyen³, F. Haesebrouck³, J.-N. Duprez¹, L. Theron², D. Thiry¹ and J.G. Mainil¹

¹Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Institute for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liege, Liege, Belgium


²Obstetrics, Department of Large Animal Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine and Institute for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liege, Liege, Belgium

³Bacteriology and Avian Diseases, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium

Journal of Applied Microbiology, 2019, **127**: 683-692. doi: 10.1111/jam.143

ORIGINAL ARTICLE

Comparison of quantitative PCR and MALDI-TOF mass spectrometry assays for identification of bacteria in milk samples from cows with subclinical mastitis

C. Ngassam Tchamba^{1†}, A.S. Rao^{2*†}, F. Boyen^{3†}, F. Haesebrouck³, J.-N. Duprez¹, L. Théron^{2**}, D. Thiry¹ and J.G. Mainil¹ 

1 Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Institute for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liège, Liège, Belgium

2 Obstetrics, Department of Large Animal Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine and Institute for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liège, Liège, Belgium

3 Bacteriology and Avian Diseases, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium

Keywords

bacteria, cattle, MALDI-TOF MS[®], milk samples, multiplex qPCR.

Correspondence

Jacques G. Mainil, Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Campus du Sart-Tilman B43a, Quartier Vallée II, Avenue de Cureghem 6, 4000 Liège, Belgium.

E-mail: jg.mainil@uliege.be

*Present address: RumeXpert, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000, Liège, Belgium

**Present address: Hipra Belgium, B-9000, Ghent, Belgium

†Equally participated to the study.

2018/2387: received 6 November 2018, revised 7 June 2019 and accepted 12 June 2019

doi:10.1111/jam.14358

Abstract

Aims: The objective of this study was to compare qualitatively and quantitatively the results of identification of the bacteria present in milk samples from cows with subclinical mastitis using multiplex qPCR assay and matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS[®]) after bacteriological growth.

Methods and Results: A total of 182 samples were aseptically collected from 119 cows with high somatic cell counts ($>2 \cdot 10^5$ SCC per ml) on 11 farms in Belgium in 2014. The multiplex qPCR assay was carried out on 350 μ l of milk with the PathoProof[®] Complete-16kit. Ten microlitre of milk was streaked on Columbia blood agar and three selective agar plates. Growing colonies were identified by MALDI-TOF MS. Of the 182 samples, 90 gave positive results with either or both tests for one or two bacterial species/genera. Total qualitative agreement of the bacteria identified was observed in 41 mono- or bi-bacterial samples (46%) and partial agreement in 19 bi-bacterial samples at both or either tests (21%). The results of both tests on those mono- and bi-bacterial samples were not significantly different (McNemar test; $P = 0.395$) with a fair agreement (Cohen's kappa test; $k = 0.375$; $P = 0.055$). Moreover, quantitative correlation between the qPCR intensity and the numbers of growing colonies was observed in half of the 60 samples with qualitative matching results.

Conclusions: Both methods give identical qualitative and quantitative results with approximately a half and a quarter of the mono- and bi-bacterial samples respectively. Several reasons can explain the differences. The multiplex qPCR assay only targets the most important mammary gland pathogens and can detect DNA of bacteria both alive and dead. Conversely, bacteria only grow when alive and the MALDI-TOF MS databases do not include all bovine milk-associated bacterial species yet.

Significance and Impact of the Study: This study further highlights the limitations and complementarity of the genetic and phenotypic tests for the identification of bacteria present in milk samples.

Introduction

In dairy cattle, different bacterial species are responsible for mastitis, whose origin is classically described as contagious or environmental according to the mode of transmission. Contagious mastitis is caused by bacterial species living on the udder skin and/or in the infected udder, such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Mycoplasma bovis*. On the other hand, the majority of environmental mastitis is caused by bacterial species present in the intestinal and faecal microbiota, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* (El-Sayed *et al.*, 2017). The former bacterial species are more frequently associated with chronic inflammation and subclinical mastitis with high somatic cell counts (SCC) and drop in milk production whereas the latter most often cause acute inflammation and clinical mastitis, coupled with macroscopic alteration of the milk (Gussmann *et al.*, 2019). Nevertheless several other bacterial species of environmental origin can also be associated with subclinical mastitis, such as different non-*aureus* staphylococci, non-classical streptococci/enterococci or corynebacteria (Reyher *et al.*, 2012; El-Sayed *et al.*, 2017). The consequence of mastitis is high financial costs due to decreased milk production, penalty for high SCC ($>4 \cdot 10^5$ cells per ml), application of different antibiotic treatments and the culling of incurable cases (Yalcin *et al.*, 1999; Halasa *et al.*, 2007; Reyher *et al.*, 2012; Ashraf and Imran, 2018).

The aetiological diagnosis of mastitis is therefore crucial to apply appropriate therapeutic and prophylactic control measures, which are different whether the mastitis is of contagious or environmental origin (Ashraf and Imran, 2018). For many years, most routine laboratories have been using classical bacteriology with biochemical tests (for instance, API[®] sugar tests) to identify mastitis-associated bacterial species. Nevertheless the database of these biochemical tests was initially developed for human medicine and can therefore lead to species and even genus misidentification when used in veterinary medicine in general and for mastitis diagnosis in cattle in particular (Pinsky *et al.*, 2009; Schabauer *et al.*, 2014). Therefore, nowadays, veterinary diagnostic laboratories favour mass spectrometry (for instance, matrix-assisted laser desorption-ionization–time of flight mass spectrometry or MALDI-TOF MS[®]) for the identification of bacterial species. The MALDI-TOF MS databases for the different bacterial genera and families in veterinary medicine are indeed progressively validated like recently the database of staphylococcal species associated with bovine mastitis (Cameron *et al.*, 2017, 2018; Mahmmod *et al.*, 2018; Nonnemann *et al.* 2019). However, a delay of 24–72 h, that is not often compatible with the dairy industry, is

still necessary to obtain results. Moreover, other bacterial species than the mammary gland pathogens, present in the milk samples as a result of external contamination at the time of sampling, can also be detected.

Today, several dairy routine diagnostic laboratories resort to genetic assays, mainly multiplex quantitative (q) PCR assays, that can be applied directly to milk samples skipping the step of growing the bacteria present in the samples. Though qPCR assay kits detect a limited number of bacterial species, these are the most frequent and pathogenic ones (Koskinen *et al.*, 2010; Cederlöf *et al.*, 2012; El-Sayed *et al.*, 2017).

The aim of this study was therefore to compare qualitatively and quantitatively the qPCR assay using the PathoProof[®] Complete-16 kit and the MALDI-TOF MS assay after bacterial growth on four agar media to identify the bacterial species present in milk samples from cows with high SCC in 11 herds in Belgium.

Materials and methods

Milk sampling

A total of 182 milk samples were aseptically (washing of the udder, disinfection of the teat and discarding of the first milk) collected in duplicate in sterile vials from 119 cows with more than $2 \cdot 10^5$ SCC per ml and suspicion of subclinical mastitis (one sample corresponds to one quarter), on 11 farms in Wallonia, Belgium, between January and March 2014. These 11 farms were included in a study on the epidemiology of contagious mastitis in Wallonia (MammiScan project, Service Public Wallonie, Division Générale de l'Agriculture RNE) between 2011 and 2015. Within the MammiScan project, 300 farms were randomly chosen out of the c. 4000 dairy farms in all five provinces of Wallonia (A.S. Rao and L. Théron, unpublished data). The cows were not receiving any antibiotics at the time of sampling. To minimize bacterial growth, the samples were transported in coolers the same day either to the 'Comité du Lait' or to the Veterinary Faculty, where they were kept in fridges at 4°C and analysed on the following day at the latest.

Multiplex qPCR assay

The DNA extraction and the multiplex qPCR assay with the commercial PathoProof Complete-16kit (Thermo Scientific) were carried out by the 'Comité du Lait' (Battice, Belgium) on 350 µl of each milk sample, according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, 2015). The PathoProof Complete-16 kit PCR assay detects the presence of DNA of the following mammo-pathogens: *Staph. aureus*, *Staph. sp.* including all major

non-*aureus* species, *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. uberis*, *E. coli*, *Corynebacterium bovis*, *Enterococcus* sp., *Klebsiella oxytoca* and *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Trueperella* (previously *Arcanobacterium*) *pyogenes* (*T. pyogenes*) and *Peptococcus indolicus*, *M. bovis*, *Mycoplasma* sp., yeasts and *Prototheca* sp. The 16th PCR detects the staphylococcal β -lactamase-encoding gene (*blaZ*). The results were reported following the protocol described by the supplier (Suisselab AG Aollikofen, 2006; Thermo Scientific, 2015): negative results (–) with cycle threshold (Ct) cut-off values higher than 37; weakly positive results (+) with Ct values between 37 and 30; moderately positive results (++) with Ct values between 30 and 20; highly positive results (+++) with Ct value lower than 20.

Bacteriological culture

Ten microlitre of each second milk sample was inoculated onto Columbia agar supplemented with 5% sheep blood (nonselective medium; BioMérieux, Marcy-l’Etoile, France), modified Chapman’s agar (selective for staphylococci; VWR, Leuven, Belgium), Edwards’ agar (selective for streptococci and enterococci; Oxoid, Aalst, Belgium) and Mac Conkey’s agar (selective for enterobacteria; Merck, Overijse, Belgium) using the EDDY JET device® (LED Techno, Heusden-Zolder, Belgium). After overnight aerobic incubation at 37°C, the different colony types were counted with a cut-off value of 100 colony forming units (CFU) per ml and distributed into three classes: 10^2 – 10^4 CFU per ml, 10^4 – 10^6 CFU per ml, $>10^6$ CFU per ml. Each colony type was subsequently subcultured overnight in brain heart infusion broth and stored at –80°C in 50% glycerol until further use. Isolation of mycoplasmas and *Prototheca* was not attempted.

Species identification with MALDI-TOF assay

After thawing, isolates were grown on the same appropriate agar media to confirm the purity of the cultures. Identification of the species level was performed with an Autoflex Biotyper Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS, Bruker, Germany) using the direct transfer method and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix, according to the manufacturer’s guidelines. In case of no peak detection, the sample was rerun with the extended direct transfer method, using either on-target formic acid treatment or full ethanol-formic acid extraction, according to the manufacturer’s guidelines. The spectra were analysed with the MALDI Bio Typer Compass software ver. 4.1. (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), which includes a combination of ‘mean spectra projections’ (MSP) and ‘research use only’ (RUO) reference databases of 8252

bacterial and fungal species, expanded with 13 MSP covering 8 species of coagulase negative staphylococci as previously described (Cameron *et al.*, 2017). Only the identifications with a score value between 2.00 and 3.00 (green colour) were taken into account.

Statistical analysis

The data were statistically analysed using the software SPSS 25.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL). The difference and the agreement levels between qPCR and MALDI-TOF MS results were assessed by the McNemar and Cohen’s kappa tests, respectively, with the significance threshold of $P = 0.05$ (McNemar, 1947; Cohen, 1960; Statistiques biomédicales, 2017).

Results

qPCR PathoProof DNA detection

Of the 182 milk samples, 133 (73%) tested positive (Ct values ≤ 37) with one of the qPCR reactions for a microbial species or genus, and 32 (18%) with two, three or four qPCR reactions while 17 (9%) samples tested negative (Table 1). Of the 165 qPCR-positive samples, 45 were positive for *Staph. aureus* (27%), 64 for non-*aureus* staphylococci (39%), 43 for streptococci (26%), five for enterococci (3%), 13 for enterobacteria (8%), 12 for corynebacteria (7%), one for *T. pyogenes* (0.6%), 15 for mycoplasmas (9%), one for *Prototheca* (0.6%) and two for yeasts (1%). The *blaZ* gene was detected in 28 samples testing positive for *Staph. aureus* only, in 22 samples testing positive for non-*aureus* staphylococci only, and in six samples testing positive for both *Staph. aureus* and non-*aureus* staphylococci (Table 1).

Classical bacterial growth and MALDI-TOF MS species identification

At the detection limit of 100 CFU per ml, bacterial growth on Columbia blood agar was obtained with 144 (79%) of the 182 milk samples. Nineteen samples grew only on Columbia blood agar, while 98 samples also grew on Chapman’s agar, 69 samples also on Edwards’ agar and 14 samples also on Mac Conkey’s agar. A total of 216 colony types were subcultured and stored at –80°C: one colony type was obtained from 82 (57%) samples, two colony types from 54 (38%) samples, three colony types from six (4%) samples and four colony types from two (1%) samples. Of these 216 isolates, 112 grew on Chapman’s agar (putative staphylococci), 68 grew on Edwards’ agar (putative streptococci/enterococci) and 17

qPCR and MS identification of bacteria in milk

C. Ngassam Tchamba et al.

Table 1 qPCR assay results of the 182 milk samples

Pathoproof® identification	No. (%) milk samples	blaZ gene qPCR
<i>Staphylococcus aureus</i>	32 (18)	24
<i>Staphylococcus</i> sp.	39 (21)	12
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12 (7)	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	5 (3)	
<i>Streptococcus uberis</i>	12 (7)	
<i>Enterococcus</i> sp.	4 (2)	
<i>Escherichia coli</i>	5 (3)	
<i>Klebsiella</i> sp.	3 (1.6)	
<i>Mycoplasma bovis</i>	14 (8)	
<i>Mycoplasma</i> sp.	1 (<1)	
<i>Corynebacterium bovis</i>	4 (2)	
Yeasts	2 (1)	
<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph.</i> sp.	3 (1.6)	2
<i>Staph. aureus</i> , <i>Strep. agalactiae</i>	1 (<1)	
<i>Staph. aureus</i> , <i>Strep. uberis</i>	2 (1)	2
<i>Staph. aureus</i> , <i>Enterococcus</i> sp.	1 (<1)	
<i>Staph. aureus</i> , <i>E. coli</i>	1 (<1)	1
<i>Staph. sp.</i> , <i>Strep. agalactiae</i>	4 (2)	3
<i>Staph. sp.</i> , <i>Strep. uberis</i>	3 (1.6)	1
<i>Staph. sp.</i> , <i>E. coli</i>	2 (1)	2
<i>Staph. sp.</i> , <i>C. bovis</i>	5 (3)	2
<i>C. bovis</i> , <i>Prototheca</i> sp.	1 (<1)	
<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. sp.</i> , <i>Strep. agalactiae</i>	3 (1.6)	3
<i>Staph. aureus</i> , <i>Strep. agalactiae</i> , <i>Strep. uberis</i>	1 (<1)	1
<i>Staph. sp.</i> , <i>Strep. agalactiae</i> , <i>C. bovis</i>	2 (1)	2
<i>Staph. sp.</i> , <i>Strep. uberis</i> , <i>E. coli</i>	1 (<1)	
<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. sp.</i> , <i>Strep. agalactiae</i> , <i>Strep. dysgalactiae</i>	1 (<1)	1
<i>Staph. sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Trueperella pyogenes</i>	1 (<1)	
Negative results	17 (9)	
Total	182 (100)	56

grew on Mac Conkey's agar (putative enterobacteria) (Table 2). The 19 isolates growing only on Columbia blood agar were identified as *Bacillus* sp. (10 isolates) and yeasts (9 isolates) by classical tests (not shown) and were not further studied.

The MALDI-TOF MS gave an identification profile for 108 of the 112 putative staphylococci, 65 of the 68 putative streptococci/enterococci and the 17 putative enterobacteria (Table 2). The 108 putative staphylococci identified belonged to 13 species (Table 2a): *Staph. aureus* (60 isolates, 55.5%), 46 non-*aureus* staphylococci (46 isolates, 42.5%) and *Aerococcus viridans* (2 isolates, 2%), while the 65 putative streptococci/enterococci identified belonged to 11 species (Table 2b) of the *Streptococcus* genus (34 isolates, 52%), the *Enterococcus* genus (20 isolates, 31%) and the *Aerococcus* genus (11 isolates, 17%).

The 17 putative enterobacteria belonged to four species (Table 2c), including *K. pneumoniae* (5 isolates, 29%) and *E. coli* (3 isolates, 18%).

Comparison between the qPCR assay and the MALDI-TOF identification results

Of the 182 milk samples, 133 gave positive results (73%) and six negative results (3%) with both methods while 32 (18%) were positive with the qPCR assay only and 11 (6%) only gave a positive bacterial growth. Of the 133 samples, 43 gave positive results with either or both tests for more than two bacterial species/genera and were considered as contaminated samples. Therefore only the results of the 54 mono-bacterial samples, nine bi-bacterial samples at both tests and 27 bi-bacterial samples at either test (Table 3; Table S1) were statistically compared.

Qualitative matching results were observed with 36 (67%) of the 54 mono-bacterial samples (Fig. 1): 26 samples with staphylococci (including 20 with *Staph. aureus*), six samples with streptococci, two samples with enterococci, and two samples with yeasts. Total qualitative matching results were also observed with five (55%) of the nine bi-bacterial samples in which two bacterial species/genera were identified by both tests (Fig. 2).

Partial qualitative matching identification results (one identical identification result out of two positive results) were observed with 19 samples: 2 (22%) of the nine bi-bacterial samples at both tests and 17 (63%) of the 27 bi-bacterial samples at either test: five samples with two positive qPCR reactions and one growing bacterial species and 12 samples with two growing bacterial species and one positive qPCR reaction.

Statistically, the McNemar test was performed on 51 samples whose bacterial profile shows at least one positive agreement for both tests (same bacteria identified by both tests in the same samples), while the Cohen's kappa test included all 90 samples mono- and bi-bacterial samples. The McNemar test showed that the qPCR and MALDI-TOF test results were not significantly different ($P = 0.395$; >0.05), while the Cohen's kappa test showed a fair agreement between both methods ($k = 0.375$; $P = 0.055$).

Moreover quantitative matching was observed for half (31) of those 60 qualitatively matching qPCR reaction and bacterial growth results on the basis of the categories previously defined: +, ++, +++ for the qPCR reactions and 10^2 – 10^4 , 10^4 – 10^6 , $>10^6$ CFU per ml for the bacterial growth (Table 4; Table S2). For the other half, either higher intensity of the qPCR reactions compared to the bacterial growth or higher numbers of CFU per ml than the qPCR reaction intensity were obtained.

Table 2 MALDI-TOF MS[®] identification results of the colonies growing on Chapman's agar (a), Edwards' agar (b) and Mac Conkey's agar (c) from 144 milk samples

(a) Chapman		(b) Edwards		(c) Mac Conkey	
MALDI-TOF MS identification	No. (%) isolates	MALDI-TOF MS identification	No. (%) isolates	MALDI-TOF MS identification	No. (%) isolates
<i>Aerococcus viridans</i>	2 (2)	<i>Aerococcus viridans</i>	11 (16)	<i>Escherichia coli</i>	3 (18)
<i>Staphylococcus aureus</i>	60 (54)	<i>Enterococcus faecalis</i>	9 (13)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5 (29)
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	9 (8)	<i>Enterococcus faecium</i>	6 (9)	<i>Pantoea agglomerans</i>	8 (47)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	3 (3)	<i>Enterococcus hirae</i>	5 (7)	<i>Serratia marcescens</i>	1 (6)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3 (3)	<i>Streptococcus. agalactiae</i>	13 (19)		
<i>Staphylococcus equorum</i>	2 (2)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	7 (10)		
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9 (8)	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	1 (1.5)		
<i>Staphylococcus hominis</i>	1 (<1)	<i>Streptococcus pluranimalium</i>	1 (1.5)		
<i>Staphylococcus lentus</i>	3 (3)	<i>Streptococcus salivarius</i>	1 (1.5)		
<i>Staphylococcus sciuri</i>	10 (9)	<i>Streptococcus uberis</i>	10 (15)		
<i>Staphylococcus simulans</i>	1 (<1)	<i>Streptococcus vestibularis</i>	1 (1.5)		
<i>Staphylococcus warneri</i>	2 (2)	Not identified	3 (4)		
<i>Staphylococcus xylosum</i>	3 (3)				
Not identified	4 (4)				
Total	112 (100)	Total	68 (100)	Total	17 (100)

Discussion

Of the 182 milk samples, 133 (73%) gave positive and six (3%) negative results with both methods, and 90 of them (49%) were positive for one or two bacterial species/genera with either or both tests. These 90 samples were considered as noncontaminated and further analysed for result agreement. Total or partial qualitative agreement of the species/genus identified was obtained with 60 (67%) of the 90 mono- or bi-bacterial samples. Moreover, quantitative correlation was observed between the qPCR intensity and the bacterial growth rate in ca. half (31) of these 60 samples. Statistical analysis with McNemar and Cohen's kappa tests confirm the absence of any significant difference with a fair agreement between the qPCR and the MALDI-TOF results, similarly to other recently published studies, although these were based on milk samples instead of isolates (Barreiro *et al.*, 2018; Wilson *et al.*, 2019). The reasons for the differences in the qualitative and quantitative results can be several, some dealing with the sampling method, others with the multiplex qPCR assays and still others with the bacterial growth or the MALDI-TOF MS identification.

Although the milk samples were aseptically collected, contamination by bacteria of the teat/udder skin, of the faeces or of the air cannot be totally avoided, as exemplified by the presence of more than two colony types in eight samples and of *Bacillus* sp. in 10 samples. A general rule also is to consider more than two colony types in any sample as a proof of contamination (Hogan *et al.*, 1989; Koskinen *et al.*, 2010) though this assertion may be

pondered by the identity of the isolates. Most probably, some non-*aureus* staphylococci, enterococci and enterobacteria, but maybe also some *Staph. aureus* and *Strep. agalactiae* as recently demonstrated (Nyman *et al.*, 2016; Svennesen *et al.*, 2018) especially from polybacterial samples, can therefore be regarded as contaminants. Conversely 38 samples gave no bacterial growth and only one colony type grew from 82 samples, confirming that the sampling method was correctly performed for the majority of the samples.

The question of the presence of bacterial contaminants as mentioned before set aside, different reasons may explain why some samples with negative qPCR results had positive bacterial growth, more particularly:

- i the identification range of the PathoProof Complete-16 kit is limited to 15 genus/species, while classical bacteriology is limited only by the growth media and conditions;
- ii a technical problem may arise in the qPCR procedure, due to the inadequate homogenization, or incomplete mixing of the sample leading to negative results (Hiitiö *et al.*, 2015), while the bacteria may still grow on agar media;
- iii the sampling method, with presampling procedure or insertion of a cannula or directly sampling the udder cistern with a needle for instance, can influence the results by decreasing the number of bacterial species detected, especially by qPCR (Mahmmod *et al.*, 2013a; Hiitiö *et al.*, 2016; Friman *et al.*, 2017) compared to classical routine procedures. Nevertheless,

qPCR and MS identification of bacteria in milk

C. Ngassam Tchamba *et al.***Table 3** Comparison of the identification results of the 90 mono- and bi-bacterial samples by both the qPCR assay and the culture on agar media

Pathoproof® identification ^a	MALDI-TOF MS® identification results of the growing colonies			
	Total matching	Partial matching	No matching	No. Milk samples
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. aureus</i> , OS	OS	20
			NI	3
				3
				1
<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Staph. sp.</i>	<i>Staph. sp.</i> , OS <i>Staph. sp.</i> , NI	OS	6
			NI	1
				1
				6
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	<i>Strep. agalactiae</i> , OS <i>Strep. agalactiae</i> , NI	OS	4
			NI	2
				2
				1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Strep. dysgalactiae</i>	<i>Strep. dysgalactiae</i> , OS <i>Strep. uberis</i> , OS	OS	2
			NI	2
<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Strep. uberis</i>	<i>Strep. uberis</i> , OS	OS	9
			NI	2
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>		OS, NI	1
<i>Escherichia coli</i>			OS	2
<i>Klebsiella sp.</i>			OS	2
Yeasts	Yeasts			2
<i>Staph. aureus</i> , <i>Strep. agalactiae</i>	<i>Staph. aureus</i> , <i>Strep. agalactiae</i>			1
<i>Staph. aureus</i> , <i>Strep. uberis</i>	<i>Staph. aureus</i> , <i>Strep. uberis</i>			2
<i>Staph. aureus</i> , <i>Enterococcus sp.</i>	<i>Staph. aureus</i> , <i>Enterococcus sp.</i>			1
<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. sp.</i>		<i>Staph. aureus</i>		3
<i>Staph. sp.</i> , <i>Strep. agalactiae</i>	<i>Staph. sp.</i> , <i>Strep. agalactiae</i>			1
		<i>Strep. agalactiae</i>		1
			OS	2
<i>Staph. sp.</i> , <i>Strep. uberis</i>		<i>Staph. sp.</i> , NI		1
			OS	1
<i>Staph. sp.</i> , <i>Escherichia coli</i>		<i>Staph. sp.</i> , <i>Enterococcus sp.</i>		1
<i>Staph. sp.</i> , <i>Corynebacterium bovis</i>		<i>Staph. sp.</i>		1
			OS	1
Total milk samples				90

*NI, not identified; OS, other species (details in Table S1). Not tested by MALDI-TOF MS.

this is not the case in this study, since the sampling procedure was identical for both qPCR and classical bacteriological culture.

Conversely, and disregarding the samples with positive qPCR assays for mycoplasmas and *Prototheca sp.* that were not looked for using microbiological culture, the most probable reasons to explain the negative bacteriological results of qPCR-positive samples are:

- i the possible need for definition of different Ct values according to the bacterial species/genus. For instance, the Ct values have been assessed and re-evaluated in different studies for diagnosis of *Staph. aureus* and

Strep. agalactiae mastitis with proposal of minor modifications, especially for diagnosis of subclinical infections (Cederlöf *et al.*, 2012; Mahmmoud *et al.*, 2013b, 2017). This was not considered in this study since the protocol recommended by the company was followed, but more studies are clearly needed;

- ii the classical bacteriology can only characterize alive bacteria while the qPCR assays can detect the DNA of bacteria whether dead or alive (Taponen *et al.*, 2009);
- iii when low bacterial loads are present in the milk samples, the number of colonies can be below the cut-off values (100 CFU per ml in this study) and the samples classified as negative, while the qPCR

C. Ngassam Tchamba *et al.*

qPCR and MS identification of bacteria in milk

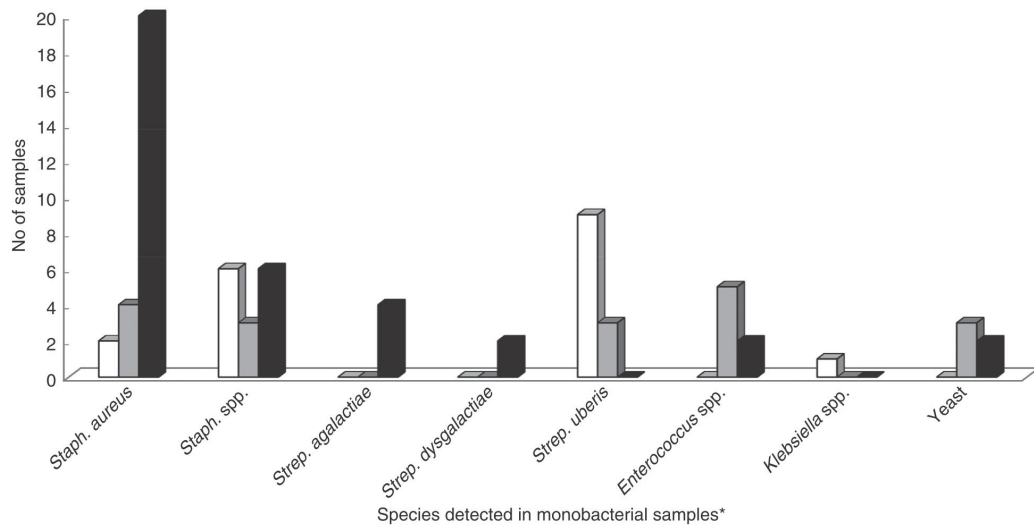


Figure 1 Identification results in 54 mono-bacterial samples using qPCR and the culture on agar media. (□) PP only = positive results with qPCR (Pathoproof®) only; (▒) MDT only = positive results with MALDI-TOF MS® after bacteriological culture only; (■) PP/MDT = positive results with qPCR (Pathoproof) and with MALDI-TOF MS after bacteriological culture. *The total number of samples is higher than 54 because samples with nonmatching results are counted twice.

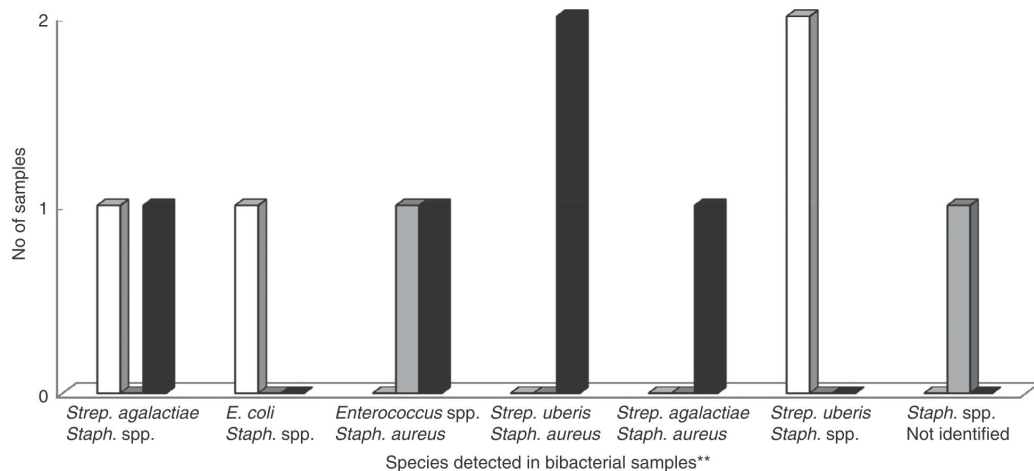


Figure 2 Identification results of nine bi-bacterial samples using qPCR and the culture on agar media (□) PP only = positive results with qPCR (Pathoproof®) only; (▒) MDT only = positive results with MALDI-TOF MS® after bacteriological culture only; (■) PP/MDT = positive results with qPCR (Pathoproof) and with MALDI-TOF MS after bacteriological culture. **The total number of samples is higher than nine because samples with nonmatching results are counted more than once.

assays would probably classify the same sample as positive (Hiittiö *et al.*, 2015);

iv the possible presence of antibiotic residues in the milk interfering with the bacterial growth, but not

affecting the qPCR assays (Zadoks *et al.*, 2014). However, this should not be the case in this study since the cows were not receiving any treatment at the time of sampling.

Table 4 Quantitative comparison of the matching positive qPCR assay and culture on agar media results for the 60 milk samples with total or partial qualitative matching identification results

Pathoproof® identification and detection intensity		Bacterial growth (CFU per ml ^a) and MALDI-TOF MS® identification			No. milk samples
+	++	10 ² –10 ⁴	10 ⁴ –10 ⁶	>10 ⁶	
<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staph. aureus</i>			1
			<i>Staph. aureus</i>		12
	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. aureus</i>			1
			<i>Staph. aureus</i>		6
				<i>Staph. aureus</i>	4
<i>Staph. sp.</i>		<i>Staph. sp.</i>			5
	<i>Staph. sp.</i>		<i>Staph. sp.</i>		3
	<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>Strep. agalactiae</i>		6
	<i>Strep. dysgalactiae</i>		<i>Strep. dysgalactiae</i>		3
				<i>Strep. agalactiae</i>	1
				<i>Strep. dysgalactiae</i>	1
<i>Streptococcus uberis</i>			<i>Strep. uberis</i>		1
	<i>Strep. uberis</i>			<i>Strep. uberis</i>	1
<i>Enterococcus sp.</i>			<i>Enterococcus sp.</i>		2
Yeast		Yeast			1
	Yeast	Yeast			1
<i>Staph. sp.</i>	<i>Strep. agalactiae</i>		<i>Strep. agalactiae</i>		1
			<i>Staph. sp., Strep. agalactiae</i>		1
<i>Staph. sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staph. sp.</i>			1
<i>Staph. aureus</i>			<i>Staph. aureus, Enterococcus sp.</i>		1
<i>Enterococcus sp.</i>		<i>Staph. aureus</i>			1
<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. sp.</i>		<i>Staph. aureus</i>		1
<i>Staph. aureus</i>	<i>Strep. uberis</i>		<i>Staph. aureus, Strep. uberis</i>		1
	<i>Staph. aureus, Strep. uberis</i>		<i>Staph. aureus</i>	<i>Strep. uberis</i>	1
<i>Staph. sp., Corynebacterium bovis</i>			<i>Staph. sp.</i>		1
<i>Staph. aureus</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	<i>Staph. aureus</i>		1
<i>Staph. sp.</i>	<i>Strep. uberis</i>		<i>Staph. sp.</i>		1
Total milk samples					60

+: weakly positive results with Ct values between 37 and 30; ++: moderately positive results with Ct values between 30 and 20; none of the 60 samples gave highly positive results (+++) with Ct values lower than 20.

^a100 CFU per ml was the detection limit.

It must also not be forgotten that the MALDI-TOF MS databases for the different bacterial species and genera in veterinary medicine are progressively validated and do not include all bovine mammary gland associated bacterial species yet (Cameron *et al.*, 2018). This may account for the absence of identification of seven isolates by MALDI-TOF MS.

As a conclusion to this comparison study, bacterial culture gives positive results if suitable growth media are used and when the bacteria are alive and present in sufficient amounts. Nevertheless, there is some delay before they can be identified and the antibiotic sensitivity test performed (up to 72 h) and nonpathogenic bacterial contaminants can also grow. Conversely, the multiplex qPCR is a rapid, sensitive and specific test, but targets only the most important mammary gland pathogens, can detect DNA of bacteria both alive and dead, and does not provide the antibiotic sensitivity profile of the

pathogens, besides the detection of the *blaZ* gene of staphylococci. In that respect, if 56 staphylococcus-positive samples are also positive for the *blaZ* gene, four staphylococcus isolates also test positive by classical PCR for the *mecA* gene (not shown) coding for methicillin resistance. Therefore, adding a qPCR for the detection of the *mecA* gene would be of value because of their zoonotic potential and risk for public health (Lakhundi and Zhang, 2018). Independently of chosen methodology, human supervision of the crude results is essential to interpret their clinical meaning correctly and avoid misdiagnosis as often as possible (Zadoks *et al.*, 2014), because neither test is perfect to diagnose mammary gland infection (Cederlöf *et al.*, 2012) and because Ct values of qPCR assay should more carefully be chosen according to the health status of the herd/cows and to the associated bacterial species/genus (Mahmmod *et al.*, 2013b).

Acknowledgements

This work was supported, in part, by the MammiScan project (SPW-DGARNE) and by the 'Comité du Lait' for the collection of the milk samples and the Pathoproof assay, that were carried out by Didier Veselko. The MALDI-TOF MS was financed by the Research Foundation Flanders (FWO-Vlaanderen; Hercules project AUGÉ/15/05) and the analyses were carried out by Serge Verbanck (University of Ghent, Faculty of Veterinary Medicine).

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Ashraf, A. and Imran, M. (2018) Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Trop An Hlth Prod* **50**, 1193–1202. <https://doi.org/10.1007/s.11250-018-1629-0>.
- Barreiro, J., Gonçalves, J., Grenfell, R., Leite, R., Juliano, L. and Santos, M. (2018) Direct identification of bovine mastitis pathogens by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in pre-incubated milk. *Braz J Microbiol* **49**, 801–807. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.04.012>.
- Cameron, M., Barkema, H.W., De Buck, J., De Vliegher, S., Chaffer, M., Lewis, J. and Keefe, G.P. (2017) Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol. *J Dairy Sci* **100**, 2137–2147. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12020>.
- Cameron, M., Perry, J., Middleton, J.R., Chaffer, M., Lewis, J. and Keefe, G.P. (2018) Short communication: Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and a custom reference spectra expanded database for the identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci* **101**, 590–595. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13226>.
- Cederlöf, S.E., Toft, N., Aalbaek, B. and Klaas, I.C. (2012) Latent class analysis of the diagnostic characteristics of PCR and conventional bacteriological culture in diagnosing intramammary infections caused by *Staphylococcus aureus* in dairy cows at dry off. *Acta Vet Scand* **54**, 65. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-65>.
- Cohen, J. (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* **20**, 37–46.
- El-Sayed, A., Awad, W., Abdou, N.-E. and Vazquez, H.C. (2017) Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens. *Int J Vet Sci Med* **5**, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.08.002>.
- Friman, M., Hiitiö, H., Niemi, M., Holopainen, J., Pyörälä, S. and Simojoki, H. (2017) The effect of a cannula milk sampling technique on the microbiological diagnosis of bovine mastitis. *Vet J* **226**, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.07.003>.
- Gussmann, M., Steeneveld, W., Kirkeby, C., Hogeveen, H., Farre, M. and Halasa, T. (2019) Economic and epidemiological impact of different intervention strategies for subclinical and clinical mastitis. *Prev Vet Med* **166**, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.03.001>.
- Halasa, T., Huijps, K., Osterås, O. and Hogeveen, H. (2007) Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q* **29**, 18–31. <https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224>.
- Hiitiö, H., Riva, R., Autio, T., Pohjanvirta, T., Holopainen, J., Pyörälä, S. and Pelkonen, S. (2015) Performance of a real-time PCR assay in routine bovine mastitis diagnostics compared with in-depth conventional culture. *J Dairy Res* **82**, 200–208. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000084>.
- Hiitiö, H., Simojoki, H., Kalmus, P., Holopainen, J., Pyörälä, S. and Taponen, S. (2016) The effect of sampling technique on PCR-based bacteriological results of bovine milk samples. *J Dairy Res* **99**, 6532–6541. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10811>.
- Hogan, J., Smith, K., Hoblet, K., Schoenberger, P., Todhunter, D., Hueston, W., Protchard, D., Bowman, G. *et al.* (1989) Field survey of clinical mastitis in low somatic cell counts herds. *J Dairy Sci* **72**, 1547–1556.
- Koskinen, M.T., Wellenberg, G.J., Sampimon, O.C., Holopainen, J., Rothkamp, A., Salmikivi, L., van Haeringen, W.A., Lam, T.J. *et al.* (2010) Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J Dairy Sci* **93**, 5707–5715. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3167>.
- Lakhundi, S. and Zhang, K. (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev* **31**, e00020–18. <https://doi.org/10.128/CMR.00020-18>.
- Mahmmod, Y.S., Klaas, I.C., Nielsen, S.S., Katholm, J. and Toft, N. (2013a) Effect of presampling procedure on real-time PCR used for diagnosis of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* in dairy cows at routine milk recording. *J Dairy Sci* **96**, 2226–2233. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6059>.
- Mahmmod, Y.S., Toft, N., Katholm, J., Gronbaek, I. and Klaas, I.C. (2013b) Estimation of test characteristics of real-time PCR and bacterial culture of subclinical intramammary infections with *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy cattle in 2012 using latent class analysis. *Prev Vet Med* **109**, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.10.018>.
- Mahmmod, Y.S., Klaas, I.C. and Enevoldsen, C. (2017) DNA carryover in milk samples from routine milk recording used for PCR-based diagnosis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci* **100**, 5709–5716. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12330>.

- Mahmmod, Y.S., Nonnemann, B., Svennesen, L., Pedersen, K. and Klaas, I.C. (2018) Typeability of MALDI-TOF assay for identification of non-*aureus* staphylococci associated with bovine intramammary infections and teat apex colonization. *J Dairy Sci* **101**, 9430–9438. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14579>.
- McNemar, Q. (1947) Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. *Psychometrika* **12**, 153–157.
- Nonnemann, B., Lyhs, U., Svennesen, L., Christesen, K.A., Klaas, I.C. and Pedersen, K. (2019) Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Dairy Sci* **102**, 2515–2524. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15424>.
- Nyman, A.-K., Waller, K.P., Emanuelson, U. and Frössling, J. (2016) Sensitivity and specificity of PCR analysis and bacteriological culture of milk samples for identification of intramammary infections in dairy cows using latent class analysis. *Prev Vet Med* **135**, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.11.009>.
- Pinsky, B., Samson, D., Ghafghaichi, L., Baron, E. and Banaei, N. (2009) Comparison of real-time PCR and conventional biochemical methods for identification of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol* **47**, 3472–3477. <https://doi.org/10.1128/JCM.00342-09>.
- Reyher, K.K., Dohoo, I.R., Scholl, D.T. and Keefe, G.P. (2012) Evaluation of minor pathogens intramammary infection, susceptibility parameters, and somatic cell counts on the development of new intramammary infections with major mastitis pathogens. *J Dairy Sci* **95**, 3766–3780. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5148>.
- Schabauer, L., Wenning, M., Huber, I. and Ehling-Schulz, M. (2014) Novel physico-chemical diagnostic tools for high throughput identification of bovine mastitis associated gram-positive, catalase-negative cocci. *BMC Vet Res* **10**, 156. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-156>.
- Statistiques biomédicales. (2017) *Comparaison de méthodes qualitatives (concordance)*. Accessed April 28, 2019. <https://statistiquesbiomedicale.wordpress.com/2017/08/03/qualitatif>.
- SuisseLab AG Zollikofen. (2006) *Identification des mammites à l'aide de Pathoproof Mammites PCR Assay*. Accessed 22 April 2018. <http://www.suisselab.ch/fr/analyses-de-lait/identification-de-mammites/evaluation-des-resultats.html>.
- Svennesen, L., Mahmmod, Y.S., Skjølstrup, N.K., Mathiasen, L.R., Katholm, J., Pedersen, K., Klaas, I.C. and Nielsen, S.S. (2018) Accuracy of qPCR and bacterial culture for the diagnosis of bovine intramammary infections and teat skin colonization with *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* using Bayesian analysis. *Prev Vet Med* **161**, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.013>.
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M.T. and Pyörälä, S. (2009) Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J Dairy Sci* **92**, 2610–2617. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1729>.
- Thermo Scientific (2015) *Protocol Book. Thermo Scientific. PathoProof Complete-16 kit instructions for use*. Accessed 16 February 2018. <https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/MBD/Instructions/D14910-02-PathoProof%20Complete-16%20IFU.pdf>.
- Wilson, D., Middleton, J., Adkins, P. and Goodell, G. (2019) Test agreement among biochemical methods, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, and 16S rRNA sequencing for identification of microorganisms isolated from bovine milk. *J Clin Microbiol* **27**, e01381–18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01381-18>.
- Yalcin, C., Stott, A.W., Logue, D.N. and Gunn, J. (1999) The economic impact of mastitis-control procedures used in Scottish dairy herds with high bulk-tank somatic-cell counts. *Prevent Vet Med* **41**, 135–149.
- Zadoks, R.N., Tassi, R., Martin, E., Holopainen, J., McCallum, S., Gibbons, J. and Ballingall, K.T. (2014) Comparison of bacteriological culture and PCR for detection of bacteria in ovine milk—Sheep are not small cows. *J Dairy Sci* **97**, 6326–6333. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8351>.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Detailed comparison of the identification results of the 182 milk samples with the qPCR assay and the culture on agar media.

Table S2. Detailed quantitative comparison of the 82 qualitatively matching qPCR reactions and bacterial growth from the 77 milk samples with total or partial qualitative matching identification results.

1.4. Collection « ANIHWA »

1.4.1. Matériels et méthodes

Dans le cadre du projet « MRSA bacteriophages » ERA-Net ANIHWA, 272 souches de staphylocoques ont été isolées en Norvège (n=100) et en Belgique (n=172) entre mai et décembre 2016 à partir des échantillons de lait provenant des vaches atteintes de mammites cliniques et sub-cliniques. Ces souches ont été cultivées et identifiées au genre *Staphylococcus* comme décrit pour les anciennes collections. Elles ont également été conservées en bouillon glycérolé à -80°C (M. Fergestad, A. De Visscher T. L’Abee-Lund, C. Ngassam-Tchamba, S. De Vlieghe, D. Thiry, J. G. Mainil, and Y. Wasteson. Manuscrit en préparation).

1.4.2. Résultats

Sur un total de 272 souches isolées et caractérisées, 43 souches ont été pré-identifiées comme *S. aureus* (coagulase positives et agglutination positives) et 229 souches comme staphylocoques non-*aureus* (coagulase négatives et agglutination négatives).

1.5. Résumé des collections

A ce stade, 982 souches suspectes de *S. aureus* et 752 souches suspectes de staphylocoques non-*aureus* ont été récoltées. Ces différentes collections ont été, ensuite, soumises à la recherche de souches résistantes à la méticilline selon différentes approches (Etude 2).

———— Section expérimentale

ETUDE 2 : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION
PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE DE LA RESISTANCE A LA
METICILLINE DES MRSA ET MRNAS

2.1. Préambule

Les collections de staphylocoques obtenues à l'issue de la première partie de ce travail ont été soumises à un screening afin d'identifier les souches résistantes à la méticilline (MRS) et au typage de cette résistance. Un intérêt particulier a été porté sur les souches responsables de mammites bovines. Les objectifs étaient de (i) confirmer phénotypiquement et génétiquement les MRS dans ces collections (ii) identifier les différentes espèces de MRS (MRSA et MRNAS) ; et (iii) caractériser les cassettes chromosomiques staphylococciques (*SCCmec*) présentes dans ces différentes espèces de staphylocoques.

Cette deuxième section des résultats est divisée en deux parties. La première partie concerne toutes les collections qui ont été étudiées selon un schéma commun (Article 2 : voir 2.2), à l'exception de la collection ANIHWA. La deuxième partie concerne la collection ANIHWA, qui a quant à elle, été étudiée selon un schéma différent dans le cadre du projet européen « MRSA_Bacteriophage » ERA-Net ANIHWA (Article 3 : voir 2.3).

2.2. MRSA et MRNAS de différentes origines

L'identification et la caractérisation phénotypique et génétique des MRSA et MRNAS des collections de diverses origines est présentée dans l'article en cours de préparation intitulé : « Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS) from bovine subclinical mastitis can harbour still undescribed “Staphylococcal chromosome cassette” *mec*: comparison with Methicillin-resistant staphylococci from other animal species and humans ». Dans cet article, un total de 78 souches avec présomption de résistance à la méticilline a été obtenu par screening de la collection de base des souches de diverses origines en se basant sur les résultats de croissance sur un milieu sélectif spécifique, Chrom MRSA id (BioMérieux, France). Ces souches ont, ensuite, été étudiées phénotypiquement (test de sensibilité à la céfoxitine) et génétiquement (PCR *mecA* et SCC*mec*) pour confirmer la résistance et leur identité a également été confirmée par MALDI_TOF.

Les résultats montrent que, des 78 souches obtenues par « screening », 68 sont à la fois résistantes à la céfoxitine et positives à la PCR *mecA* dont 42% sont des souches bovines belges. D'une part, la sensibilité des tests, la durée du stockage des souches ainsi que la précision relative de chaque test permettent d'apporter des explications aux différences de résultats observés entre le test Chrom MRSA ID (78 souches) et le test de sensibilité à la céfoxitine (70 souches). D'autre part, l'existence d'autres mécanismes de résistance tels que la production de bêta-lactamase pourraient justifier les résultats des 2 souches résistantes à la céfoxitine, mais négatives à la PCR *mecA*.

Par ailleurs, 67 cassettes connues ont été identifiées par PCR parmi ces 68 souches avec suspicion d'une nouvelle cassette pour la souche non-typée. Cette nouvelle cassette n'a pas pu être officiellement reconnue par le groupe IWG-SCC (International Working group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements), compte tenu qu'elle n'appartient pas à l'espèce *S. aureus*, mais à une espèce coagulase-négative (*S. haemolyticus*). En effet, les staphylocoques non-*aureus* ne sont pas pris en compte dans les critères de définition de nouvelles cassettes SCC*mec*.

Article 2: Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS) from bovine subclinical mastitis can harbour still undescribed “Staphylococcal chromosome cassette” *mec*: comparison with Methicillin-resistant staphylococci from other animal species and humans

Cyrille Ngassam-Tchamba^a, *Jean-Noël Duprez*^a, *Pierrick Lucas*^b, *Yannick Blanchard*^b, *Filip Boyen*^c, *Freddy Haesebrouck*^c, *Maria Argudin*^d *Jacques Mainil*^a, *Damien Thiry*^{a*}

^a Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Institute for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liège, quartier vallée 2, avenue Cureghem 6, B-4000 Liège, Belgium; Damien.Thiry@uliege.be

^b Viral Genetics and Bio-security Unit, ANSES, Ploufragan-Plouzané laboratory, rue des fusillés, 22 440 Ploufragan, France; yannick.blanchard@anses.fr

^c Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820, Merelbeke, Belgium; Freddy.Haesebrouck@ugent.be

^d NRC *S. aureus*, Microbiology, Erasmus Hospital, Free University of Brussels, Route de Lennik 808, 1070 Bruxelles Belgium; maria.argudin@erasme.ulb.ac.be

*Corresponding author: Damien.Thiry@uliege.be

Article en préparation

Abstract

The methicillin resistant staphylococci (MRS) are responsible for several infections in human and animal species via their zoonotic transfer. In livestock, the inter-species transferability of the SCCmec can lead to subclinical mastitis caused by methicillin resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS). This study aimed to identify and characterize methicillin resistant coagulase-positive staphylococci (MRCPS) and MRCNS SCCmec types from different hosts by phenotypic and genetic assay in order to compare CNS and CPS SCCmec, with a focus on bovine mastitis. Of 78 presumptive MRS(A), methicillin resistance were confirmed for 70 strains by cefoxitin susceptibility test and for 68 strains by PCR, but only 67 strains were Staphylococcal Chromosome Cassette (SCCmec) typed (II, III, IV, V and VII) and one bovine CNS strain (*S. haemolyticus*) showed irregular SCCmec profile. This study also confirms the high prevalence of the SCCmec types IV and II respectively in Belgian and in Japanese strains. The definition of a new SCCmec type was not possible for the *S. haemolyticus* strain showing irregular SCCmec profile, since the non-*aureus* species are not qualified for the definition of new SCCmec types according to the IWG-SCC.

1. Introduction

Staphylococci are among the most prevalent bacterial pathogens worldwide that are responsible for several human and animal diseases. Antimicrobial treatment has led to the selection of staphylococci with different resistance profiles, including “Methicillin Resistant Staphylococci” (MRS) that are resistant to all β -lactams. The history of the MRS began in 1961 following the development and marketing in 1959 of the methicillin antibiotic, resistant to the activity of the β -lactamase (BlaZ) enzymes from *S. aureus* (Jessen et al. 1969). In 1961, the first “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” (MRSA) isolates emerged via the *mecA* gene acquisition and the production of a β -lactam-resistant penicillin-binding protein (PBP2a) (Rolinson et al., 1961; Itou et al., 2000).

Besides the *mecA* gene, three other genes (*mecC*, *mecB* and *mecD*) are also identified nowadays as responsible for methicillin resistance in the *Staphylococcaceae* family (Baba et al., 2009; García-Álvarez et al., 2011; Becker et al., 2018). The *mecB* gene was described in *S. aureus* (located on a plasmid) and in *Micrococcus caseolyticus* (located on a chromosome or a plasmid) while the *mecD* genes was reported in *Micrococcus caseolyticus* (Schwendener et al., 2017; Becker et al., 2018). The *mecA* or *mecC* genes, reported for the first time in *S. aureus*, are carried by a mobile genetic element “Staphylococcal Chromosome Cassette” (SCCmec) which is responsible for the inter-*Staphylococcus* species transfer and thus, acquisition of the methicillin resistance by the non-*aureus* staphylococci (NAS) known as MRNAS (Tsubakishita et al., 2010b; Yamada et al., 2017).

In the animal species, the MRSA are responsible of several infections of companion animals, some wild animals and livestock, known as livestock associated MRSA (LA-MRSA) (Spiliopoulou and Petinaki, 2015). In the case of bovine mastitis, apart from *S. aureus* (LA-MRSA) which is the main etiological agent, there is a growing implication of many coagulase-negative staphylococci (MRCNS) causing subclinical mastitis (Reyher et al., 2012; El-Sayed et al., 2017; Ngassam Tchamba et al., 2019). Nowadays, more attention also should be paid on the MRCNS, given their potential hazard in public health and particularly in veterinary medicine with bovine mastitis cases.

The identification and typing of the Methicillin resistant coagulase positive staphylococci (MRCPS) and the MRCNS can be performed phenotypically by highlighting the expression of the *mecA* or *mecC* resistance genes and genetically by the detection of these two genes and their “SCCmec” type. The methods used focus mainly on cefoxitin susceptibility test, *mec* gene PCR and SCCmec multiplex PCR.

The aim of this study was firstly to identify MRCPS and MRCNS within collections from different hosts in European, African, Asian and North American countries using phenotypic and

genetic assays and then to characterize their SCC mec by multiplex PCR and genomic analysis in order to compare CNS and CPS SCC mec , particularly from bovine mastitis.

2. Materials and methods

2.1. Isolate collections and MRS phenotypic identification

A total of 1462 pre-identified staphylococci isolates from human (n=51), bovine milk (n=1150), dog (n=185), cat (n=50), wild boar (n=6), horse (n=1), deer (n=1), hare (n=1), roe (n=3) and fomites from an equine clinic (n=4) were collected between 2005 and 2014. Out of these 1462 staphylococci, 723 were originated from Belgium (Ote et al., 2011; Bardiau et al., 2013a; Ngassam Tchamba et al., 2019), 45 from Italy, 25 from Switzerland, 90 from Canada (Bardiau et al., 2016), 233 from Japan (Bardiau et al., 2013b), 256 from Niger (Issa et al., 2013) and 90 from Senegal (Kadja et al. 2010).

All the 1462 isolates were screened for the methicillin resistance with the Chrom MRSA ID[®] agar (BioMérieux, France). In order to confirm the phenotypic pattern of the methicillin resistance, disc diffusion assays were performed on the presumptive MRS(A) isolates with the cefoxitin discs (Neo-sensitabs, Rosco Diagnostica, Denmark) (30µg/ml). The minimum inhibitory concentrations (MIC) were assessed by the MIC test strips (Liofilchem Diagnostic, Italy) (0.16-256 µg/ml) on Mueller-Hinton agar (Oxoid, Cambridge, UK) with a 0.5 McFarland bacterial suspension. After overnight incubation at 37°C, inhibition zones were measured by using the SIRCAN micro device (i2a, France) for cefoxitin discs and manually for the MIC test strips and interpreted according to the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 2013 recommendations.

2.2. MRS species identification

The species identification was performed with an Autoflex Biotyper Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS[®], Bruker, Germany) using the direct transfer method and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix, according to the manufacturer's instructions. In case of no peak detection, the samples were retested with the extended direct transfer method, using either on-target formic acid treatment or full ethanol-formic acid extraction. The spectra were analyzed with the MBT (MALDI Bio Typer) Compass software version 4.1. (Bruker Daltonik), which includes a combination of "mean spectra projections" (MSP) and "research use only" (RUO) reference databases of 8252 bacterial and fungal species, expanded with 13 MSP covering 8 species of coagulase negative staphylococci as previously described (Cameron et al., 2017). Only the identifications with a score value between 2.00 and 3.00 (green color) were considered.

2.3. PCR

- *DNA extraction*

The DNA extraction was performed using a protocol adapted from Unal et al., 1992. One staphylococcal colony was suspended into 50µl of lysostaphin (0.1mg/ml) (Sigma-Aldrich, Belgium) and incubated at 37°C for 10 min. Then, a mix of 45µl of sterile water, 5µl of proteinase K (2mg/ml) (Sigma-Aldrich, Belgium) and 150µl of TRIS-HCL (0,1M, pH8) was added to the suspension and incubated at 56°C for 10min then at 95°C for 5min and centrifuged at 14000 rpm for 5 min. Supernatants were recovered and stored at -20°C until further use (Unal et al., 1992).

- *mecA*, *mecB* and *mecC* PCR

The presumptive MRS(A) isolates were genetically confirmed by the amplification of the *nuc*, *16sRNA*, *mecA*, *mecB* and *mecC* genes. Two duplex PCR (*mecA/nuc* and *mecC/16sRNastaph*) and one uniplex PCR (*mecB*) were performed with the multiplex PCR kit® (QIAGEN, Netherland) by using 1.5µl of DNA. For each PCR, the MIX contained 7.5µl of PCR reaction mix 2x and 3µl of Q solution, 0.375µl of each primer (10µM) in a total volume of 13.5µl. The targeted genes, primer sequences and PCR product lengths are reported in the Table 1 (Unal et al., 1992; Maes et al., 2002; Argudín et al., 2016). The PCR amplification conditions were the same for the two duplex: an initial denaturation at 95 °C for 15 min; 35 cycles of 95 °C for 30s (denaturation), 57°C for 90s (annealing), and 72°C for 90s (extension) and a final extension at 72 °C for 10 min. Same conditions for the *mecB* PCR except the annealing temperature which was 59,7°C.

Table 1. Characteristic of the primers for PCR *mecA/nuc*, *mecC/16SRNastaph* and *mecB*

Genes	Primers	Primers sequence 5'-3'	PCR product Length (bp)	References
<i>MecA</i>	mecA1	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533	Maes et al., 2002
	mecA2	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		
<i>Nuc</i>	nuc1	GCGATTGATGGTGATACGGTT	279	Maes et al., 2002
	nuc2	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC		
<i>MecC</i>	mecC454-F	GTCCCTAACAAAACACCCAAAGA	454	This study Argudin et al., 2016
	mecC454-R	GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC		
<i>16sRNA staph</i>	16S RNA1	GTTATTAGGGAAGAACATATGTG	750	Maes et al., 2002
	16S RNA2	CCACCTTCCTCCGTTTTGTCACC		
<i>MecB</i>	mecB-for	TTAACATATACACCCGCTTG	279	Becker et al, 2018
	mecB-rev	TAAAGTTCATTAGGCACCTCC		

- *SCCmec typing*

The SCCmec typing was performed using an adapted protocol from Argudin *et al* 2016 as described in Ngassam *et al* (unpublished data). All PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gel, stained with Midori green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Germany).

2.4. Whole genome sequencing (WGS)

Bacterial DNA for WGS was extracted using a chloroform/isoamylalcohol protocol with lysostaphin as described in Ngassam *et al*, 2020 (unpublished data).

The genomic DNA libraries of the MRS(A) not SCCmec typed by PCR were prepared for Illumina sequencing according to the manufacturer's instructions by using the Nextera XT kit and sequenced by the NovaSeq 6000 Sequencing System (Illumina, San Diego, CA, USA). The raw reads sequences were assembled into contigs with the pipeline shovill 1.0.4 including trimmomatic 0.38 for the cleaning and annotated using Prokka 1.13.3 (Seemann, 2014).

Nanopore MinION long-read sequencing was performed for the not typed strain by using the Rapid Barcoding Sequencing kit (Oxford Nanopore) for library preparation. After guppy_gpu basecalling, assembly was done using Canu 1.8., Illumina reads were cleaned with trimmomatic 0.36 and aligned with canu assembly using BWA 0.7.15-r1140. Pilon 1.23 was run on this alignment for preliminary corrections.

The SCCmec identification was performed using SCCmecFinder 1.2 available from the Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/>) with a %ID threshold of 90% and minimum length of 60% (Kondo *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2009; Kaya *et al.*, 2018).

3. Results

3.1. Screening and identification

A total of 78 presumptive MRS(A) was obtained by screening the 1462 staphylococci isolates on Chrom MRSA ID[®] agar. These presumptive MRS(A) include 61 *S. aureus* (SA) and 8 *non-aureus staphylococci* (NAS) from Belgium; 3 SA from Niger, 1 SA from Canada and 5 SA from Japan. The identification was confirmed by MALDI-TOF into 4 species represented by 70 SA, 1 *S. capitis*, 6 *S. epidermidis* and 1 *S. haemolyticus*.

3.2. mec PCR and cefoxitin susceptibility test

Of the 78 isolates analyzed, 70 were resistant to cefoxitin, 68 were *mecA* positive and no isolate was *mecB* or *mecC* positive. The comparison between both tests showed that the 68 isolates *mecA* positive were also resistant to cefoxitin but 2 isolates resistant to cefoxitin were *mecA* negative (Table 2).

Table 2: Results of PCR *mecA* vs cefoxitin susceptibility test*

Origin	SA/CNS	Cefoxitin R		Cefoxitin S		Total
		<i>mecA</i> +	<i>mecA</i> -	<i>mecA</i> +	<i>mecA</i> -	
Belgium	SA	55	2		4	61
	CNS	8				8
Canada	SA				1	1
	CNS					0
Niger	SA				3	3
	CNS					0
Japan	SA	5				5
	CNS					0
Total		68	2	0	8	78

*SA= *S.aureus*, CNS=Coagulase negative staphylococci, R= resistant, S= sensitive

3.3. SCCmec PCR

The SCCmec types were determined based on the results obtained by the multiplexes PCR (supplementary table 1). The SCCmec PCR applied on the 68 *mecA* positive isolates showed that 59 were typable with 9 belonging to the SCCmec type II, 2 to the type III, 34 representing the type IV, 11 the type V and 3 the type VII (Table 3). The remaining 9 staphylococci were not typable (NT) by PCR including 8 with a profile close to the types II or IV and 1 with a profile close to VII or X.

Table 3: SCCmec typing (PCR results)

SCCmec types									
Origin	Animal species	<i>Staphylococcus</i> Species	Type II	Type III	Type IV	Type V	Type VII	TOTAL <i>mecA</i> +	
Belgium	Cow	<i>aureus</i>	6		11	4	3	24	
		<i>epidermidis</i>				1		1	
	Boar	<i>aureus</i>		1				1	
	Horse	<i>aureus</i>				1		1	
	Human	<i>aureus</i>		1	18	2			21
		<i>capitis</i>				1			1
		<i>epidermidis</i>				2	3		5
	Fomites	<i>aureus</i>			2			2	
	Japan	Dog	<i>aureus</i>	1					1
Cat		<i>aureus</i>	2					2	
Total			9	2	34	11	3	59	

3.4. Sequencing

The draft genomes of the 9 NT strains analyzed are available from Genbank BioProject accession number PRJNA607920. The genomic analysis was based on the SCCmec profiles summarized in supplementary table 2. The genome analysis with SCCmec Finder 1.2 revealed that seven of these isolates were SCCmec type IVa, one of them was SCCmec II and the last one did not match with any SCCmec type although possessing the *mecA* gene. This last strain, C128 (*S. haemolyticus*) presenting a particular profile was identified with 100% of homology for the *mecA* gene, 99.68% homology for the *ISI272* gene but with no *ccr* complex and no other *mec* complex element (*dmecR1/mec I*) (Supplementary tables 2 and 3). The whole results of SCCmec typing are represented in supplementary table 4.

4. Discussion

This study focuses on the SCCmec characterization in MRCPS and MRCNS from different hosts with a particular interest in CNS causing bovine mastitis.

In this study, the SCCmec type II observed in dog and cat were predominant among Japanese isolates (4/5). As demonstrated by Chongtrakool, 2006, the SCCmec type II is the most prevalent in Japan (Chongtrakool et al., 2006). It is also common in clinical samples from HA-MRSA and CA-MRSA and its presence in dog and cat is due to the proximity of these animal species with human and the zoonotic potential of MRS(A) (Buntaran et al., 2013).

According to the literature (Denis et al., 2009; Bardiau et al., 2013a), the SCCmec types IV and V are particularly predominant in Belgium, with Human HA-MRSA (Healthcare associated MRSA) showing high prevalence of type IV and Bovine LA-MRSA (Livestock associated MRSA) essentially represented by type IV and V, although the other types exist at low prevalence. This was confirmed in this study with respectively 58% (n=40) and 16% (n=11) of types IV and V among the Belgian isolates. Moreover, all the MRCNS SCCmec identified in this study belonged to the types IV or V, except one bovine CNS strain C128 (*S. haemolyticus*) which failed to the SCCmec identification. This strain has an interest in livestock since CNS are also responsible for subclinical bovine mastitis cases as described in the literature (Reyher et al., 2012; El-Sayed et al., 2017).

The tests used for the MRS identification and SCCmec characterization in this study although efficient, showed some weaknesses related to different factors. Therefore, of the 1462 isolates initially used in this study, only 78 presumptive MRS(A) were obtained after screening by chrom MRSA ID and 70 MRS(A) were confirmed by disc diffusion assay. As described by Van Griethuysen et al., 2005, the *mecA* gene can be lost in 14.4% of MRS(A) isolates after 2 years of storage at -80°C (Van

Griethuysen et al., 2005). The isolates used in this study were screened by MRSA id in 2014 and then confirmed by cefoxitin susceptibility test in 2016 after storage at -80°C . This could explain the reduced amount of the cefoxitin resistance (70 isolates) compared to the 78 presumptive MRS(A).

The comparison between the cefoxitin susceptibility (70 isolates) and the *mecA* PCR (68 isolates) results showed 97.14% of concordance between both tests. The 2 cefoxitin resistant and PCR *mecA* negative isolates could be explained by different hypothesis. Indeed, the bacteria can use other resistance mechanisms, such as β -lactamase production (Pantosti et al., 2007). Moreover, false positive or false negative results can occur with the use of the disc diffusion assay for the detection of methicillin resistance with cefoxitin (Anand et al., 2009).

Comparatively to the SCC*mec* PCR which targets the *mec* complex and *ccr* complex genes, WGS gives more information on the elements constituting the cassette, allowing to define precisely SCC*mec* types and subtypes and even to design new cassettes chromosome (Feliciano et al., 2018; Lakhundi and Zhang, 2018). In this study, of the 68 MRS(A) strains tested by PCR, 59 showed a perfect match with the different SCC*mec* type profiles of the multiplex PCR. A partial match was observed in the 9 other strains, including 8 showing a profile with a surplus of the *classA mec* or *classB mec* gene and one showing a profile with a surplus of the *type5 ccr* gene or *type7 ccr* gene. As demonstrated in Kaya et al., 2018, the WGS can also present some limits when identifying the SCC*mec* with SCC*mec*Finder database (Kaya et al., 2018). The genomics analysis with SCC*mec*Finder of the 9 MRS(A) not typed by the multiplex PCR showed a perfect match with the SCC*mec* type IV profile for 8 strains, except one strain C128 (*S. haemolyticus*) which showed partial match (no *ccr* gene and no *mecRI* or *mecI* genes). Moreover, the SCC*mec* subtypes IVa were confirmed for the 6 SCC*mec* type IV strains, but not for the two SCC*mec* type II strains with SCC*mec*Finder.

The new combination of the SCC*mec* cassette described in this study (*mecA*, *ISI272*) concerns *S. haemolyticus* (C128), which is a CNS strain and thus is not included in the *S. aureus* SCC*mec* classification. As defined by the International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (*IWG-SCC*), the SCC *mec* type classification concerns only the MRSA and is based on the *ccr* and *mec* complex elements combination (Ito et al., 2009; Lakhundi and Zhang, 2018). On the other hand, this strain causing bovine subclinical mastitis can also be responsible for many infections in other animal's species and humans via the SCC*mec* inter-species transferability and its zoonotic potential with an increasing impact in public health (Garza-González et al., 2010a; Yamada et al., 2017).

This study highlights the strengths and the weaknesses of phenotypic and genetic tests for the SCC*mec* typing in MRS(A) isolated from bovine mastitis in comparison with other animals species and human.

The findings of this study also emphasize on the importance to classify non-*aureus* SCCmec considering the high potential of the SCCmec inter-species transferability and the CNS increasing impact in public health.

References

- Anand, K.B., Agrawal, P., Kumar, S., Kapila, K., 2009. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. *Indian J. Med. Microbiol.* 27, 27–9.
- Argudín, M.A., Dodémont, M., Vandendriessche, S., Rottiers, S., Tribes, C., Roisin, S., de Mendonça, R., Nonhoff, C., Deplano, A., Denis, O., 2016. Low occurrence of the new species *Staphylococcus argenteus* in a *Staphylococcus aureus* collection of human isolates from Belgium. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1017–1022. doi:10.1007/s10096-016-2632-x
- Baba, T., Kuwahara-Arai, K., Uchiyama, I., Takeuchi, F., Ito, T., Hiramatsu, K., 2009. Complete genome sequence of *Macrococcus caseolyticus* strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *J. Bacteriol.* 191, 1180–1190. doi:10.1128/JB.01058-08
- Bardiau, M., Caplin, J., Dettileux, J., Graber, H., Moroni, P., Taminiau, B., Mainil, J.G., 2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and *agr*-typing. *Vet. Microbiol.* 185, 1–6. doi:10.1016/j.vetmic.2016.01.003
- Bardiau, M., Yamazaki, K., Duprez, J.N., Taminiau, B., Mainil, J.G., Ote, I., 2013. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. *Lett. Appl. Microbiol.* 57, 181–186. doi:10.1111/lam.12099
- Bardiau, Marjorie, Yamazaki, K., Ote, I., Misawa, N., Mainil, J.G., 2013. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats. *Microbiol. Immunol.* 57, 496–501. doi:10.1111/1348-0421.12059
- Becker, K., van Alen, S., Idelevich, E.A., Schleimer, N., Seggewiß, J., Mellmann, A., Kaspar, U., Peters, G., 2018. Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 242–248. doi:10.3201/eid2402.171074

Buntaran, L., Hatta, M., Sultan, A.R., Dwiyantri, R., Sabir, M., 2013. Sccmec type II gene is common among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Jakarta, Indonesia. *BMC Res. Notes* 6, 0–6. doi:10.1186/1756-0500-6-110

Cameron, M., Barkema, H.W., De Buck, J., De Vliegher, S., Chaffer, M., Lewis, J., Keefe, G.P., 2017. Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol. *J. Dairy Sci.* 100, 2137–2147. doi:10.3168/jds.2016-12020

Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X.X., Trakulsomboon, S., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chavalit, T., Song, J., Kondo, Y., 2006. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCC mec) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a proposal for a new nomenclature for SCCmec Elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1001–1012. doi:10.1128/AAC.50.3.1001

Denis, O., Jans, B., Deplano, A., Nonhoff, C., De Ryck, R., Suetens, C., Struelens, M.J., 2009. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among residents of nursing homes in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 1299–1306. doi:10.1093/jac/dkp345

El-Sayed, A., Awad, W., Abdou, N.-E., Castañeda Vázquez, H., 2017. Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 5, 89–97. doi:10.1016/j.ijvsm.2017.08.002

Feliciano, C.S., Namburete, E.I., Rodrigues Praça, J., Peronni, K., Dippenaar, A., Warren, R.M., Silva, W.A., Bollela, V.R., 2018. Accuracy of whole genome sequencing versus phenotypic (MGIT) and commercial molecular tests for detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in Brazil and Mozambique. *Tuberculosis* 110, 59–67. doi:10.1016/j.tube.2018.04.003

García-Álvarez, L., Holden, M.T.G., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., 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.R., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J., Holmes, M.A., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 595–603. doi:10.1016/S1473-3099(11)70126-8

Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Llaca-Díaz, J.M., Rodríguez-Noriega, E., 2010. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol. Infect.* 138, 645–654. doi:10.1017/S0950268809991361

Issa, A., Bada-alamedji, R., Duprez, J., Djika, M., 2013. Bacterial mastitis in the Azawak zebu breed at the Sahelian experimental station in Toukounous (Niger): Identification and typing of *Staphylococcus aureus* 4, 168–178.

Ito, T., Hiramatsu, K., Oliveira, D.C., De Lencastre, H., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Giffard, P.M., Coleman, D., Tenover, F.C., Boyle-Vavra, S., Skov, R.L., Enright, M.C., Kreiswirth, B., Kwan, S.K., Grundmann, H., Laurent, F., Sollid, J.E., Kearns, A.M., Goering, R., John, J.F., Daum, R., Soderquist, B., 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4961–4967. doi:10.1128/AAC.00579-09

Ito, T., Katayama, Y., Hiramatsu, K., 2000. A new mobile genetic element, staphylococcal cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nippon saikingaku zasshi. Japanese J. Bacteriol.* 55, 483–498. doi:10.3412/jsb.55.483

Kadja, M., Kpodekon, M., Kane, Y., Tchassou, K., Kaboret, Y., Maini, J., Taminiau, B., 2010. Typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk cows with subclinical mastitis in Dakar, Senegal Kadja. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.* 195–205. doi:10.4314/bahpa.v58i3.64207

Kaya, H., Hasman, H., Larsen, J., Stegger, M., Johannesen, B., Allesøe, L., 2018. SCCmecFinder, a Web-based tool for typing of Cassette Chromosome mec in *Staphylococcus aureus* Using whole-genome sequence data. *msphere* 3, 1–9. doi:10.1128/mSphere.00612-17

Kondo, Y., Ito, T., Ma, X.X., Watanabe, S., Kreiswirth, B.N., Etienne, J., Hiramatsu, K., 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: Rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 264–274. doi:10.1128/AAC.00165-06

Lakhundi, S., Zhang, K., 2018. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, 1–103. doi:10.1128/CMR.00020-18.

Ngassam Tchamba, C., Rao, A.S., Boyen, F., Haesebrouck, F., Duprez, J.N., Théron, L., Thiry, D., Mainil, J.G., 2019. Comparison of quantitative PCR and MALDI-TOF mass spectrometry assays for identification of bacteria in milk samples from cows with subclinical mastitis. *J. Appl. Microbiol.* 127, 683–692. doi:10.1111/jam.14358

Ote, I., Taminiau, B., Duprez, J.N., Dizier, I., Mainil, J.G., 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 153, 285–292. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.042

Ove Jessen, Rosendal Kirsten, Per Bülow, Viggo Faber, K.R.E., 1969. Changing staphylococci and staphylococcal infections, a ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. *N. Engl. J. Med.* 281, 627–635.

Pantosti, A., Sanchini, A., Monaco, & M., 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2, 323–334. doi:10.2217/17460913.2.3.323

Reyher, K.K., Dohoo, I.R., Scholl, D.T., Keefe, G.P., 2012. Evaluation of minor pathogen intramammary infection, susceptibility parameters, and somatic cell counts on the development of new intramammary infections with major mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 95, 3766–3780. doi:10.3168/jds.2011-5148

Rolinson, G.N., Jevons, M.P., Rolinson, G.N., 1961. “Celbenin”-resistant staphylococci. *Br. Med. J.* 1, 125. doi:10.1136/bmj.1.5219.124-a

Schwendener, S., Cotting, K., Perreten, V., 2017. Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Micrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. *Sci. Rep.* 7, 1–11. doi:10.1038/srep43797

Seemann, T., 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153

Spiliopoulou, I., Petinaki, E., 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection risks from companion animals: current perspectives. *Vet. Med. Res. Reports* 373. doi:10.2147/vmrr.s91313

Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., Hiramatsu, K., 2010. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4352–4359. doi:10.1128/AAC.00356-10

Unal, S.F.A.U., Hoskins J FAU - Flokowitsch J.E., FAU, F.J.E., FAU, W.C.Y., FAU, P.D.A., Skatrud, P.L., 1992. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* JID - 7505564 30, 1685–1691.

Van Griethuysen, A., Van Loo, I., Van Belkum, A., Vandenbroucke-Grauls, C., Wannet, W., Van Keulen, P., Kluytmans, J., 2005. Loss of the *mecA* gene during storage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1361–1365. doi:10.1128/JCM.43.3.1361-1365.2005

Yamada, K., Namikawa, H., Fujimoto, H., Nakaie, K., Takizawa, E., Okada, Y., Fujita, A., Kawaguchi, H., Nakamura, Y., Abe, J., Kaneko, Y., Kakeya, H., 2017. Clinical characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococcal bacteremia in a tertiary hospital. *Intern. Med.* 56, 781–785. doi:10.2169/internalmedicine.56.7715

Supplementary material

Supplementary table 1: Summary of different SCCmec type's Profile based on the multiplex PCR*

SCCmec types	PCR1 (a, b)							PCR2			PCR3		PCR4		
	<i>mecA</i> (286bp)	type 1 <i>ccr</i>	type 2 <i>ccr</i>	type 3 <i>ccr</i>	type 4 <i>ccr</i>	type 5 <i>ccr</i>	type 7 <i>ccr</i>	class A <i>mec</i>	class B <i>mec</i>	class C2 <i>mec</i>	<i>mecA</i> (533pb)	class C1 <i>mec</i>	<i>mecC</i>	class E <i>mec</i>	type 8 <i>ccr</i>
I	+	+							+		+				
II	+		+					+			+				
III	+			+				+			+				
III+SCChg	+			+		+		+			+				
IV	+		+						+		+				
V	+					+				+	+				
VI	+				+				+		+				
VII	+					+					+	+			
VIII	+				+			+			+				
IX	+	+								+	+				
X	+						+				+	+			
XI													+	+	+
II/IV	+		+					+	+		+				
VII/X	+					+	+				+	+			

*+ = PCR positive result, *ccr*= cassette chromosome recombinase gene

Supplementary table 2: Summary of different SCCmec type's profiles based on genomic analysis (SCCmec finder 1.2)*.

SCCmec types	<i>ccr</i> complex genes												<i>mec</i> complex genes							Original strains			
	<i>ccrA</i>	<i>ccrB</i>	<i>ccrA1</i>	<i>ccrB1</i>	<i>ccrA2</i>	<i>ccrB2</i>	<i>ccrA3</i>	<i>ccrB3</i>	<i>ccrA4</i>	<i>ccrB4</i>	<i>ccrC</i>	<i>ccrC2</i>	<i>mecA</i>	<i>mecC</i>	<i>mecR1</i>	Δ <i>mecR1</i>	Ψ <i>mecR1</i>	<i>mecI</i>	<i>IS431</i>		<i>IS1272</i>	Ψ <i>IS1272</i>	
I (1B)			+	+									+			+			+	+			NCTC10442
II (2A)					+	+							+		+			+	+				N315
III (3A)(Hg)							+	+			(+)	(+)	+				+	+	+				85/2082
IVa (2B)					+	+							+			+			+		+		CA05
V (5C2)													+			+			+(2x)				WIS
VI (4B)									+	+			+			+			+		+		HDE288
VII (5C1)													+			+			+(2x)				JCSC6082)
VIII (4A)	+								+	+			+					+	+				C10682
IX (1C2)		+	+										+			+			+(2x)				JCSC6943
X (7C1)		+	+										+			+			+(2x)				JCSC6945
XI (8 ^E)			+					+						+	+				+				LGA251
XII (9C2)			+										+			+			+(3x)				BA01611
XIII (9A)													+		+				+				SS-99-44
New ?													+								+		C128

* + = more than 95% sequence homology, *ccr*= cassette chromosome recombinase gene

Supplementary table 3: Genomic analysis results of the PCR SCCmec NT strains (SCCmecFinder 1.2)*

SCCmec NT strains	Host specie	<i>ccr</i> complex genes							<i>mec</i> complex genes					<i>subtype-IVa(2B)</i>	SCCmec type	
		<i>ccrA1</i>	<i>ccrB1</i>	<i>ccrA2</i>	<i>ccrB2</i>	<i>ccrA3</i>	<i>ccrB3</i>	<i>ccrC</i>	<i>mecA</i>	<i>mecR1</i>	<i>dmecR1</i>	<i>mecI</i>	<i>IS431</i>			<i>IS1272</i>
B231 (<i>S. aureus</i>)	cow			99.93%	100%				100%		100%			100%	100%	IVa(2B)(95.33%)
B524 (<i>S. aureus</i>)	cow			100%	100%				100%		100%			99.95%	100%	IVa(2B) (95.50%)
C128 (<i>S. haemolyticus</i>)	cow								100%					99.75%		None
EQ02 (<i>S. aureus</i>)	human			100%	100%				100%		100%			100%	100%	IVa(2B) (95.51%)
EQ06 (<i>S. aureus</i>)	human			100%	100%				99.95%		100%			99.94%	99.93%	IVa(2B) (95.34%)
EQ13 (<i>S. aureus</i>)	human			99.93%	100%				100%		100%			100%	100%	IVa(2B) (95.39%)
EQ17 (<i>S. aureus</i>)	human			100%	100%				100%		100%			100%	100%	IVa(2B) (95.47%)
J215 (<i>S. aureus</i>)	cat			100%	100%				100%	100%		100%				II(2A) (99.41%)
J231 (<i>S. aureus</i>)	cat			100%	100%				100%					99.62%		IVa(2B) (65.72%)

*NT= not typable, *ccr*= cassette chromosome recombinase, *IS*= insertion sequences, *dmecR1*= *mecR1* gene with a deletion in the C-terminal inducer domain (Oliveira D.C. and de Lencastre H., 2011)

Supplementary table 4: SCCmec typing, general result

Origin	Animal species	Staphylococcus Species	SCCmec types						TOTAL mecA+
			Type II	Type III	Type IV	Type V	Type VII	Type VII/X	
Belgium	Cow	<i>Aureus</i>	6		13	4	3		26
		<i>Epidermidis</i>				1			1
		<i>haemolyticus</i>						1	1
	Boar	<i>Aureus</i>		1					1
	Horse	<i>Aureus</i>				1			1
	Human	<i>Aureus</i>		1	22	2			25
		<i>Capitis</i>			1				1
		<i>Epidermidis</i>			2	3			5
	Fomites	<i>Aureus</i>			2				2
Japan	Dog	<i>Aureus</i>	1						1
	Cat	<i>Aureus</i>	3		1				4
Total			10	2	41	11	3	1	68

2.3. MRSA et MRNAS de la collection « ANIHWA »

L'identification phénotypique et génétique des MRSA et MRNAS de la collection ANIHWA est présentée dans une « short communication » soumise pour publication intitulée : « Methicillin resistance and Staphylococcal Cassette Chromosome: need of a parallel classification for *non-aureus* staphylococci ». Cet article se base sur l'identification de 8 souches résistantes à la céfoxitine et/ou positives à la PCR pour le gène *mecA* par le partenaire norvégien du projet (Fergestad et al., manuscript in preparation) parmi les 272 souches bovines de staphylocoques isolées en Belgique et en Norvège. Ces 8 souches ont été identifiées à l'espèce par MALDI-TOF par le partenaire gantois (5 MRSA et 3 MRNAS). Notre travail sur ces 8 souches a consisté à confirmer leur phénotype de résistance à la céfoxitine et la présence du gène *mecA* par PCR, ainsi qu'à identifier les cassettes SCC*mec* par PCR multiplexes et par séquençage du génome total (WGS). Les résultats ont montré que la cassette SCC*mec* de type IV a été identifiée pour 6 souches dont cinq après PCR (4 *S. aureus* et 1 *S. epidermidis*) et une de plus après WGS (*S. aureus*). Les SCC*mec* présentes dans les deux autres souches coagulases négatives (*S. haemolyticus* et *S. vitulinus*) n'ont cependant pu être identifiées, ni par PCR multiplexes, ni par WGS. Les résultats obtenus nous ont montré que la souche de *S. haemolyticus* pourrait héberger une nouvelle cassette SCC*mec*, mais ce résultat n'est pas pris en considération dans la classification par le « groupe international de travail sur la cassette chromosomique staphylococcique » (IWG-SCC), compte tenu de son espèce *non-aureus*. La souche *S. vitulinus* quant à elle paraîtrait ne pas posséder de cassette SCC*mec* en plus d'être la seule des 8 souches à être sensible à la céfoxitine et positive pour l'allotype *mecA2*. L'étude de l'expression de ce gène *mecA2* par détection de l'ARNm et de la PBP2a devrait aider à comprendre ce phénotype de sensibilité à la céfoxitine.

Article 3 (short communication): Methicillin resistance and Staphylococcal Cassette Chromosome: need of a parallel classification for non-*aureus* staphylococci.

Cyrille Ngassam-Tchamba ^a, Jean-Noël Duprez ^a, Marte Fergestad ^b, Anneleen De Visscher ^{c,1}, Trine L’Abee-Lund ^b, Sarne De Vlieghe ^c, Yngvild Wasteson ^b, Fabrice Touzain ^d, Yannick Blanchard ^d, Maria A. Argudín ^e, Jacques Mainil ^a, Damien Thiry ^{a,*}

^a Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Institute for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liège, quartier vallée 2, avenue Cureghem 6, B-4000 Liège, Belgium; Damien.Thiry@uliege.be

^b Department of Paraclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Norwegian University of Life Sciences, 0454 Oslo, Norway; yngvild.wasteson@nmbu.no

^c M-team & Mastitis and Milk Quality Research Unit, Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, B-9820 Merelbeke, Belgium; Sarne.DeVlieghe@UGent.be

^d Viral Genetics and Bio-security Unit, ANSES, Ploufragan-Plouzané laboratory, rue des fusillés, 22 440 Ploufragan, France; yannick.blanchard@anses.fr

^e NRC *S. aureus*, Microbiology, LHUB-ULB Site Anderlecht, Erasmus Hospital, Free University of Brussels, Route de Lennik 808, 1070 Bruxelles Belgium; argudinmaria@gmail.com

* Correspondence: Damien.Thiry@uliege.be

¹ Current address: Flanders Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food (ILVO), Technology and Food Science, Agricultural Engineering, Burg. Van Gansberghelaan 115 bus 1, 9820 Merelbeke, Belgium

Article en préparation

Abstract: The methicillin resistant coagulase-positive staphylococci (MRCPS) are largely studied compared to the coagulase-negative ones (MRCNS), considering their clinical importance mainly in human infections. This study focuses on two bovine coagulase-negative staphylococcal strains (*Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus vitulinus*) showing particular profiles after SCCmec typing by PCR and WGS. The *Staphylococcus vitulinus* strain carried only a *mecA* gene allotype (*mecA2*) without any SCCmec but was susceptible to ceftiofur. The *Staphylococcus haemolyticus* strain showed three *ccr* complex genes (*ccrA1*, *ccrB3*, *ccrC1*) and two *mec* complex genes (*mecA*, *IS1272*) but, as non-*aureus*, it could not be integrated to the MRSA SCCmec classification. A parallel non-*aureus* SCCmec scheme should be added to the existing *S. aureus* SCCmec scheme in order to classify them.

Keywords: Staphylococcal cassette chromosome; coagulase negative staphylococci; parallel classification; *mecA*; animal-associated.

1. Introduction

The use of antimicrobials against staphylococci has contributed to the emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) which can be classified on the basis of the identity of the “Staphylococcal Cassette Chromosome” (SCC*mec*) whose general structure (fig. 1) includes a *mec* gene complex, a cassette chromosome recombinase (*ccr*) gene complex and flanking direct/inverted-repeat sequences (Lakhundi and Zhang, 2018). The *mec* gene complex comprises the *mecA* or *mecC* gene, the regulatory genes [*mecRI* (inductor) and *mecI* (repressor)] and the associated insertion sequences (IS). The *ccr* gene complex which includes 3 *ccr* genes (*ccrA*, *ccrB* and *ccrC*) and surrounding open reading frames (ORFs) is responsible for the integration and the excision of the SCC*mec* in and from the chromosome (Ito et al., 2009). The SCC*mec* also includes three junction (J) regions. The J1 region is located upstream the *ccr* gene complex (L-C region) and includes several ORFs and regulatory genes (*pls* and *kdp*). The J2 region is located between the *ccr* gene complex and the *mec* gene complex (C-M region) and includes integrase or transposon Tn554 (encoding the resistance to erythromycin). The J3 region is located downstream of the *mec* gene complex (M-R region) and includes different inserted genetic elements such as plasmid pT181, plasmid pUB110 and transposon Tn4001 (Liu et al., 2016).

To date, there are 14 officially recognized SCC*mec* types in MRSA that are defined by the combinations of the *ccr* and *mec* gene complexes. Several SCC*mec* subtypes also exist based on the variations in the J regions (Lakhundi and Zhang, 2018). Conversely, such SCC*mec* type classification does not exist in Methicillin Resistant Coagulase-Negative Staphylococci (MRCNS). The purpose of this work was firstly to identify and compare the SCC*mec* in 8 methicillin resistant staphylococci strains isolated from bovine milk samples in Belgium by multiplex PCRs and Whole Genome Sequencing (WGS); and secondly to discuss the importance to maintain the SCC*mec* *S. aureus* schema but adding a parallel non-*aureus* staphylococci schema (with a specific numeration for SCC*mec* from non-*aureus* staphylococci).

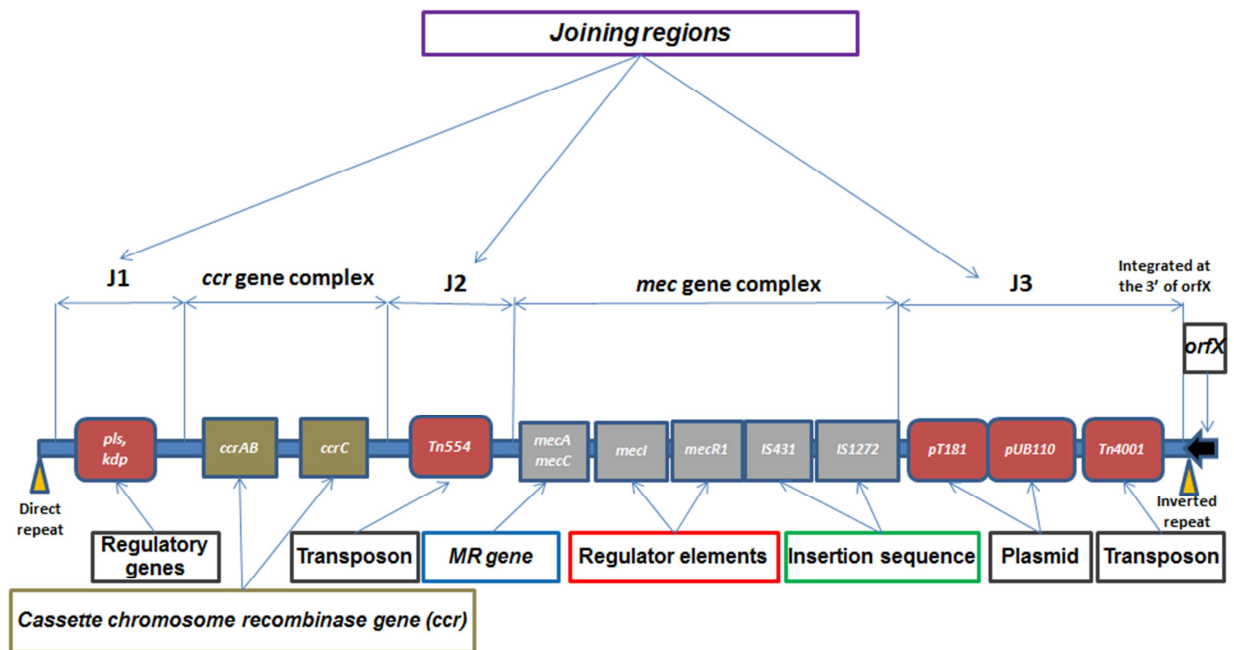


Figure 1. General structure of the SCC_{mec} elements

2. Materials and Methods

The 3 MRCNS (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. vitulinus*) and the 5 MRSA were identified by MALDI-TOF MS[®] and *mecA* gene PCR within a collection of 272 staphylococci isolated in Norway and Belgium from milk samples of cows with clinical or sub-clinical mastitis: the *S. epidermidis*, the *S. haemolyticus* and the 5 MRSA were phenotypically resistant to ceftiofur while the *S. vitulinus* was sensitive (Fergestad et al., unpublished data). All 8 MRS were isolated in Belgium: one MRSA at the University of Ghent (Gt_111) and all other MRS at the University of Liège (Lg_). SCCmec types I to XI were identified according to a multiplex PCR SCCmec scheme adapted from Argudin *et al* (Argudín et al., 2016) and the results were confirmed by WGS.

The SCCmec type identification was based on a set of 5 multiplex PCR targeting the *ccr* and *mec* gene complexes using the multiplex PCR kit[®] (QIAGEN, Netherland). For each multiplex PCR, 2 µl of DNA obtained by boiling was used and the mix was constituted of 7.5µl of PCR reaction mix 2x, 3µl of Q solution, 5µl of primer mix (10µM). The targeted genes, primer sequences and the PCR product lengths (bp) are reported in table 1 (Maes et al., 2002; Kondo et al., 2007; Urushibara et al., 2011; Stegger et al., 2012). The PCR amplification conditions for the PCR1a and PCR1b were: an initial denaturation at 95 °C for 15min; 40 cycles of 95 °C for 30s (denaturation), 57°C for 90s (annealing), and 72°C for 2min (extension); and a final extension at 72 °C for 10min. For the PCR 2, 3 and 4 the conditions were different with 35 cycles of 94°C for 2min (denaturation), 60°C of 90s (annealing) and 72°C for 3min (extension). All PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gel, stained with Midori green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Germany).

Whole genome DNA extraction was performed using an overnight bacterial culture pellet suspended in 495µl of buffer (75Mm NaCl, 25Mm EDTA pH8, 20Mm Tris HCl pH7). After addition of 50µl of lysostaphin (50µg/ml) and 10µl of RNase (10µg/ml) the suspension was incubated for 1h at 37°C. Then, 50µl of 10% SDS and 5µl of proteinase K (100µg/ml) were added and the suspension was incubated for 1h at 55°C. After adding 200µl of NaCl 5M and 700µl of chloroform/isoamylalcohol (24/1) then ethanol precipitation, the dried pellet containing DNA was suspended in 20µl MiliQ water and stored at -20°C until further use.

The Nextera XT kit and the NovaSeq 6000 Sequencing System (Illumina, San Diego, CA, USA) were used for DNA library preparation and sequencing, respectively. The raw read sequences were assembled in contigs using the pipeline shovill 1.0.4, including trimmomatic 0.38 for the cleaning and annotated using Prokka 1.13.3 (Seemann, 2014).

Nanopore MinION long-read sequencing was also carried out on 2 untypeable MRCNS using the Rapid Barcoding Sequencing kit (Oxford Nanopore) for library preparation. After guppy_gpu base calling, assembly was done using Canu 1.8. Illumina reads were cleaned with trimmomatic 0.36 and aligned with canu assembly using BWA 0.7.15-r1140. Pilon 1.23 was run on this alignment for preliminary corrections. All the obtained sequences were subjected to comparison with the database

SCC*mec* Finder 1.2 and ResFinder 3.2 available from the Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/>) with a %ID threshold of 90% and minimum length of 60%. A SCC*mec* Finder confirmation was performed for the not matching sequences strain with %ID threshold and minimum length of 80% and 40% respectively (Camacho et al., 2009; Oliveira and de Lencastre, 2011; Clausen et al., 2018; Kaya et al., 2018). SCC*mec* Finder 1.2 was used for the detection of SCC*mec* type I-XI and subtypes of the types IV and V, while ResFinder 3.2 was used for the detection of the methicillin resistance genes (*mecA*, *mecA1*, *mecA2*, *mecC*). All genomic data related to this project, including raw reads, are available via the NCBI BioProject PRJNA609060.

Table 1. Characteristics of the primers for the PCR SCC*mec*

Multiplex	Genes	Primers	Primers sequence 5'-3'	PCR product Length (bp)	References
PCR1a	Type 1 <i>ccr</i>	α 1-dege	AACCTATATCATYAATCAGTRCGT	695bp	(Kondo et al., 2007)
		β c	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT		
	Type 2 <i>ccr</i>	α 2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	937bp	(Kondo et al., 2007)
		β c	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT		
	Type 3 <i>ccr</i>	α 3	AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT	1791bp	(Kondo et al., 2007)
β c		ATTGCCTTGATAATAGCCITCT			
Type 7 <i>ccr</i>	α 1-dege ccr7.4-rev	AACCTATATCATYAATCAGTRCGT ACATGCGCTGTAGTGCAGGG	417bp	(Kondo et al., 2007)	
PCR1b	<i>mecA</i>	mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	286bp	(Kondo et al., 2007)
		mA2	AACGTTGTAACCAACCCCAAGA		
	Type 4 <i>ccr</i>	α 4.2	GTATCAATGCACCAGAACTT	1287bp	(Kondo et al., 2007)
		β 4.2 dege	TTGCGACTCTCTTGRCGTTT		
Type 5 <i>ccr</i>	γ R	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	518bp	(Kondo et al., 2007)	
	γ F	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT			
PCR2	class A <i>mec</i>	mI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	1963bp	(Kondo et al., 2007)
		mA7	ATATACCAAACCCGACAACACTACA		
	class B <i>mec</i>	IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	2827bp	(Kondo et al., 2007)
		mA7	ATATACCAAACCCGACAACACTACA		
class C2 <i>mec</i>	IS2	TGAGGTTATTAGATATTTTCGATGT	804bp	(Kondo et al., 2007)	
	mA7	ATATACCAAACCCGACAACACTACA			
PCR3	<i>mecA</i>	mecA 1	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533bp	(Maes et al., 2002)
		mecA 2	AGTTCTGCAGTACCGATTTGC		
	class C1a / C1b <i>mec</i>	ISF4	CGGATTTTCGCCATGCCACGA	1232bp/286bp	(Urushibara et al., 2011)
		mA7	ATATACCAAACCCGACAACACTACA		
PCR4	Type 8 <i>ccr</i>	ccr8.4-fw	CTCAAGCGATACGGTCACAA	1388bp	(Argudín et al., 2016)
		ccr8.3-rev	TCAGGCCTTTACGACGTTTT		
	class E <i>mec</i>	mecC-fw	TTTTGCCTCGCTCTGATTTT	1083bp	(Argudín et al., 2016)
		mecR1-rv	GCCAAAAGACCATTTGGATTC		
<i>mec C</i>	mecALGA251MultiFP mecALGA251MultiRP	GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC GAAGATCTTTCCGTTTTTCAGC	138bp	(Stegger et al., 2012)	

3. Results

The multiplex PCR identified the SCCmec type IV in *S. epidermidis* and in 4 MRSA, but could not differentiate between SCCmec types II and IV in the fifth MRSA. In this strain, there was a surplus of class B *mec* compared to the SCCmec type IV conventional PCR profile (Table 2). In addition, the amplification profile of the *S. haemolyticus* did not match with any recognized SCCmec type and no amplification was obtained for the *S. vitulinus*, except for the *mecA* gene.

The WGS confirmed the presence of a SCCmec type IV in *S. epidermidis* and in the 5 MRSA using SCCmec Finder database (Table 3 fig. 2). Conversely, no SCCmec was identified in the *S. haemolyticus* and *S. vitulinus* though *ccrA1*, *ccrB3*, *ccrC1*, *mecA* and *IS1272* genes were present in the former (fig. 3). On the other hand, only the *mecA* gene was detected in the latter, similarly to the result of the multiplex PCR typing scheme.

The WGS also confirmed the presence of a 100% homologous *mecA* gene in *S. epidermidis*, in *S. haemolyticus* and in all 5 MRSA, but not in *S. vitulinus* using SCCmec Finder and ResFinder databases. The *mecA* gene of *S. vitulinus* that was the only isolate phenotypically sensitive to cefotixin was 91% homologous to the *mecA* gene using SCCmec Finder database, but 99.8% homologous to the *mecA2* allotype using ResFinder database, that is not present in the SCCmec Finder database.

4. Discussion

This study focuses on the SCCmec characterization by multiplex PCR and WGS of 3 MRCNS and their comparison with 5 MRSA, all isolated in Belgium from bovine mastitis.

The *S. epidermidis* MRCNS was resistant to cefoxitin, positive at the *mecA* PCR and harboured a type IV SCCmec identified by the multiplex PCR scheme and WGS with a 100% homologous *mecA* gene using SCCmec Finder and ResFinder databases. Conversely, no SCCmec type could be identified by multiplex PCR and WGS SCCmec for the *S. haemolyticus* strain; although this strain was resistant to cefoxitin, positive at the *mecA* PCR and harbored a 100% homologous *mecA* gene using SCCmec Finder and ResFinder databases (table 2 and 3). These observations suggest the presence of one still unknown SCCmec profile and illustrate the limits of SCCmec Finder when analyzing contigs (Kaya et al., 2018). Moreover, according to the International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG SCC), only MRSA are considered for the SCCmec classification (Ito et al., 2009). Keeping an individual classification for MRSA is essential, nevertheless, as shown in several studies (Garza-González et al., 2010b; Yamada et al., 2017; Ngassam Tchamba et al., 2019), non-*aureus* staphylococci represent a large proportion of SCCmec carriers in veterinary medicine with a real impact in public health as well as *S. aureus*. Consequently

and due to the potential inter-species *SCCmec* transferability, a parallel non-*aureus* scheme, with a specific numeration for *SCCmec* not described for *S. aureus*, should be considered in the future.

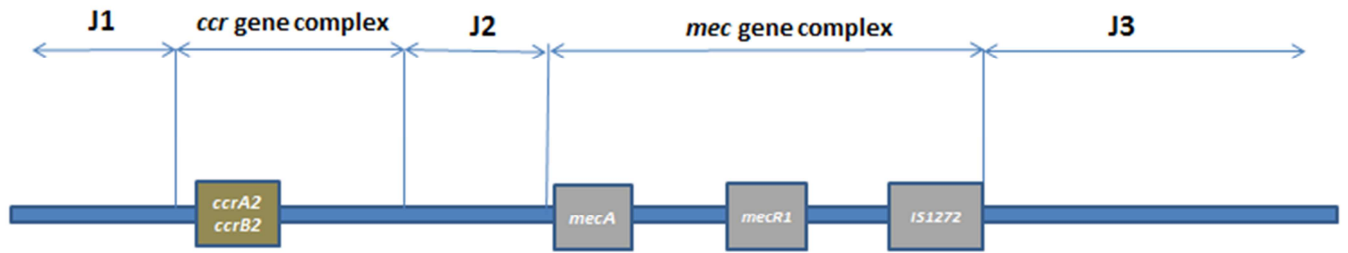


Figure 2. SCCmec profile of AnisGT_111 (*S. aureus*) (SCCmec IV) obtained by SCCmecFinder analysis (%ID threshold of 90% and minimum length of 60%).

ccr= Cassette chromosome recombinase, IS= insertion sequence, orf= Open Reading Frame

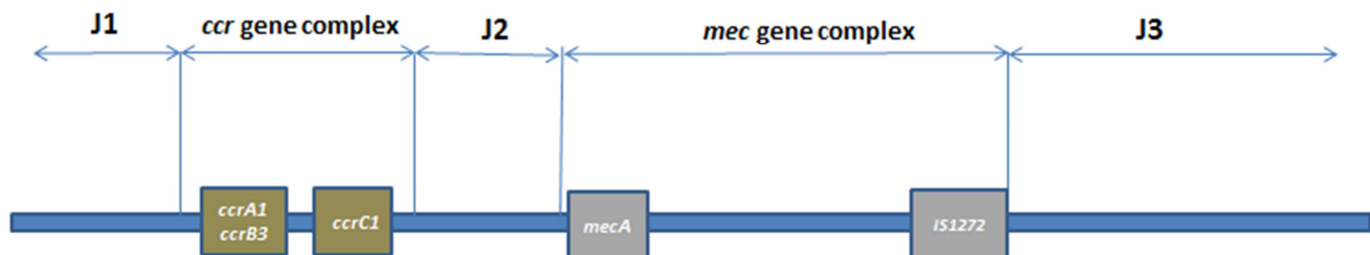


Figure 3. SCCmec profile of AnisLG_048 (*S. haemolyticus*) (not typed) obtained by SCCmecFinder analysis (%ID threshold of 90% and minimum length of 60% then confirmed with %ID threshold of 80% and minimum length of 40%).

ccr= Cassette chromosome recombinase, IS= insertion sequence, orf= Open Reading Frame

Table 2. Resistance/sensitivity to cefoxitin and SCCmec PCR result of different staphylococcal isolates causing bovine mastitis

Isolates	Cefox	PCR1 (a, b)							PCR2			PCR3		PCR4			SCCmec types
		<i>mecA</i>	type 1 <i>ccr</i>	type 2 <i>ccr</i>	type 3 <i>ccr</i>	type 4 <i>ccr</i>	type 5 <i>ccr</i>	type 7 <i>ccr</i>	class A <i>mec</i>	class B <i>mec</i>	class C2 <i>mec</i>	<i>mecA</i>	class C1 <i>mec</i>	<i>mecC</i>	class E <i>mec</i>	type 8 <i>ccr</i>	
Ani_LG_017 (<i>S. aureus</i>)	R	+		+						+		+					IV
Ani_LG_020 (<i>S. aureus</i>)	R	+		+						+		+					IV
Ani_LG_027 (<i>S. aureus</i>)	R	+		+						+		+					IV
Ani_LG_010 (<i>S. aureus</i>)	R	+		+						+		+					IV
Ani_LG_141 (<i>S. epidermidis</i>)	R	+		+						+		+					IV
Ani_GT_111 (<i>S. aureus</i>)	R	+		+					+	+		+					NT (II /IV)
Ani_LG_048 (<i>S. haemolyticus</i>)	R	+						+			+	+					No matching
Ani_LG_101 (<i>S. vitulinus</i>)	S	+										+					No amplification

NT= Not typed; Ani_LG: isolated at University of Liège (ULiège); Ani_GT: isolated at Ghent University (UGent); Cefox=cefoxitin; R= Resistant, S=sensitive

Table 3. Resistance/sensitivity to cefoxitin and SCCmec Genomic analysis results (SCCmecFinder 1.2) of different staphylococcal isolates causing bovine mastitis

Isolates	Cefox	<i>ccr</i> complex							<i>mec</i> complex					subtype- <i>IVa(2B)</i>	subtype- <i>IVc(2B)</i>	SCCmec type	
		<i>ccrA1</i>	<i>ccrB1</i>	<i>ccrA2</i>	<i>ccrB2</i>	<i>ccrA3</i>	<i>ccrB3</i>	<i>ccrC1</i>	<i>mecA</i>	<i>mecR1</i>	<i>dmecR1*</i>	<i>mecI</i>	<i>IS431</i>				<i>IS1272</i>
Ani_LG_017 (<i>S. aureus</i>)	R			+	+				+		+			+		+	IVc (2B)
Ani_LG_020 (<i>S. aureus</i>)	R			+	+				+		+			+		+	IVc (2B)
Ani_LG_027 (<i>S. aureus</i>)	R			+	+				+		+			+		+	IVc (2B)
Ani_LG_010 (<i>S. aureus</i>)	R			+	+				+		+			+		+	IVc (2B)
Ani_LG_141 (<i>S. epidermidis</i>)	R			+	+				+		+			+		+	IVa (2B)
Ani_GT_111 (<i>S. aureus</i>)	R			+	+				+		+			+		+	IVa (2B)
Ani_LG_048 (<i>S. haemolyticus</i>)	R	A						B	C		+			D			None
Ani_LG_101 (<i>S. vitulinus</i>)	S										E						None

dmecR1= *mecR1* gene with 160 bp deletion in the C-terminal inducer domain (Oliveira et al, 2011); += more than 99% sequence homology; A= 89% sequence similarity, B= 86% sequence similarity, C= 94% sequence similarity; E= 91% sequence similarity; D= 90% sequence similarity; Ani_LG: isolated at University of Liège (ULiège); Ani_GT: isolated at Ghent University (UGent); Cefox=cefoxitin; R= Resistant, S=sensitive

At the difference of these 2 MRCNS, the *S. vitulinus* strain was sensitive to ceftiofur though being positive for the presence of a *mecA* gene by PCR and WGS. No other SCC*mec*-located genes could be identified, neither by the multiplex PCR, nor by WGS. This *mecA* gene has only 91% sequence similarity with the *mecA* gene in SCC*mec* Finder, but 99.8% homology with the *mecA2* allotype using the ResFinder database. The *mecA2* gene in *S. vitulinus* may actually be a *mecA* gene precursor since the primitive *mecA* gene has its origin in *S. fleurettii* and shares the same gene location with the *mecA1* allotype in *S. sciuri* and with the *mecA2* allotype in *S. vitulinus*. From *S. fleurettii* this original *mecA* gene was transmitted to other MRCNS and to MRCPS species over time (Schnellmann et al., 2006; Rolo et al., 2016). Moreover, Tsubakishita et al. (2010) showed that *S. fleurettii*, *S. sciuri* and *S. vitulinus* were originally isolated from animals reinforcing the hypothesis that the methicillin resistance is of animal origin (Tsubakishita et al., 2010b). Finally the sensitivity of the *S. vitulinus* strain to ceftiofur can be explained by an under-expression of the *mecA2* gene, possibly linked to the absence of a complete SCC*mec* (Becker et al., 2018) or by an under-efficient Penicillin-Binding Protein. Further studies need to be carried out (RNAm and PBP2a detection) to investigate the lack or the under-expression of the *mecA* gene in this strain and the activity of the *mecA2*-encoded PBP2a.

The 5 MRSA were resistant to ceftiofur, positive at the *mecA* PCR and harboured a type IV SCC*mec* identified by the multiplex PCR scheme and WGS with a 100% homologous *mecA* gene using SCC*mec* Finder and ResFinder databases. This SCC*mec* type IV is indeed predominant in Belgium, particularly in bovine LA-MRSA (Livestock associated MRSA) although other SCC*mec* types exist but at a lower prevalence (Denis et al., 2009; Bardiau et al., 2013a). All these MRSA isolates presented the same SCC*mec* profile at the WGS, but not at the PCR test where one isolate (Ani_GT_111) failed to the typing. Moreover, the SCC*mec* subtypes were identified in all the MRSA isolates by WGS but not by PCR and that the complexity of PCR SCC*mec* protocol (several multiplexes PCR) could be a limiting factor for the SCC*mec* typing in term of decreasing sensitivity and difficulty of the result interpretation (Hajia, 2017).

This study highlights two particular SCC*mec* profiles of CNS isolated from bovine mastitis in Belgium showing, on the one hand, a suspicion of a new SCC*mec* cassette in *S. haemolyticus* and, on the other hand, the non-location of the *mecA* gene on any SCC*mec* cassette in *S. vitulinus* as already shown by Rolo and collaborators (Rolo et al., 2016). In conclusion, CNS from animal origin can still harbor primitive *mecA* gene and a parallel classification should be proposed to consider non-*aureus* SCC*mec* types because of their increasing importance in public health (Garza-González et al., 2010b; Yamada et al., 2017).

Funding: This research was funded by ANIHWA ERA-Net project: “MRSA_BACTERIOPHAGE”.

Conflict of interest statement: None.

References

- Argudín, M.A., Dodémont, M., Vandendriessche, S., Rottiers, S., Tribes, C., Roisin, S., de Mendonça, R., Nonhoff, C., Deplano, A., Denis, O., 2016. Low occurrence of the new species *Staphylococcus argenteus* in a *Staphylococcus aureus* collection of human isolates from Belgium. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1017–1022. doi:10.1007/s10096-016-2632-x
- Bardiau, M., Yamazaki, K., Duprez, J.N., Taminiau, B., Mainil, J.G., Ote, I., 2013. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. *Lett. Appl. Microbiol.* 57, 181–186. doi:10.1111/lam.12099
- Becker, K., van Alen, S., Idelevich, E.A., Schleimer, N., Seggewiß, J., Mellmann, A., Kaspar, U., Peters, G., 2018. Plasmid-encoded transferable mecB-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 242–248. doi:10.3201/eid2402.171074
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421. doi:10.1186/1471-2105-10-421
- Clausen, P.T.L.C., Aarestrup, F.M., Lund, O., 2018. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics* 19, 1–8. doi:10.1186/s12859-018-2336-6
- Denis, O., Jans, B., Deplano, A., Nonhoff, C., De Ryck, R., Suetens, C., Struelens, M.J., 2009. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among residents of nursing homes in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 1299–1306. doi:10.1093/jac/dkp345
- Garza-González, E., Morfin-Otero, R., Llaca-Díaz, J.M., Rodríguez-Noriega, E., 2010. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol. Infect.* 138, 645–654. doi:10.1017/S0950268809991361
- Hajia, M., 2017. Limitations of Different PCR Protocols Used in Diagnostic Laboratories: A Short Review. *Mod. Med. Lab. J.* 1, 01–06. doi:10.30699/mmlj17-01-01
- Ito, T., Hiramatsu, K., Oliveira, D.C., De Lencastre, H., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Giffard, P.M., Coleman, D., Tenover, F.C., Boyle-Vavra, S., Skov, R.L., Enright, M.C., Kreiswirth, B., Kwan, S.K., Grundmann, H., Laurent, F., Sollid, J.E., Kearns, A.M., Goering, R., John, J.F., Daum, R., Soderquist, B., 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec):

Guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4961–4967. doi:10.1128/AAC.00579-09

Kaya, H., Hasman, H., Larsen, J., Stegger, M., Johannesen, B., Allesøe, L., 2018. SCCmecFinder, a Web-based tool for typing of Cassette Chromosome mec in *Staphylococcus aureus* Using whole-genome sequence data. *msphere* 3, 1–9. doi:10.1128/mSphere.00612-17

Kondo, Y., Ito, T., Ma, X.X., Watanabe, S., Kreiswirth, B.N., Etienne, J., Hiramatsu, K., 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: Rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 264–274. doi:10.1128/AAC.00165-06

Lakhundi, S., Zhang, K., 2018. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, 1–103. doi:10.1128/CMR.00020-18.

Liu, J., Chen, D., Peters, B.M., Li, L., Li, B., Xu, Z., Shirliff, M.E., 2016. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.* 101, 56–67. doi:10.1016/j.micpath.2016.10.028

Maes, N., Magdalena, J., Gheldre, Y. De, Struelens, M.J., 2002. Evaluation of a Triplex PCR Assay To Discriminate *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci and Determine Methicillin Resistance from Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1514–1517. doi:10.1128/JCM.40.4.1514

Ngassam Tchamba, C., Rao, A.S., Boyen, F., Haesebrouck, F., Duprez, J.N., Théron, L., Thiry, D., Mainil, J.G., 2019. Comparison of quantitative PCR and MALDI-TOF mass spectrometry assays for identification of bacteria in milk samples from cows with subclinical mastitis. *J. Appl. Microbiol.* 127, 683–692. doi:10.1111/jam.14358

Oliveira, D.C., de Lencastre, H., 2011. Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* is not affected by the overexpression in trans of the mecA gene repressor: A surprising observation. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0023287

Rolo J, Worning P, N.J., Bowden R, Bouchami O, D.P., Guardabassi L, Perreten V, Tomasz A, W., H, de Lencastre H, M.M., 2016. Evolutionary origin of the staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec). *Antimicrob Agents Chemother* 16. doi:10.1128/AAC.02302-16

- Schnellmann, C., Gerber, V., Rossano, A., Jaquier, V., Panchaud, Y., Doherr, M.G., Thomann, A., Straub, R., Perreten, V., 2006. Presence of new *mecA* and *mph(C)* variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4444–4454. doi:10.1128/JCM.00868-06
- Seemann, T., 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
- Stegger, M., Andersen, P.S., Kearns, A., Pichon, B., Holmes, M.A., Edwards, G., Laurent, F., Teale, C., Skov, R., Larsen, A.R., 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 395–400. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03715.x
- Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., Hiramatsu, K., 2010. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4352–4359. doi:10.1128/AAC.00356-10
- Urushibara, N., Paul, S.K., Hossain, M.A., Kawaguchiya, M., Kobayashi, N., 2011. Analysis of staphylococcal cassette chromosome *mec* in *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus sciuri*: Identification of a novel *ccr* gene complex with a newly identified *ccrA* allotype (*ccrA7*). *Microb. Drug Resist.* 17, 291–297. doi:10.1089/mdr.2010.0144
- Yamada, K., Namikawa, H., Fujimoto, H., Nakaie, K., Takizawa, E., Okada, Y., Fujita, A., Kawaguchi, H., Nakamura, Y., Abe, J., Kaneko, Y., Kakeya, H., 2017. Clinical characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococcal bacteremia in a tertiary hospital. *Intern. Med.* 56, 781–785. doi:10.2169/internalmedicine.56.7715

Section expérimentale

ETUDE 3 : EVALUATION DE L'EFFICACITE ANTI-STAPHYLOCOCCIQUE ET DE L'INNOCUITE DE BACTERIOPHAGES *IN VITRO* ET *IN VIVO*, EN MODELES DE LARVES DE *GALLERIA MELLONELLA* ET DE MAMMITE MURINE

3.1. Préambule

Le but de cette 3^e partie était d'évaluer l'efficacité thérapeutique des bactériophages contre les souches *S. aureus* responsables des mammites bovines. La finalité était de répondre à l'objectif général de notre étude qui consistait à évaluer l'utilisation thérapeutique des bactériophages en tant qu'alternative de lutte contre les mammites bovines due à *S. aureus* particulièrement aux MRSA.

Cette partie s'est basée sur des tests *in vitro* et sur deux modèles *in vivo* (*Galleria mellonella* et mammite murine). Le modèle de larve *Galleria mellonella* est un modèle utilisant les larves de la famille des Pyralidés (papillons de museau) et particulièrement les vers de cire non adultes (Scoble, 1995). Il a été utilisé dans cette étude comme modèle intermédiaire ayant permis d'effectuer un tri préliminaire de bactériophages et de réduire le nombre de souris à utiliser en modèle murin. Quant au modèle de mammite murine, il s'agit d'un modèle utilisant les souris de laboratoire qui a été développé et caractérisé en 1970 par Chandler en ce qui concerne les principales bactéries responsables de mammites bovines (Chandler, 1970). Ce modèle nous a permis, dans cette étude, d'avoir plus de précisions sur l'efficacité thérapeutique des phages préalablement testés en modèle *Galleria mellonella*.

3.2. Evaluation thérapeutique *in vitro* et *in vivo* des bactériophages contre les souches de *S. aureus* responsables de mammites bovines

Cette 3^e étude fait l'objet d'un article publié dans le journal « Journal of Global Antimicrobial Resistance », intitulé : « *In vitro* and *in vivo* assessment of phage therapy against *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis ».

Un ensemble de souches de *S. aureus* a été testé *in vitro* (sur gélose et en bouillon) sur une collection de 4 bactériophages (Romulus, Remus, ISP et DSMZ105264) afin de déterminer leur sensibilité. Par la suite la souche présentant la meilleure sensibilité aux phages a été utilisée pour les tests *in vivo* en modèle *Galleria mellonella* et en modèle murin (mammites). L'évaluation sur les larves de *Galleria mellonella* a été effectuée avec 3 phages (Romulus, Remus et ISP), tandis que l'évaluation sur les souris ne concernait que le phage ISP compte tenu des résultats des tests préliminaires. Une détermination des titres en bactéries et en phages à l'intérieur des larves et des glandes mammaires de souris a été effectuée ainsi que des analyses histopathologiques des glandes mammaires de souris.

Les résultats de cette étude ont montré que 3 des 4 bactériophages utilisés (Romulus, Remus et ISP) permettaient une lyse des souches de *S. aureus* *in vitro* et possédaient une efficacité relative en modèles *in vivo* matérialisée par des diminutions significatives des titres bactériens dans le groupe des

larves infectées et traitées par ces phages 4 jours après inoculation, sans toutefois permettre une survie significativement plus élevée des larves. En modèle *in vivo* chez les souris, le phage ISP a aussi permis une amélioration clinique et histologique, mais pas une guérison complète, des mammites 48 heures après inoculation. De plus, une différence significative a été observée pour les titres en bactéries et en phages dans les groupes de souris infectées et traitées par le phage ISP.

Article 4: *In vitro* and *in vivo* assessment of phage therapy against *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis

C. Ngassam-Tchamba^{a,*}, **J.N. Duprez**^a, **M. Fergestad**^b, **A. De Visscher**^{c,**}, **T. L’Abee-Lund**^b, **S. De Vlieghe**^c, **Y. Wasteson**^b, **F. Touzain**^d, **Y. Blanchard**^d, **R. Lavigne**^e, **N. Chanishvili**^f, **D. Cassart**^g, **J. Mainil**^a, **D. Thiry**^a

^a Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Institute for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liège, quartier vallée 2, avenue Cureghem 6, B-4000 Liège, Belgium

^b Department of Food Safety and Infection Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Norwegian University of Life Sciences, P.O. Box 5003, 1432 ÅS, Norway

^c M-team & Mastitis and Milk Quality Research Unit, Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, B-9820 Merelbeke, Belgium

^d Viral Genetics and Bio-security Unit, ANSES, Ploufragan-Plouzané laboratory, rue des fusillés, 22 440 Ploufragan, France

^e Laboratory of Gene Technology, Department of Biosystems, KU Leuven, 3001 Heverlee, Belgium

^f R & D Department Eliava Institute of Bacteriophages, 3 Levan Gotua St, T'bilisi, Georgia

^g Department of Morphology and Pathology Faculty of Veterinary Medicine and Institute for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liège, quartier vallée 2, avenue Cureghem 6, B-4000 Liège, Belgium

* Corresponding author.

Email address: damien.thiry@uliege

**Current address: Flanders Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food (ILVO), Technology and Food Science, Agricultural Engineering, Burg. Van Gansberghelaan 115 bus 1, 9820 Merelbeke, Belgium



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Global Antimicrobial Resistance

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jgar

In vitro and in vivo assessment of phage therapy against *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis



C. Ngassam-Tchamba^a, J.N. Duprez^a, M. Fergestad^b, A. De Visscher^{c,1}, T. L'Abée-Lund^b, S. De Vlieghe^c, Y. Wasteson^b, F. Touzain^d, Y. Blanchard^d, R. Lavigne^e, N. Chanishvili^f, D. Cassart^g, J. Mainil^a, D. Thiry^a

^a Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Institute for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liège, Quartier Vallée 2, Avenue Cureghem 6, B-4000 Liège, Belgium

^b Department of Food Safety and Infection Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Norwegian University of Life Sciences, P.O. Box 5003, 1432 Ås, Norway

^c M-team & Mastitis and Milk Quality Research Unit, Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, B-9820 Merelbeke, Belgium

^d Viral Genetics and Bio-security Unit, ANSES, Ploufragan-Plouzané laboratory, Rue des Fusillés, 22 440 Ploufragan, France

^e Laboratory of Gene Technology, Department of Biosystems, KU Leuven, 3001 Heverlee, Belgium

^f R & D Department, Eliava Institute of Bacteriophages, 3 Levan Gotua St, Tbilisi, Georgia

^g Department of Morphology and Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Institute for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liège, Quartier Vallée 2, Avenue Cureghem 6, B-4000 Liège, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 January 2020

Received in revised form 1 April 2020

Accepted 4 June 2020

Available online 6 July 2020

Keywords:

Phage therapy
Staphylococcus aureus
Bovine mastitis

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to assess the efficacy of lytic bacteriophages on *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis, by in vitro and in vivo assays using *Galleria mellonella* and murine mastitis models.

Methods: Between May and December 2016, ten *S. aureus* (five methicillin-resistant and five methicillin-sensitive) isolates were isolated from milk samples of cattle with mastitis in Belgium and Norway. The isolates were assessed in vitro for their susceptibility to four lytic bacteriophages (Romulus, Remus, ISP and DSM105264) and subsequently in vivo in *G. mellonella* larvae and in murine mastitis model.

Results: Romulus, Remus and ISP showed a lytic activity against the *S. aureus* isolates in vitro. A larvae survival rate below 50% was observed at 4 days post-inoculation (DPI) in the groups infected with a methicillin-sensitive *S. aureus* isolate and treated with these three phages in vivo. An incomplete recovery of the mouse mastitis was observed at 48 h post-inoculation (HPI) in the groups infected and treated with the ISP phage in vivo.

Conclusions: The observations are much more pronounced statistically between the infected- phosphate buffered saline (PBS)-treated and infected-phage-treated groups in *G. mellonella* and the murine mastitis model demonstrating an effect of the phages against *S. aureus* associated with bovine mastitis.

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Antimicrobial Chemotherapy. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Staphylococcus aureus is responsible for several infections in humans and animals and represents an important hazard in public health. In humans, it is responsible for a range of illnesses from mild skin disorders to invasive infections and life-threatening in hospital settings [1]. It can also be community-acquired, causing skin and soft tissue infections with moderate to

severe symptoms in healthy and younger people [2]. In animals, *S. aureus* infections impact livestock, companion animals and some wild animals [3,4].

Besides their virulence properties, *S. aureus* can also acquire genes conferring resistance to different antimicrobials. The most widespread and frequent resistant strains are methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) that are resistant to all β -lactams [5]. In the case of bovine species, livestock-associated MRSA causes subclinical and clinical mastitis which can lead to high financial costs [6,7]. To avoid the continuous selection pressure for development and dissemination of antimicrobial resistance by antimicrobial treatment procedures, one strategy could be the use of bacteriophages rather than traditional antimicrobials.

¹ Current address: Flanders Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food (ILVO), Technology and Food Science, Agricultural Engineering, Burg. Van Gansberghelaan 115 Bus 1, 9820 Merelbeke, Belgium.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.020>

2213-7165/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Antimicrobial Chemotherapy. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Table 1
Antibiotic profile of the ten *S. aureus* strains.

ID	Origin	Strain	Cefoxitin	Ampicillin	Amoxicillin +CA	Ciprofloxacin	Clindamycin	Colistin	Erythromycin	Flortefencol	Centamicin	Lizenoïd	Penicillin	Sulfamycin	Sulfa-Trim	Trimethoprim	Tetracycline	Resistance	Multi resistance	
MRSA	Flanders Wallonia	Ani_LG_111	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	7	Yes	
		Ani_LG_017	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	8	Yes
		Ani_LG_020	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	7	Yes
		Ani_LG_027	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	8	Yes
MSSA	Flanders Wallonia Norway	Ani_LG_010	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	8	Yes	
		Ani_LG_110	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	No
		Ani_LG_117	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	No
		Ani_LG_028	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	No
		Ani_OS_001	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	No
		Ani_OS_002	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	No

CA, clavulanic acid; ID, identification; MRSA, methicillin resistant *S. aureus*; MSSA, methicillin sensitive *S. aureus*; R, resistant; S, susceptible.

Bacteriophages are viruses able to infect and replicate within bacteria after injection of their genetic material [8]. They are functionally classified into strictly lytic and temperate phages. These strictly lytic phages are of interest for therapy [9]. To assess the potential of phage therapy, studies generally rely on in vitro or in vivo approaches using mammalian models. The lack of realistic conditions of in vitro assay, the expensive costs and the ethical requirements for in vivo models have led to the use of alternative models such as *G. mellonella* larvae [10]. In this study, the efficacy of lytic bacteriophages on *S. aureus* isolated from cows with mastitis in Belgium and Norway was assessed in vitro and in vivo with *G. mellonella* and murine mastitis models.

2. Methods

2.1. Bacterial and bacteriophage selection

Ten *S. aureus* isolates including five MRSA and five methicillin sensitives (MSSA) were isolated in Belgium and Norway between May and December 2016 from quarter milk samples of cows with clinical or subclinical mastitis and stored at -80°C with 50% (v/v) glycerol until further use (Table 1). Four well-defined lytic bacteriophages were used: Romulus, Remus, ISP [11,12] and DSM105264 (phage K) [13].

2.2. Phage preparation

The four phages were amplified using the *S. aureus* PS47 (NCTC 8325) strain for Romulus, Remus and ISP phages, and the *S. aureus* DSM105272 (DSMZ) strain for the DSM105264 phage, as propagation strains. Phage lysates (100 μL) were added to 5 mL of the propagation strain culture [optical density (OD_{600}) = 0.2–0.3] in Lennox broth (LB; Alfa Aesar, UK) [complemented with 1 mM of calcium chloride (CaCl_2) and magnesium sulfate (MgSO_4)] and incubated at 37°C , with shaking at 100 revolutions/min (rpm) until the solution became transparent. Then, this solution was added again to 500 mL of bacterial culture (with OD_{600} = 0.2–0.3) and incubated overnight at 37°C with shaking at 100 rpm. After addition of 1/20 of chloroform and incubation at 37°C for 10 min with shaking at 100 rpm, the solutions were placed at 4°C until the chloroform fraction separated. The solutions were then centrifuged at 4°C and 4600 rpm for 30 min and the supernatants were filtered through a superposed filter of 0.45 μm and 0.22 μm . Phage titration was performed in triplicate on a bacterial overlay of the propagation strain (OD_{600} 0.2–0.3) spread on an LB agar plate (Applichem, Germany). To obtain high concentrated phage solutions, a polyethylene glycol (PEG) precipitation was performed [14]. After centrifugation (4600 rpm for 40 min at 4°C), the pellets resulting from 50 mL of phage lysate were re-suspended in 1 mL of phage buffer [10 mM Tris-hydrochloride (HCl), 10 mM MgSO_4 , 150 mM NaCl, pH7.5] and stored at 4°C until further use.

2.3. In vitro assays

2.3.1. Host spectrum and efficiency of plating

Ten mastitis-causing *S. aureus* isolates were screened for their susceptibility to the four phages (Romulus, Remus, ISP and DSM105264) on LB agar by the 'spot-on method' after serial dilutions [15]. Lysis were recorded as no lysis (–), semi-confluent lysis (SCL) or confluent lysis (CL). The efficiency of plating (EOP) was then calculated (Table 2) [16].

2.3.2. Phage activity in LB

A total of 100 μL of the bacterial suspension at 10^6 colony-forming units (CFUs)/mL and 100 μL of the phages (Romulus, Remus, ISP, mix of the three latter phages or DSM105264) at 10^9

Table 2
Host spectrum test and EOP.

ID	Origin	Strain	Romulus		Remus		ISP		DSM_105264	
			Lysis	EOP	Lysis	EOP	Lysis	EOP	Lysis	EOP
MRSA	Flanders	Ani_GT_111	-	/	-	/	-	/	-	/
	Wallonia	Ani_LG_017	-	/	-	/	CL	6.80E-01	-	/
		Ani_LG_020	-	/	-	/	CL	9.10E-01	-	/
		Ani_LG_027	-	/	-	/	CL	1.10E+00	-	/
		Ani_LG_010	-	/	-	/	CL	6.80E-01	-	/
MSSA	Flanders	Ani_Gt_110	-	/	SCL	5.30E-01	CL	1.30E+00	-	/
		Ani_Gt_117	-	/	SCL	1.10E-01	CL	3.30E-01	-	/
	Wallonia	Ani_Lg_028	-	/	SCL	7.40E-01	CL	4.50E-01	-	/
	Norway	Ani_Os_001	CL	3.57E+00	CL	1.90E-01	CL	1.30E+00	-	/
		Ani_OS_002	-	/	-	/	CL	9.10E-01	-	/

CL, confluent lysis; EOP, efficiency of plating; ID, identification; MRSA, methicillin resistant *S. aureus*; MSSA, methicillin sensitive *S. aureus*; SCL, semi-confluent lysis.

plaque-forming units (PFUs)/mL were added to 4 mL of LB broth (complemented with 1 mM of CaCl₂ and MgSO₄) in triplicates. A positive control containing 4 mL of LB broth with 100 µL of bacteria and negative controls with 4 mL of LB broth only or LB broth + 100 µL of phage were also tested. The broth was incubated for 24 h at 37 °C with shaking at 100 rpm and lysis was followed by measuring the OD₆₀₀ of the solutions every 3 h.

2.4. In vivo assays

2.4.1. *G. mellonella* larva model

Larvae of *G. mellonella* were obtained from 'La tourterelle des bois' (Comines-Warneton, Belgium) and stored at 4 °C for a maximum of 1 week. The larvae were inoculated into the haemolymph behind the last right and/or left proleg by using a 30-gauge (G) insulin syringe (U-100) from BD Micro-Fine™ (Franklin Lakes, NJ, USA).

2.4.1.1. Preliminary experiments. Based on the in vitro assay results, one mastitis-causing *S. aureus* isolate (Ani_OS001) was chosen for a first preliminary experiment to assess infectivity. An aliquot of 10 µL of the bacterium was inoculated in three groups (A, B, C) of ten larvae, each at different bacterial titres (A = 10⁶ CFUs/10 µL, B = 10⁴ CFUs/10 µL, C = 10² CFUs/10 µL). Another group (D) of ten larvae was inoculated with 10 µL of PBS and served as a negative control. The mortality rate of the larvae was followed until 4 days post-inoculation (DPI) to choose the optimal titre of isolate Ani_OS001 that would kill at least 75% of the larvae at DPI 4. During a second preliminary experiment, four other groups (E, F, G, H) of ten larvae each were inoculated with isolate Ani_OS001 at the optimal titre and with different concentrations of gentamicin (Sigma-Aldrich, Germany) (E = 2.5 µg/10 µL, F = 5 µg/10 µL, G = 7.5 µg/10 µL, H = 10 µg/10 µL) to choose the concentration that would give 100% of larva survival at DPI 4.

2.4.1.2. Phage efficacy assessment. The first principal experiment consisted of the inoculation of isolate Ani_OS001 at the optimal

titre (10⁴ CFUs/10 µL) with and without phages (Romulus, Remus and/or ISP) at the multiplicity of infection (MOI) 1000, performed in triplicate. The gentamicin (7.5 µg/10 µL) and the PBS were also inoculated as positive and negative controls, respectively (Table 3). Bacteria and treatments were inoculated 1 h apart. Mortality rate was followed for 4 DPI and surviving larvae were sacrificed at DPI 4.

In parallel, independent groups of ten larvae (inoculated as described) were blended at DPI 2 and DPI 4, respectively, to assess the evolution of the bacterial and phage titres over time. A 10× phosphate-buffered saline (PBS) dilution of the blended suspension of each larvae group was spotted (10 µL) in triplicate on Chapman agar (selective for staphylococci; VWR, Belgium) to assess the bacterial titres. The same dilutions were spotted on LB agar to estimate the phage titre after addition of 100 µL of lysostaphin (to lyse the staphylococci; 0.1 mg/mL; Sigma-Aldrich, Belgium), incubation at 37 °C for 1 h, centrifugation at 46 000 rpm for 45 min and filtration at 0.2 µm.

2.4.2. Murine mastitis model

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee of the University of Liège (approval number 14-1719) and the experiments were conducted in a biosafety level 3 laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Liège. Female BALB/cJrj specific-pathogen-free (SPF) mice (Janvier, Saint Berthevin Cedex, France) of approximately 30 g were used at 13 days of lactation. The pups were removed and euthanised just before inoculation of the mammary glands. The fourth abdominal mammary glands pair (left and right) were inoculated using a 30-G insulin syringe (U-100 from BD Micro-Fine™, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.4.2.1. Preliminary experiment. The Ani_OS001 strain and the ISP phage (chosen based on its in vitro lytic activity) were assessed, respectively, for their infectivity and for their safety. Three groups (A', B', C') of four mice each were inoculated (50 µL) with 10⁵ CFUs of Ani_OS001 (inoculum titre based on previous results, data not shown), 10⁸ PFU of ISP phage and PBS (negative control),

Table 3
Experimental design of the phage efficacy assessment in *G. mellonella* larvae performed in triplicate.

Groups ^a	S	S_ROM	S_REM	S_ISP	S_MIX	S_Gent	ROM	REM	ISP	Gent	PBS
Bacteria (10 ⁴ CFUs/10 µL)	×	×	×	×	×	×					
Phage (10 ⁷ PFUs/10 µL)		×	×	×	×		×	×	×		
Gentamicin (7.5 µg/10 µL)						×				×	
PBS	×						×	×	×	×	2×

^a S, bacteria and PBS; S_ROM, bacteria and Romulus; S_REM, bacteria and Remus; S_ISP, bacteria and ISP; S_MIX, bacteria and the mix of the phages Romulus, Remus and ISP; S_Gent, bacteria and Gentamycin; ROM, Romulus and PBS; REM, Remus and PBS; ISP, ISP and PBS; Gent, Gentamycin and PBS; PBS, PBS 2 times; ×, 10 µL of inoculum.

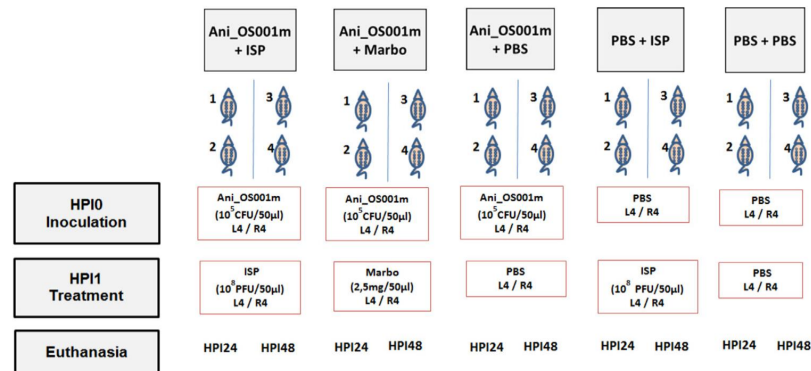


Fig. 1. Experimental design of the phage efficacy assessment in a murine mastitis model. HPI, hour post-inoculation; L4/R4, left/right fourth abdominal mammary gland pair; Marbo, marbofloxacin.

respectively, in one experiment. One hour post-inoculation (HPI 1), all the mice were further inoculated with 50 μL of PBS. Two mice were euthanised in each group after 24 h (HPI 24) and 48 h (HPI 48) post-inoculation, respectively, their blood was collected and their mammary glands were dissected for histopathological analysis then blended with a Tissue lyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for bacterial counts. The *S. aureus* strain (Ani_OS001m) resulting from the preliminary experiment was purified and used as an inoculum for the phage efficacy assessment. The mouse presenting an infection with the highest bacterial titre was selected to isolate the strain (Ani_OS001m) to be used for the main experiment in order to maximise the infection success.

2.4.2.2. Phage efficacy assessment. The strain Ani_OS001m was used in one experiment after being checked phenotypically (antimicrobial profile) and genetically (whole genome sequencing) (Fig. 1). Five groups of four mice were used and 1 h was left between two inoculations in the same mammary gland. Marbofloxacin (antibiotic) and the PBS were used, respectively, as positive and negative treatment controls. The mammary glands were dissected and blended for bacterial and phage counting at HPI 24 and HPI 48 after dilutions in the PBS as described. The blood was also collected for bacterial and phage titrations.

2.4.2.3. Mammary gland gross pathology and histopathology. The mammary glands were observed for gross pathology using a score from 1 (no inflammation) to V (severe inflammation) [17]. Then, small samples were fixed in 4% buffered paraformaldehyde, dehydrated with ethanol, cleared with xylene and embedded in paraffin for histopathological studies. Tissue sections of 4-μm thickness were stained with haematoxylin and eosin (H&E), and examined by light microscopy at different magnifications. Each sample was evaluated for the presence of necrosis, lymphocytic inflammation, inflammatory cells (polymorphonuclear neutrophils, granulocytes) and bacteria with a score from 0 (absent) to 4 (severe) [17].

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed on *in vivo* data with GraphPad Prism8, (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Kaplan–Meier survival curves and log-rank (Mantel–Cox) tests were performed to analyse the *G. mellonella* larva survival curves. Bonferroni's multiple comparisons test was used to compare the variations of bacterial and phage titres inside *G. mellonella* larvae and murine mammary glands.

2.6. Whole genome sequencing comparison of Ani_OS001 and Ani_OS001m

Staphylococcus aureus DNA was extracted from one colony of Ani_OS001 and one colony of Ani_OS001m (recovered from the mouse model preliminary experiment) using a protocol based on lysostaphin followed by chloroform/isoamyl alcohol extraction. Genomic libraries were prepared according to the manufacturer's instructions using the Nextera XT DNA library preparation kit and sequenced by the NovaSeq 6000 Sequencing System (Illumina, San Diego, CA, USA). The raw reads sequences were assembled into contigs with the pipeline shovill 1.0.4 including trimmomatic 0.38 for the cleaning and annotated using Prokka 1.13.3 [18]. The comparison was performed by alignment of Ani_OS001m reads on Ani_OS001 shovill assembly using bwa and VarScan variant calling (-varFreq option set to 0.6 to ensure majority variants) [19].

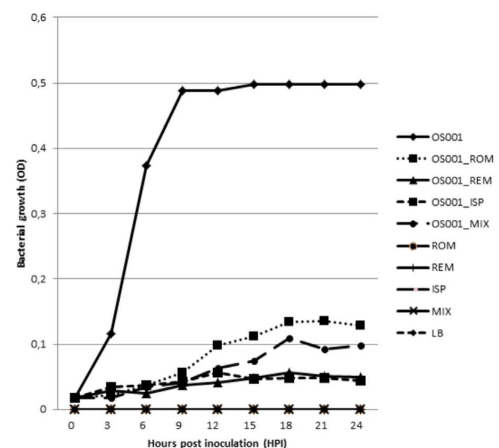


Fig. 2. Activity of the phages on Ani_OS001 in LB broth. OD₆₀₀, optical density at 600 nm; OS001, Ani_OS001 and LB broth; OS001_ROM, Ani_OS001, Romulus and LB broth; OS001_REM, Ani_OS001, Remus and LB broth; OS001_ISP, Ani_OS001, ISP and LB broth; OS001_MIX, Ani_OS001, the mix of the phages (Romulus, Remus and ISP) and LB broth; ROM, Romulus and LB broth; REM, Remus and LB broth; ISP, ISP and LB broth; MIX, mix of phages and LB broth; LB, LB broth only.

3. Results

3.1. In vitro assay

CL and SCL were observed on LB agar for four MRSA and five MSSAs with the phages Romulus, Remus and/or ISP (Table 2). Conversely, no lysis was observed with the phage DSM105264. High EOP (>1) were observed for two MSSAs (Ani_OS001 and Ani_GT110) and one MRSA (Ani_LG027). The Ani_OS001 isolate that was lysed by the three phages was therefore chosen for the *G. mellonella* experiments.

The same three phages, alone or together, had efficient lytic activities on Ani_OS001 isolate in LB broth compared with positive and negative controls (Fig. 2).

3.2. In vivo experiments

3.2.1. *G. mellonella* model

After inoculation of the larvae with the Ani_OS001 isolate, 100% mortality was observed in group A, 80% in group B and 40% in group C at DPI 4 during the first preliminary experiment (determination of the infectious dose). In the second preliminary experiment (determination of the therapeutic dose of gentamicin) 30% of survival was observed in group E, 70% in group F and 100% in groups G and H at DPI 4. Based on these results, 10^4 CFUs/ $10 \mu\text{L}$ (group B) and $7.5 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ (group G) were chosen as the optimal bacterial infectious dose and optimal gentamicin therapeutic dose, respectively, for subsequent experiments.

During the principal experiment, a 10% survival rate was observed in the larvae inoculated with Ani_OS001 isolate and PBS, whereas 90% of the larvae inoculated with Ani_OS001 isolate and gentamicin survived at DPI 4. Survival rates at DPI 4 ranged from 20% to 35% in the groups inoculated with Ani_OS001 isolate and the phages (Romulus, Remus, ISP or the mix of the three phages) (Fig. 3).

High *S. aureus* titres (5×10^{11} CFUs/mg and 2×10^{12} CFUs/mg) were obtained at DPI 2 and DPI 4, respectively, from the blended larvae inoculated with Ani_OS001 isolate and PBS. These titres were lower than the larvae inoculated with Ani_OS001 and phage(s) (Fig. 4A). The phage titres increased between DPI 2 and DPI 4 in the larvae inoculated with Ani_OS001 isolate and stayed very stable in the groups inoculated only with the phage(s) (Fig. 4B).

3.2.2. Murine mastitis model

3.2.2.1. Preliminary experiment. Mammary gland inflammations were observed in group A' with a bacterial titre up to 4.2×10^4 CFUs/mg at HPI 48, whereas neither inflammation nor infection

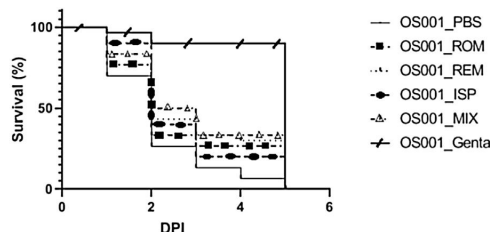


Fig. 3. Kaplan–Meier survival curves of *G. mellonella* larvae. OS001_PBS, Ani_OS001 and PBS; OS001_ROM, Ani_OS001 and Romulus; OS001_REM, Ani_OS001 and Remus; OS001_ISP, Ani_OS001 and ISP; OS001_MIX, Ani_OS001 and the mix of Romulus, Remus and ISP; OS001_Genta, Ani_OS001 and gentamicin; DPI, days post-inoculation.

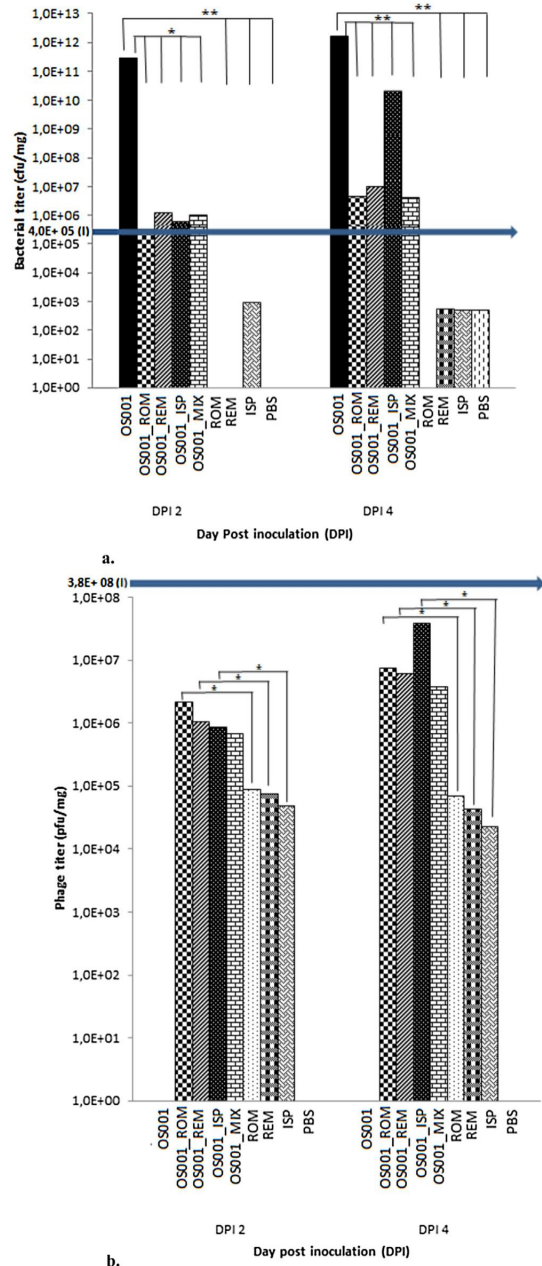


Fig. 4. (A) Bacterial titres in blended *G. mellonella* larvae.^a (B) Phage titres in blended *G. mellonella* larvae.^a OS001_PBS, Ani_OS001 and PBS; OS001_ROM, Ani_OS001 and Romulus; OS001_REM, Ani_OS001 and Remus; OS001_ISP, Ani_OS001 and ISP; OS001_MIX, Ani_OS001 and the mix of the phages Romulus, Remus and ISP; ROM, Romulus and PBS; REM, Remus and PBS; ISP, ISP and PBS; PBS, PBS 2 times; DPI, days post-inoculation; I, inoculum titre; statistically significant difference between values (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (determined by Bonferroni multiple comparison test)).

Table 4
Results of the preliminary experiment (mice model).^a

Groups	Mean bacterial titres of the blended mammary glands (CFUs/mg)		
	A(Ani_OS001 + PBS)	B(ISP + PBS)	C(PBS + PBS)
HPI24	2.80E+04	0.00E+00	0.00E+00
HPI48	4.20E+04	0.00E+00	0.00E+00

^a HPI, hour post-inoculation.

was present in the groups B' and C' (Table 4). No bacterial infection was detected in the mouse blood.

3.2.2.2. Main experiment. At necropsy, gross pathology scores were established for the 40 mammary glands of the 20 mice (Fig. 5). Score values of III and V with redness and slimy exudate of the gland were observed in the mammary glands inoculated with Ani_OS001m isolate and PBS, whereas the mammary glands inoculated with Ani_OS001m isolate and the ISP phage had score values of II and III with slightly red glands. The other three groups of mice had score values between I and II with very little redness of the glands.

Histopathology was performed on the 40 mammary glands and an average score was established for each group (Fig. 6). The group

inoculated with Ani_OS001m isolate and PBS had severe tissue necrosis and high numbers of polymorphonuclear neutrophils (PMN), lymphocytes and bacteria. In the group inoculated with Ani_OS001m isolate and ISP phage, the lesions were moderate and in the three others groups, they were very weak with no bacteria and no tissue necrosis. Moderate amounts of macrophages were also present in all mice.

A high bacterial titre was observed in the blended mammary glands of the group inoculated with Ani_OS001m isolate and PBS at HPI 24 and HPI 48, whereas a progressive decrease of the bacterial titres was observed between HPI 24 and HPI 48 in the group inoculated with Ani_OS001m isolate and ISP phage. A drastic decrease was observed in the group inoculated with Ani_OS001m isolate and treated with marbofloxacin at HPI₂₄ leading to the absence of bacterial detection at HPI 48. No bacterial growth was observed in the other two groups (Fig. 7A, Table 5). No bacteria or phages were detected in the mouse blood.

A progressive decrease of the phage titres was observed between HPI 24 and HPI 48 in the two groups inoculated with phage. The decrease of the phage titre was more rapid and drastic in the group inoculated with Ani_OS001m isolate and ISP phage leading to the absence of phage detection at HPI₄₈ than in the group inoculated with ISP phage and PBS (Fig. 7B, Table 5). No phage was detected in the other three groups.

Group	Number of mammary glands										
	OS001_PBS		OS001_ISP		OS001_Marbo		ISP_PBS		PBS_PBS		
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	
HPI											
I					3	4	4	4	4	4	
II			2	1	1						
III	2		2	3							
IV	2	1									
V		3									
Total	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	




Fig. 5. Gross pathology of the mammary glands. OS001_ISP, Ani_OS001m and the ISP phage; OS001_Marbo, Ani_OS001m and marbofloxacin; OS001_PBS, Ani_OS001m and PBS; ISP_PBS, ISP phage and PBS; PBS_PBS, PBS twice, HPI, hour post-inoculation. Clinical score: I, no inflammation; II, mild inflammation; III, moderate inflammation; IV, highly moderate inflammation; V, severe inflammation.

Group	OS001_PBS				OS001_ISP				OS001_Marbo				ISP_PBS				PBS_PBS			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Observation																				
0										x		x	x	x		x		x	x	x
1											x									
Score			x		x		x	x			x				x					x
3							x													
4	x	x		x																

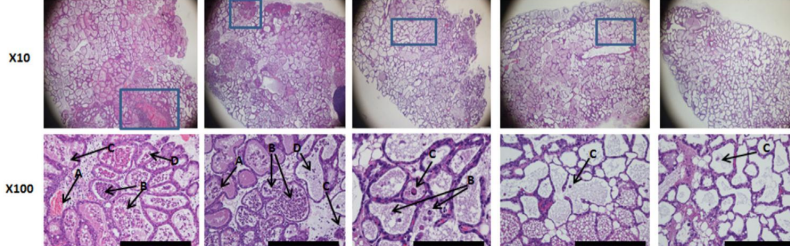


Fig. 6. Mammary gland histopathology. OS001_ISP, Ani_OS001m and ISP phage; OS001_Marbo, Ani_OS001m and marbofloxacin; OS001_PBS, Ani_OS001m and PBS; ISP_PBS, ISP phage and PBS; PBS_PBS, PBS twice, A, tissue necrosis (degeneration); B, polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and lymphocytes; C, macrophages; D, bacteria; Score: 0, absent, 1, minimal, 2, mild, 3, moderate, 4, severe. 10×, ten-fold magnification; 100×, 100-fold magnification.

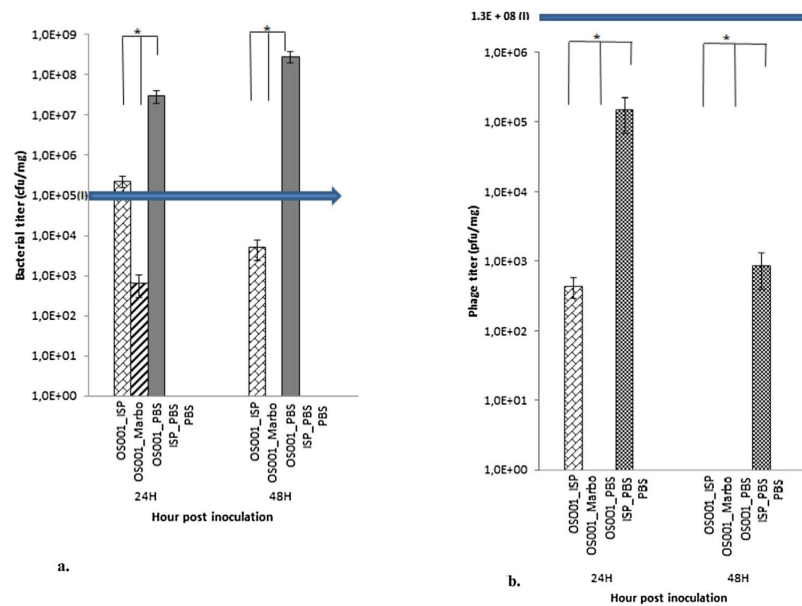


Fig. 7. (A) Mean of the bacterial titres in the mammary gland.^a (B) Mean of the phage titres in the mammary gland.^a ^aOS001_ISP, Ani_OS001m and the ISP phage; OS001_Marbo, Ani_OS001m and marbofloxacin; OS001_PBS, Ani_OS001m and PBS; ISP_PBS, ISP phage and PBS; PBS, PBS twice. Each bar on the graphs represents the mean of the bacterial or phage titres in four mammary glands (two mice per group). I, Inoculum; statistically significant difference between values [^a $P < 0.05$ (determined by Bonferroni multiple comparison test)]. Error bars represent standard error.

Table 5

Results of the phage efficacy assessment in murine mastitis model.^a

Groups	OS001_ISP				OS001_Marbo				OS001_PBS				ISP_PBS				PBS_PBS			
	HPI 24		HPI 48		HPI 24		HPI 48		HPI 24		HPI 48		HPI 24		HPI 48		HPI 24		HPI 48	
Mice	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20
Bacterial titres (CFU/mg)	L4	2.10E+03	1.43E+03	-	-	2.63E+03	-	-	4.30E+06	6.25E+06	6.89E+08	3.71E+07	-	-	-	-	-	-	-	-
	R4	5.66E+05	3.28E+05	-	2.03E+04	-	-	-	2.42E+07	8.35E+07	3.24E+08	7.09E+07	-	-	-	-	-	-	-	-
Phage titres (PFU/mg)	L4	3.39E+02	1.17E+03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.83E+05	1.31E+02	1.39E+02	-	-	-	-	-
	R4	-	2.31E+02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.39E+03	1.93E+02	-	-	-	-	-

^a OS001_ISP, Ani_OS001m and the ISP phage; OS001_Marbo, Ani_OS001m and marbofloxacin; OS001_PBS, Ani_OS001m and PBS; ISP_PBS, ISP phage and PBS; PBS_PBS, PBS twice; M, mouse; L4/R4= Left and right fourth abdominal mammary gland pair; -, no bacterial or phage titre; HPI, hour post-inoculation.

3.2.3. Statistical analysis

A significant difference was observed between the survival curves of the infected-gentamicin-treated, on the one hand, and the infected-phage-treated and infected-PBS-treated *G. mellonella* larvae groups, on the other hand, as determined by log-rank (Mantel Cox) test ($P < 0.0001$). A significant difference was also detected between the bacterial titres of the infected-PBS-treated and the infected-phage-treated larva groups as determined by the Bonferroni multiple comparison test ($P < 0.05$). This test also showed a higher significant difference between the bacterial titres of the infected-PBS-treated and the non-infected larva groups ($P < 0.01$). In the murine mastitis model, the Bonferroni multiple comparison test showed a significant difference between the bacterial titres of the infected-PBS-treated and the infected-phage-treated mammary glands ($P < 0.05$). In both *G. mellonella* and mouse models, a

significant difference ($P < 0.05$) was observed between the phage titres of the infected-phage-treated and the 'non-infected'-phage-treated groups.

3.2.4. Genome comparison of Ani_OS001 and Ani_OS001m

The draft genome of Ani_OS001 and Ani_OS001m are available from GenBank, accession numbers VVKU01000000 and VVKV01000000, respectively. The VarScan analysis revealed only two single polymorphism nucleotide (SNPs) between the two strains. One is associated with a region without any annotation according to Prokka (position 25 of contig OS001-00027 C → T). The second SNP (G → T) occurred in position 60 157 of contig OS001-00001. The Prokka annotation revealed *SdrE*, a gene coding for a member of the microbial surface components recognizing adhesive matrix family molecule (MSCRAMM). This mutation resulted in a G899V mutation at the protein level.

4. Discussion and conclusions

This study highlights the therapeutic potential of bacteriophages against *S. aureus* associated with bovine mastitis by the in vitro assessment of the phage activities and the in vivo assessment of the phage efficacy in *G. mellonella* and murine mastitis models.

Different lytic activities were observed on ten *S. aureus* isolates: the phage Romulus was active against only one isolate, the phage Remus against four isolates and the phage ISP against nine isolates. In previous studies, the Romulus and Remus phages were active against more isolates tested (70%) [11], whereas the lytic activity of the ISP phage was observed against a similar percentage (87%) of the tested *S. aureus* isolates, including MRSA [12,20]. Conversely, none of the ten isolates tested was susceptible to the DSM105264 phage, although it was demonstrated to be active against ca. half of the previously tested isolates (human strains) [13]. The difference of the susceptibility observed could be explained by the difference of the *S. aureus* origins (bovine vs. human).

The lytic activities of the three different phages against the Ani_OS001 *S. aureus* strain in broth medium confirm the results observed on agar medium. However, a higher efficiency has been observed for the phages ISP and REM compared with those of the phage mix, itself more efficient than the phage ROM alone. As showed in the literature, the mix of phages usually leads to synergistic effect in vitro in terms of a broad host range [21,22]. This study showed a probable lower effect of the phages mix compared with those of individual phages when using them against the same bacteria.

In the *G. mellonella* model, using only the Ani_OS001 strain, no significant difference was observed between the survival rate of the infected-phage-treated and infected-PBS-treated larvae group, whereas this difference was significant in comparison to the infected-gentamicin-treated group. The higher bacterial titre observed at DPI 4 in the blended larvae (group OS001_ISP) with the ISP phage compared with those observed with Romulus and Remus, although its higher lytic activity in vitro can be explained by its initial adsorption and biofilm-degradation that are slower than those of Romulus and Remus phages [11]. Another explanation could be the occurrence of a mutation in the bacterial genome during the phage treatment making a part of the Ani_OS001 isolate population resistant to the ISP phage [23,24]. No SPF larvae exist, and natural carriage of *S. aureus* could affect the results of the blended larvae bacterial titres. The very weak impact of natural carriage on our results has been confirmed by the Bonferroni multiple comparison test showing a higher significant difference ($P < 0.01$) between the bacterial titres of larva groups with natural carriage (REM, ISP, PBS) compared with those of the infected-PBS-treated larva groups. Moreover, a decrease in phage titre was observed for the blended larvae at DPI 2 and DPI 4. This could be explained by the single dose of phages inoculated and their possible inactivation as demonstrated in recent studies where bacteriophages have been shown to be efficient in *G. mellonella* larvae after multiple inoculations in the presence of the bacteria and depending on the MOI [25,26]. The decrease of the phage titre observed in this study is slower in the infected-phage-treated groups compared with the 'non-infected'-phage-treated groups meaning that a simultaneous replication of the phage and bacteria occurred inside the larvae. This study reports for the first time results on lytic bacteriophages assessment on *S. aureus* in the *G. mellonella* model, whereas many other studies were already performed, but on other pathogen bacteria [10,25,27]. However, the results observed in this model need to be confirmed in other infectious models in mammals, such as in the murine mastitis model.

An increase of the virulence gene expression after a previous in vivo passage is often observed as reviewed by Angelichio and

Camilli [28]. In the murine mastitis model, Ani_OS001m showed a more efficient infection than Ani_OS001. The WGS of both strains revealed a mutation in the *SdrE* gene of Ani_OS001m. *SdrE* is presented as a key factor for *S. aureus* being invasive and has already been described in an *S. aureus* strain showing higher virulence in mastitis cases [29].

A reduction of the inflammation in mice mammary glands was obtained in the infected-phage-treated group compared with those observed in the infected-PBS-treated group with the strain Ani_OS001m. These observations have also been described in recent studies on the therapeutic assessment of phage against *S. aureus* in a murine mastitis model [17,30]. An increase of the bacterial titre (from 7×10^4 to 2×10^8 CFUs/mg) observed in the infected-PBS-treated group and a decrease of the bacterial titre (from 7×10^4 to 5×10^3 CFUs/mg) observed in the infected-phage-treated group highlight the efficacy of the phage against the *S. aureus* strain in the mice mammary glands, as already shown with other phages in previous studies [30,31]. Nevertheless, this phage efficacy was less important than the one obtained with antimicrobials in the murine model [17]. Moreover, a decrease of the phage titre was observed in the 'non-infected'-phage-treated group (from 1.3×10^8 to 9×10^2 PFUs/mg) and more drastically in the infected-phage-treated group (from 1.3×10^8 to 0 PFUs/mg), suggesting an elimination or a degradation of the phage in the mouse mammary gland. Studies show that the stimulation of the immune response (macrophages, serum complement system) is more important when bacteria are inoculated with phages in the mice mammary glands, which can explain the drastic decrease of the phage titre in the infected-phage-treated groups [17,23,32]. The intra-mammary route can be favourable to the phage inactivation by some proteins and lipids presents in the milk leading to a decrease of the phage titre in the mammary gland [23,33]. Conversely, no decrease of the phage titre was observed in the mice mammary glands showing moderate inflammation as described by Breyne et al. [17], who assessed a phage cocktail effect on *S. aureus* at MOI 10^5 . This contradiction with our study could be explained by the use of a single phage inoculation at a lower MOI (10^3), which would have been quickly eliminated.

This study highlights the lytic activity of three bacteriophages (Romulus, Remus and ISP) against *S. aureus* associated with bovine mastitis in vitro and their efficacy in vivo materialised by a larvae survival rate below 50% at DPI 4 in the groups infected and treated (with the three phages) and an incomplete recovery of the mouse mastitis at DPI 48 in the groups infected and treated (with the ISP phage). Moreover, significant differences were observed between infected-PBS-treated and infected-phage-treated groups in *G. mellonella* and murine mastitis model demonstrating an effect of the three phages against *S. aureus* associated with bovine mastitis. The weak efficacy of phage observed in vivo (low larvae survival rate, incomplete mammary gland recovery) could be related to the unique bacteriophage dose used, the ratio phage/bacteria (MOI), the role of the immune system and the route of inoculation as described in previous studies [32,34]. Further studies are required to assess these parameters in order to confirm the phage therapy efficacy against *S. aureus* causing bovine mastitis.

Funding

None.

Competing interests

None.

Ethical approval

Ethical Committee of the University of Liège (approval number 14-1719).

Acknowledgements

This work was supported by the ANIHW ERA-Net MRSA-BACTERIOPHAGE project. We thank M. Sarlet and Prof. D. Desmecht for the help in histopathological analysis. We also thank Dr F. Laforêt for her help in the statistical analysis.

References

- [1] McCarthy AJ, Lindsay JA. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host–pathogen interactions. *BMC Microbiol* 2010;10:173. doi:http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-173.
- [2] David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:616–87. doi:http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00081-09.
- [3] McCarthy AJ, Lindsay JA, Loeffler A. Are all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) equal in all hosts? Epidemiological and genetic comparison between animal and human MRSA. *Vet Dermatol* 2012;23:e53–4. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01072.x.
- [4] Petinaki E, Spiliopoulou I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection risks from companion animals: current perspectives. *Vet Med (Auckl)* 2015;6:373–82. doi:http://dx.doi.org/10.2147/vmr.s91313.
- [5] Arias CA, Barbara E, Murray MD. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century – a clinical super-challenge. *N Engl J Med* 2009;360:439–43. doi:http://dx.doi.org/10.1056/NEJMp0804651.
- [6] Yalcin C, Stott AW, Logue DN, Gunn J. The economic impact of mastitis-control procedures used in Scottish dairy herds with high bulk-tank somatic-cell counts. *Prev Vet Med* 1999;41:135–49.
- [7] Halasa T, Huijps K, Osterås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q* 2007;29:18–31. doi:http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224.
- [8] McGrath S, van Sinderen D. Bacteriophage: genetics and molecular biology. Cork: Caister Academic Press; 2007.
- [9] Salmond GPC, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:777–86. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3564.
- [10] Beeton ML, Alves DR, Enright MC, Jenkins ATA. Assessing phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* using a *Galleria mellonella* infection model. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:196–200. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.005.
- [11] Vandersteegen K, Kropinski AM, Nash JHE, Noben J-P, Hermans K, Lavigne R. Romulus and Remus, two phage isolates representing a distinct clade within the *Twortlikevirus* genus, display suitable properties for phage therapy applications. *J Virol* 2013;87:3237–47. doi:http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02763-12.
- [12] Vandersteegen K, Mattheus W, Ceyssens PJ, Bilocq F, de Vos D, Pirnay JP, et al. Microbiological and molecular assessment of bacteriophage ISP for the control of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2011;6:e24418. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024418.
- [13] Ajuebor J, Buttiner C, Arroyo-Moreno S, Chanishvili N, Gabriel EM, O'Mahony J, et al. Comparison of *Staphylococcus* phage K with close phage relatives commonly employed in phage therapeutics. *Antibiotics* 2018;7:37. doi:http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics7020037.
- [14] Sambrook J, Green M. 4th ed. Molecular cloning: a laboratory manual, vol. 1. New York: Cold Spring Harbor Press; 2012. doi:http://dx.doi.org/10.3724/SP.J.1141.2012.01075.
- [15] Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. In: Kropinski AM, editor. Bacteriophages methods protocols in public health. Guelph, Ontario: Humana Press; 2009. p. 81–5. doi:http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6.
- [16] Kutter E. Phage host range and efficiency of plating. *Methods Mol Biol* 2009;141:9. doi:http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6.
- [17] Breyne K, Honaker RW, Hobbs Z, Richter M, Zaczek M, Spangler T, et al. Efficacy and safety of a bovine-associated *Staphylococcus aureus* phage cocktail in a murine model of mastitis. *Front Microbiol* 2017;8:2348. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02348.
- [18] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014;30:2068–9. doi:http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153.
- [19] Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 2012;22:568–76. doi:http://dx.doi.org/10.1101/gr.129684.111.
- [20] Belleghem J, Van Deschaght P, Vergauwen B. Study of *Staphylococcus aureus* phage ISP and derived proteins potential use as antibacterial therapeutics and anti-inflammatory properties. Ghent: University of Ghent; 2012.
- [21] Manohar P, Tamhankar AJ, Lundborg CS. *Escherichia coli* Therapeutic characterization and efficacy of bacteriophage cocktails infecting, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* species. *Front Microbiol* 2019;10:1–12. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00574.
- [22] Costa P, Pereira C, Gomes ATPC, Almeida A. *Escherichia coli* Efficiency of single phage suspensions and phage cocktail in the inactivation of and *Salmonella typhimurium*: an in vitro preliminary study 2019. *Microorganisms* 2019;7:94. doi:http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms7040094.
- [23] Dabrowska K, Abedon ST. Pharmacologically aware phage therapy: pharmacodynamic and pharmacokinetic obstacles to phage antibacterial action in animal and human bodies. *Microbiol Mol Biol Rev* 2019;83:e00012–e19. doi:http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00012-19.
- [24] Azam AH, Tanji Y. Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019;103:2121–31. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-09629-x.
- [25] Manohar P, Nachimuthu R, Lopes BS. The therapeutic potential of bacteriophages targeting gram-negative bacteria using *Galleria mellonella* infection model. *BMC Microbiol* 2018;18:1–11. doi:http://dx.doi.org/10.1186/s12866-018-1234-4.
- [26] Jeon J, Park JH, Yong D. Efficacy of bacteriophage treatment against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in *Galleria mellonella* larvae and a mouse model of acute pneumonia. *BMC Microbiol* 2019;19:1–14. doi:http://dx.doi.org/10.1186/s12866-019-1443-5.
- [27] Thiry D, Passet V, Danis-włodarczyk K, Lood C, Wagemans J, De Sordi L, et al. New bacteriophages against emerging lineages ST23 and ST258 of *Klebsiella pneumoniae* and efficacy assessment in *Galleria mellonella* larvae. *Viruses* 2019;11:411. doi:http://dx.doi.org/10.3390/v11050411.
- [28] Angelichio MJ, Camilli A. Minireview: in vivo expression technology. *Infect Immun* 2002;70:6518–23. doi:http://dx.doi.org/10.1128/JAI.70.12.6518.
- [29] Gogoi-tiwari J, Williams V, Waryah CB, Costantino P, Al-salami H, Mathavan S, et al. Mammary gland pathology subsequent to acute infection with strong versus weak biofilm forming *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: a pilot study using non-invasive mouse mastitis model. *PLoS One* 2017;12:1–19. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0170668.
- [30] Iwano H, Inoue Y, Takasago T, Kobayashi H, Furusawa T, Taniguchi K, et al. Bacteriophage (SA012) has a broad host range against *Staphylococcus aureus* and effective lytic capacity in a mouse mastitis model. *Biology (Basel)* 2018;7:8. doi:http://dx.doi.org/10.3390/biology7010008.
- [31] Wang Z, Zheng P, Ji W, Fu Q, Wang H, Yan Y, et al. SLPW: a virulent bacteriophage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Front Microbiol* 2016;7:1–10. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00934.
- [32] Van Belleghem JD, Dąbrowska K, Vaneechoutte M, Barr JJ, Bollyky PL. Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system. *Viruses* 2019;11. doi:http://dx.doi.org/10.3390/v11010010.
- [33] Kay BD, Fildes P. The inactivation of a bacteriophage by a component of papain. *Biochem J* 1960;75:139–45.
- [34] Ly-Chatain MH. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Front Microbiol* 2014;5:51. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00051.

Discussion générale

1. IMPACT ÉCONOMIQUE DES MAMMITES BOVINES EN EUROPE

Selon EUROSTAT, avec une production de 158 215 000 tonnes de lait cru de vache en Europe en 2019, le lait représente l'une des principales denrées alimentaires et sources économiques du continent. Cependant, ce secteur est confronté à de nombreux problèmes ayant un impact négatif sur la production laitière et, par conséquent, provoquant d'importantes pertes économiques. Les mammites bovines dont la prévalence (cas cliniques et sub-cliniques) est de l'ordre de 30% en Belgique arrivent au premier rang de ces problèmes avec un impact financier estimé à 210 euros par cas clinique par an (Théron et al., 2011). En plus, pour chaque cas de mammite clinique, 15 à 40 cas de mammites sub-cliniques se produisent (Schroeder, 2012). Les pertes économiques observées sont le résultat d'une baisse de la production laitière, des pénalités infligées suite au nombre élevé de cellules somatiques dans le lait ($>4 \times 10^5$ cellules/ml mesuré en citerne), de l'abattage des vaches atteintes de mammites incurables et du traitement aux antibiotiques (Halasa et al., 2007; Stevens et al., 2016; Ashraf and Imran, 2018).

2. SOLUTIONS NON-ANTIBIOTIQUES DE LUTTE CONTRE LES MAMMITES BOVINES

Les conséquences alarmantes sur la santé publique telles que les antibiorésistances liées à l'utilisation des antibiotiques en élevage, et particulièrement pour le traitement des mammites bovines pousseront les éleveurs à avoir de plus en plus recours à des alternatives non-antibiotiques dans le futur (Ciorba et al., 2015; Leimbach, 2017). Plusieurs études ont été menées jusqu'ici dans le but d'évaluer les alternatives non antibiotiques contre les mammites bovines. Dans la plupart des cas, ces études se sont basées principalement sur des tests *in vitro* (Hamza et al., 2016; Carson et al., 2017; Pellegrino et al., 2019), avec pour moins de la moitié d'entre elles sur des essais *in vivo* (Klostermann et al., 2010; Yu et al., 2017; Iwano et al., 2018). Ces alternatives concernent principalement l'utilisation à titre préventif ou curatifs des probiotiques, des bactériocines, des bactériophages ou des enzymes de bactériophages (Angelopoulou et al., 2019). Les probiotiques sont des microorganismes vivants, qui, administrés en quantité adéquate, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO/WHO, 2001; Endersen et al., 2014). Ils sont efficaces principalement en prévention des mammites bovines suite à leur effets immuno-modulateurs et antibactériens (antagonistes), en application par trempage et/ou infusion intramammaire (Souza et al., 2018; Wallis et al., 2019). Les bactériocines telles que la lysostaphine et la nicine, quant à elles, sont des protéines synthétisées par des bactéries et actives contre d'autres bactéries (Cotter et al., 2005). Elles ont également été démontrées efficaces contre les mammites bovines en intervenant dans l'immuno-modulation et dans la lyse bactérienne et peuvent être appliquées par trempage, essuyage, lavage des mamelles et/ou infusion intramammaire (Ceotto-Vigoder et al., 2016; Malvisi et al., 2016). Des études récentes ont également montré que certaines enzymes produites par les bactéries, les hydrolases du peptidoglycane

(PGH) appelés « enzybiotiques » auraient une activité lytique sur les souches de *S. aureus*, même en milieu intracellulaire et pourraient être utilisées comme alternatives aux antibiotiques (Röhrig et al., 2020). Enfin, environ un tiers de la littérature sur les alternatives aux antibiotiques est à ce jour consacrée à l'utilisation des phages et des endolysines de phages dans la lutte contre les mammites bovines par leur effet antibactérien (lyse bactérienne) en test *in vitro* et en modèle murin (Zhou et al., 2017; Iwano et al., 2018; Angelopoulou et al., 2019).

3. PHAGOTHÉRAPIE DES MAMMITES BOVINES

Ce travail, à travers son objectif principal qui était d'évaluer l'utilisation thérapeutique des bactériophages en tant qu'alternative de lutte contre les mammites bovines dues à *S. aureus*, vient s'ajouter à la liste des études précédentes afin de renforcer les connaissances dans le domaine de la phagothérapie des mammites bovines.

Tout comme les études précédentes, cette étude a montré que l'utilisation des phages contre les bactéries responsables de mammites bovines permet une réduction de l'inflammation des mamelles dans le modèle murin, tout en empêchant la prolifération des bactéries à l'intérieur de la mamelle. Par contre, en ce qui concerne le devenir des phages à l'intérieur de la mamelle, des divergences sont présentes d'une étude à une autre. Certaines études (O'Flaherty et al., 2005; Wills et al., 2005; Breyne et al., 2017) montrent une augmentation exponentielle du titre en phages dans la mamelle par rapport à celui initialement inoculé. Il s'ensuit également pour la plupart de ces études une diminution du nombre de cellules somatiques (CS) dans le lait accompagnant la diminution visuelle de l'inflammation. D'autres, par contre, tout comme la nôtre (Gill et al., 2006; Capparelli et al., 2007; Iwano et al., 2018) montrent une diminution du titre de phages dans les mamelles s'accompagnant d'un nombre de CS dans le lait restant élevé. Ce qui pourrait s'expliquer principalement soit par l'action du système immunitaire (ex : macrophage) responsable de leur dégradation, soit par l'action des protéines et graisses du lait se fixant à la surface de la bactérie et empêchant leur liaison avec le phage (inactivation). De plus, certaines bactéries comme *S. aureus* vont s'agrèger lors de leur présence dans du lait ou du lactosérum, ce qui pourrait également leur conférer une certaine protection contre les phages (O'Flaherty et al., 2005). Les différences observées entre les études pourraient être liées soit à la phase de lactation des animaux (souris/vaches), soit voie d'administration des phages (infusion, trempage, injection intramammaire), soit à la concentration et la composition des phages (cocktail ou phage unique), soit à la durée d'inoculation (Basdew and Laing, 2011). Les différences se situent aussi au niveau de l'agent pathogène responsable de mammitte ayant fait l'objet des études. En effet, une étude (Bai et al., 2013) a permis d'isoler à partir du lait de vache atteinte de mammites un phage montrant une lyse *in vitro* contre *Str. agalactiae*, agent majeur de mammites bovines. D'autres études (Porter et al., 2016; V. Da Silva Duarte et al., 2018) ont permis de mettre en évidence respectivement *in vitro* et *in vivo* (modèle murin) l'efficacité des phages isolés à partir de lait de vaches contre les

souches d'*E. coli* responsables de mammites bovines. L'action des phages a été également démontrée contre la formation de biofilm chez les *Trueperella pyogenes* responsables de mammites bovines (Da Silva Duarte et al., 2018). Néanmoins, la grande majorité des études, tout comme la nôtre, se sont focalisées sur les staphylocoques, et particulièrement *S. aureus*, principal agent des mammites bovines (García et al., 2009; Dias et al., 2013; Ganaie et al., 2018).

Les études sur l'évaluation de la phagothérapie contre les souches de *S. aureus* responsables de mammites bovines se sont basées jusqu'ici essentiellement sur les tests *in vitro* en majorité (Dias et al., 2013; Tahir et al., 2017), mais également sur les tests *in vivo* en modèle murin (Schmelcher et al., 2015; Iwano et al., 2018; V. Da Silva Duarte et al., 2018). A notre connaissance, cette étude est la première en ce qui concerne l'utilisation du modèle *G. mellonella* pour l'évaluation de l'efficacité des phages sur les souches *S. aureus* responsables de mammites bovines. La combinaison des modèles *G. mellonella* et murins dans cette étude a permis d'avoir une meilleure précision dans les résultats et surtout de réduire le nombre de souris à utiliser pour le modèle *in vivo* murin.

La plupart des études récentes sur l'évaluation de la phagothérapie des mammites bovines ont utilisé le modèle de mammite murine qui reflète au mieux la situation observée chez les bovins (Schmelcher et al., 2015; Iwano et al., 2018). Malgré les différences pouvant exister entre les glandes mammaires de ruminants et de rongeurs, la fiabilité, la reproductibilité ainsi que les avantages économiques du modèle de mammite murine ont été démontrés par plusieurs études (Brouillette and Malouin, 2005; Zhao et al., 2015). Cependant, certaines contraintes liées à l'acquisition (coût) et la mise en pratique (protocole éthique, suivi) du modèle murin nous a poussé à nous orienter vers le modèle de larves *Galleria mellonella*. Ce modèle a été largement utilisé dans diverses études dans le but de substituer les modèles d'animaux vertébrés suite aux multitudes d'avantages qu'il offre. Entre autres, les larves sont facilement accessibles à bas prix, leur suivi est aisé ne nécessitant pas d'équipements spéciaux de laboratoire ni de protocole éthique, puis elles ont une courte durée de vie permettant d'effectuer des études sur de grands effectifs (Ramarao et al., 2012). En plus, plusieurs études récentes ont utilisé le modèle de larves de *Galleria mellonella* en phagothérapie aussi bien contre les bactéries gram positives que gram négatives avec des résultats concluants (Beeton et al., 2015; Manohar et al., 2018; Thiry et al., 2019). Ce modèle présente néanmoins quelques inconvénients du fait, par exemple, d'informations limitées sur la génétique des larves, du manque de standardisation de la production des larves et aussi du fait que les larves utilisées ne soient pas exemptes de bactéries pathogènes (ou non SPF) (Tsai et al., 2016).

Dans cette étude, l'évaluation de trois bactériophages (Romulus, Remus and ISP) en modèles *in vitro* et *in vivo* (*G. mellonella*), parmi lesquels le phage ISP a été évalué en modèle *in vivo* murin, a permis de mettre en évidence leur activité lytique contre des souches de *S. aureus* responsables de mammites bovines. Cette efficacité, bien qu'incomplète *in vivo*, a été matérialisée par une guérison

partielle des mammites chez les souris et un taux de survie un peu plus élevé chez les larves (environ 50%) après infection par une souche de *S. aureus* et traitement par les phages. Ces résultats ont été confirmés par une différence statistiquement significative entre les groupes infectés non traités et les groupes infectés traités, tant en larves qu'en souris. En comparaison avec d'autres études, certains paramètres tels que la dose des phages, le ratio phage/bactérie (MOI), le rôle du système immunitaire et la voie d'inoculation pourraient expliquer cette plus faible efficacité et nécessitent d'être adaptés pour de futures expériences (Ly-Chatain, 2014; Van Belleghem et al., 2019).

Plusieurs études récentes se sont intéressées à l'utilisation d'enzymes dérivées de bactériophages telles que les endolysines dans le cadre du traitement des mammites bovines. La plupart de ces études, ciblant des souches de staphylocoques, ont pu montrer une efficacité *in vitro* de ces enzymes en ce qui concerne la lyse bactérienne et la prévention de la formation, voire l'inactivation, de biofilms (Donovan et al., 2006; Fenton et al., 2013; Zhou et al., 2017). Une activité lytique de ces endolysines a également été mise en évidence en modèle de mammites murines (*in vivo*) sur des souches de *S. aureus* ainsi que sur des souches de streptocoques responsables de mammites bovines (Schmelcher et al., 2012a, 2015).

L'efficacité de la phagothérapie contre les mammites bovines, bien que prouvée par différentes études, présente certaines limites. Celles-ci peuvent être liées à la difficulté de sélection des phages devant être conforme à un certain nombre de critères assez stricts tels que la virulence antibactérienne, la capacité à cibler les bactéries *in situ* et la minimisation des effets néfastes sur l'animal (Dabrowska and Abedon, 2019). Le spectre d'hôte des bactériophages est généralement étroit et limiterait leur utilisation lors du traitement présomptif des mammites bovines. Ce qui pourrait contraindre à l'emploi de cocktails de plusieurs phages ou à combiner les phages aux antibiotiques (Kutter, 2009; Kutateladze and Adamia, 2010). Cependant, les bactériophages ciblant *S. aureus* ont la caractéristique de posséder un spectre d'hôte très large, contrairement à la majorité des bactériophages ciblant les autres espèces bactériennes (Peng et al., 2019). Un choc endotoxinique, bien que quelques fois moindre par rapport à celui provoqué par certains antibiotiques (β -lactames), pourrait être observé lors de la lyse de certaines bactéries telles que *E. coli* par les phages (Dufour et al., 2017). Ceci pourrait être contrôlé, notamment, par l'utilisation de phages génétiquement modifiés favorisant une réplication non lytique des phages basée uniquement sur l'activité d'une holine détruisant la membrane cytoplasmique de certaines bactéries (ex : MRSA) et entraînant leur mort sans lyse (Viertel et al., 2014). Il a été démontré que l'utilisation de phages pourrait favoriser une résistance bactérienne aussi bien aux phages (adaptation bactérienne) qu'aux antibiotiques (transfert horizontal de gènes de résistance lors d'un cycle lysogénique) (Principi et al., 2019). Cependant, cette résistance à d'autres antibiotiques peut être évitée par un contrôle minutieux du génome du bactériophage afin de s'assurer de l'absence de gènes responsable de la lysogénie (ex : intégrases). Diverses études ont permis de

mettre en évidence le rôle du système immunitaire ainsi que de certains composants du lait de vaches (protéines, lipides) capables de contrecarrer l'action des phages sur les bactéries responsables de mammites (O'Flaherty et al., 2005). De même, la survie intracellulaire de certaines bactéries mammopathogènes (*S. aureus*) permettrait de limiter à 88% l'action des phages utilisés contre elles (Zhang et al., 2017). L'utilisation des endolysines de phages permettrait cependant de contourner certaines difficultés liées à l'utilisation des bactériophages et d'obtenir de meilleurs rendements thérapeutiques. En effet, elle permet d'éviter la résistance bactérienne face au phage entier résultant notamment de l'inhibition d'absorption, du système de restriction modification et de l'infection abortive (Coffey and Ross, 2002; Fischetti, 2005; Labrie and Moineau, 2007). De plus, l'utilisation des endolysines permet d'éviter le transfert horizontal de gènes de virulence et de résistance ainsi que de limiter la possibilité de production d'exo ou d'endotoxines chez les bactéries (Fenton et al., 2013). Enfin, les particularités des phages rendent difficile la validation et la standardisation de leur utilisation en médecine vétérinaire et représentent un gros obstacle à la phagothérapie dans le traitement des mammites bovines (Kutter et al., 2010). Une solution serait de valider et de standardiser la production et le contrôle des bactériophages comme cela est actuellement le cas, depuis peu, en médecine humaine en Belgique (Pirnay et al., 2018).

4. DIAGNOSTIC DES MAMMITES BOVINES

Un traitement efficace par les phages contre les mammites bovines, comme pour toute autre pathologie, nécessite au préalable un diagnostic précis mettant en évidence des bactéries qui y sont impliquées. Plusieurs démarches et tests diagnostiques existent de nos jours permettant de détecter les principales bactéries responsables de mammites bovines en se basant sur des caractéristiques génétiques et phénotypiques avec, pour base, la bactériologie classique. Dans cette optique, notre étude nous a permis de comparer deux tests, le Pathoproof[®] (qPCR) et le MALDI-TOF en se basant sur 182 échantillons de lait de vache atteintes de mammites sub-cliniques dans des fermes wallonnes. Une corrélation totale a été observée qualitativement entre les 2 tests en ce qui concerne 46% des échantillons tandis qu'une corrélation partielle a été observée avec 21% des échantillons, parmi lesquelles 50% de concordance a été observée sur le plan quantitatif. Ces résultats ont été, également, confirmés par des tests statistiques, bien que des divergences observées ont permis de mettre en évidence les limites et la complémentarité de chaque test dans le diagnostic des mammites bovines, comme déjà démontré dans la littérature. Ainsi, la méthode d'échantillonnage, bien qu'exécutée avec soin, ne pourrait exclure totalement des contaminations, matérialisées par une détection de plus de 2 bactéries par échantillons de lait (Hogan et al., 1989; Koskinen et al., 2010). La nature de ces bactéries contaminantes peut également être très variée allant des entérobactéries aux staphylocoques. Ce qui est le cas dans cette étude où 8 échantillons récoltés ont permis la détection de plus de 2 bactéries qui pourraient avoir contribué aux divergences entre les tests.

D'autres facteurs liés au test qPCR (Pathoproof[®]) utilisé dans cette étude sont certainement à l'origine des divergences des résultats observés tels que sa plage d'identification limitée (15 genre/ espèce bactérienne) ainsi que des problèmes techniques (ex : homogénéisation incomplète) qui pourraient survenir lors de sa manipulation (Hiitiö et al., 2015). La technique de PCR, permettant de détecter et d'amplifier les séquences d'ADN aussi bien des bactéries mortes que vivantes, aurait aussi joué un rôle important ici dans la mesure où elle aurait surévalué les résultats positifs. La « Ct value » n'est pas bien définie dans cette étude en ce qui concerne certains genres et espèces bactériennes détectés par le Pathoproof[®] tel que suivi par le protocole du test, ce qui aurait aussi pu surévaluer les résultats (Cederlöf et al., 2012; Mahmmoud et al., 2013, 2017).

L'implication des facteurs liés au test MALDI-TOF précédé par la croissance bactérienne reposerait sur le fait que les résultats pourraient se présenter comme négatifs en cas de faible charge bactérienne (inférieure à la limite de 100 CFU/ml dans cette étude) comme démontré dans les précédentes études (Hiitiö et al., 2015). Certaines espèces bactériennes responsables de mammites bovines pourraient ne pas être correctement identifiées par le MALDI-TOF vu que sa base de données est encore en cours de validation en ce qui concerne la médecine vétérinaire (Cameron *et al.*, 2018).

La combinaison des deux tests dans le but d'exploiter leurs avantages distincts (sensibilité, spécificité) permettrait d'effectuer un diagnostic précis qui, selon les études précédentes, n'est jamais parfait dans le cadre des mammites bovines et nécessiterait, dans tous les cas, une intervention humaine pour l'interprétation des résultats (Cederlöf et al., 2012; Zadoks et al., 2014). En plus de la détection des espèces/genres bactériens responsables des mammites bovines, le diagnostic devrait s'étendre aussi au test de sensibilité aux antibiotiques qui représente un élément important dans la prise de décision en ce qui concerne le traitement à administrer afin de contourner les résistances antibiotiques. Le test PathoProof[®] Complete-16 kit notamment utilisé dans cette étude, en plus des 15 espèces/genres bactériens qu'il identifie, permet aussi de détecter le gène *blaZ*, gène de production de la bêta-lactamase spécifique aux staphylocoques. Une inclusion dans ce test d'une qPCR pour le gène *mecA* serait un plus, vu l'importance zoonotique et l'implication des MRS(A) en santé publique (Lakhundi and Zhang, 2018). Ceci est la raison pour laquelle nous avons mis un accent sur la détection et la caractérisation des MRS(A) en particulier dans les souches de staphylocoques responsables de mammites bovines.

5. STAPHYLOCOQUES RÉSISTANTS À LA MÉTICILLINE ET MAMMITES BOVINES

Il en ressort de cette étude que la détection des MRS(A) parmi nos souches ainsi que l'identification des cassettes *SCCmec* qui y sont associées seraient sous l'influence de plusieurs facteurs selon que l'on utilise des tests phénotypiques ou génétiques. Ainsi donc, selon Van Griethuysen et al, 2005, une durée de conservation de 2 ans à -80°C entre deux tests pourrait être à l'origine d'une perte d'environ 14% du gène de résistance *mecA* tel que suspecté dans notre étude où l'on a constaté une diminution de 10% de résistance à la méticilline de nos souches. La différence de résultats observée entre les tests phénotypiques (test de sensibilité à la cefoxitine) et génétiques (PCR *mecA*) dans cette étude nous permet de suspecter l'existence d'autres mécanismes de résistance aux β -lactames, tels que la résistance via la production de β -lactamase ainsi que l'éventualité de résultats faux positifs ou faux négatifs liés aux tests phénotypiques utilisés tels que décrits dans la littérature (Pantosti et al., 2007; Pillai et al., 2012).

Cette étude a permis de mettre en évidence une forte prévalence des cassettes *SCCmec* de type II chez les MRS(A) dans les espèces canines et félines au Japon et une forte prévalence des cassettes *SCCmec* type IV chez les MRS(A) dans l'espèce bovine en Belgique, confirmant ainsi les études récentes (Chongtrakool et al., 2006; Bardiau et al., 2013a; Buntaran et al., 2013). La comparaison des résultats de PCR et de l'analyse de génome (WGS) pour l'identification des cassettes *SCCmec* dans cette étude nous montre une meilleure spécificité et sensibilité du WGS par rapport à celle de la PCR multiplexe. En effet, le nombre des résultats d'identification des types de cassettes *SCCmec* par séquençage était plus important que celui des résultats obtenus par PCR conformément aux études antérieures (Hajia, 2017; Feliciano et al., 2018). L'analyse des séquences des souches étudiées dans cette étude nous a apporté des informations plus précises sur les différents éléments constituant les cassettes contrairement à la PCR multiplexe qui ciblait de façon plus globale les éléments des complexes *mec* et *ccr* (Lakhundi and Zhang, 2018). En effet dans cette étude, sur les 68 souches pré-identifiées MRS(A), une concordance totale a été observée pour 59 souches avec les 2 tests en ce qui concerne l'identification des cassettes *SCCmec*. Une concordance partielle des profils *SCCmec* a été observée pour les 9 autres souches avec les 2 tests. Les limites du test de séquençage ont été mises en évidence d'une part par nos résultats au vu de la détermination des sous-types de cassettes *SCCmec* pour la majorité des souches (type IV), mais pas pour certaines autres souches (type II) ; puis d'autres part lors de l'analyse de ces 9 souches discordantes avec la base de données *SCCmecFinder* permettant une identification des cassettes pour 8 souches à l'exception d'une souche coagulase négative (*S. haemolyticus*) présentant un profil particulier (*mecA*, *IS1272*). Cette nouvelle combinaison obtenue ne nous a pas permis de définir une nouvelle cassette compte tenu du fait que la classification définie par le « Groupe de travail international sur la classification des cassettes chromosomiques

staphylococcique » (IWG-SCC) ne s'applique qu'aux MRSA (Ito et al., 2009; Lakhundi and Zhang, 2018). La souche coagulase négative de profil SCCmec particulier étant une souche bovine responsable de mammites subclinique pourrait représenter une menace pour la santé publique compte tenu de son potentiel zoonotique ainsi que de l'inter-transférabilité des cassettes SCCmec (Garza-González et al., 2010a; Yamada et al., 2017). Par conséquent, l'établissement d'une classification parallèle à celle des SCCmec de MRSA paraît important.

La deuxième partie de notre étude sur les MRS(A) reposait sur 8 souches responsables de mammites bovines dont 2 à coagulase négative (*S. haemolyticus* et *S. vitulinus*) présentant également un profil SCCmec particulier ont suscité notre attention. A l'exception de ces 2 souches, toutes les autres étaient résistantes à la céfoxitine, positive à la PCR pour le gène *mecA* et typées SCCmec IV. Par contre, la souche *S. haemolyticus*, bien que résistante à la céfoxitine et positive à la PCR *mecA* présentait des résultats SCCmec discordants entre les tests de PCR (*ccr type5*, *ccr type7*, *mec classeB*) et de WGS (*ccrA1*, *ccrB3*, *ccrC1*, *IS1272*) montrant ainsi les limites des 2 tests dans la détermination des cassettes (Kaya et al., 2018). La souche *S. vitulinus* quant à elle, bien que positive à la PCR *mecA*, était sensible à la céfoxitine et présentait seulement 91% de similarité de séquence pour le gène *mecA* avec la base de données SCCmecFinder sans aucun autre élément SCCmec. Ce profil pourrait être expliqué par une sous-expression du gène *mecA* ainsi qu'une absence de cassette SCCmec dans cette souche telle que décrite dans des études récentes pour le gène *mecB* (homologue du gène *mecA*) (Becker et al., 2018). Par la suite, l'identification avec ResFinder dans cette souche du gène *mecA2* prouverait qu'il s'agirait d'un précurseur du gène *mecA* comme démontré par Rolo et al, 2016. En effet, selon Rolo et al, 2016, le gène *mecA* primitif reposait dans l'espèce *S. fleurettii* qui partageait le même emplacement du gène avec ses homologues *mecA1* chez *S. sciuri* et *mecA2* chez *S. vitulinus*, puis s'est ensuite transmis à différentes espèces au fil du temps. Comme décrit plus haut, ces 2 souches bovines à profils particuliers ne peuvent pas être considérées pour la définition d'une nouvelle cassette mais indiquent une nouvelle fois l'importance de l'établissement d'une classification parallèle à celle des SCCmec de MRSA.

Au cours de cette étude sur les MRS(A), aucun gène *mecC* ni cassette de type XI qui les caractérise n'a été détecté, bien qu'eux aussi soient typiques des MRS(A) particulièrement dans les cas de mammites bovines (García-Álvarez et al., 2011). Ceci révélerait la faible prévalence de ce gène en Europe et particulièrement en Belgique. De même, le gène *mecB* n'a pas été détecté dans nos souches, bien que décrit dans la littérature chez les *S. aureus* (Becker et al, 2018).

Conclusion - Perspectives

Ce travail nous a permis de constituer une collection de staphylocoques issus de diverses origines, puis d'en identifier et caractériser les MRS(A) par différentes méthodes phénotypiques et génétiques en mettant un accent particulier sur les souches responsables de mammites bovines. Il nous a permis, par la suite, d'évaluer l'efficacité thérapeutique aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* d'une collection de bactériophages, particulièrement sur des souches de *S. aureus* responsables de mammites bovines issues de notre collection de staphylocoques.

Il en découle que 83% des souches de notre collection sont des staphylocoques responsables de mammites bovines dont la plupart ont été prélevées en Belgique. Nos résultats confirment également la présence des MRS qui est une conséquence de l'utilisation abusive des antibiotiques (ex : cloxacilline, céfazoline, cefquinome) pour le traitement des mammites. Afin de permettre un diagnostic précis des mammites bovines, différents tests de diagnostic phénotypiques (bactériologie classique - MALDI-TOF) et génétique (qPCR - Pathoproof[®]), ont été comparés dans cette étude. Les deux méthodes présentant chacune des avantages et des inconvénients avec un taux de concordance des résultats de l'ordre de 67% ont été jugées complémentaires dans le but d'un meilleur diagnostic. La plupart des souches responsables de mammites bovines identifiées dans cette étude sont représentées par les *S. aureus*, bien que les CNS constituent également une population bactérienne importante, en particulier chez les souches résistantes à la méticilline en Belgique. La caractérisation des MRS(A) dans notre collection nous a permis d'identifier différents types de cassette SCC*mec* dont le type IV est le majoritaire chez les bovins en Belgique. Elle nous a également permis de mettre en évidence les limites des tests de typage (phénotypiques et génétiques) et d'inciter à la réflexion concernant la classification des cassettes de staphylocoques non-*aureus* parallèle à celle actuellement définie pour les MRSA par l'IWG-SCC. En outre, la présence d'un précurseur du gène *mecA* (*mecA2*) a été confirmée dans cette étude chez un CNS (*S. vitulinus*) bovin. Enfin, la mise en place d'une alternative non antibiotique de lutte contre les mammites par l'utilisation des bactériophages nous a révélé une activité *in vitro* des phages, contre les souches de *S. aureus* testées, matérialisée par une lyse bactérienne aussi bien en gélose qu'en bouillon. Une efficacité a aussi été observée *in vivo*, matérialisée par une diminution des titres bactériens ainsi qu'un certain taux de survie (50%) chez les larves de *G. mellonella* et une diminution de l'inflammation des mamelles chez les souris, dans les groupes infectés puis traités par les phages.

Cette étude vient compléter les études existantes basées sur l'évaluation de la phagothérapie des mammites bovines par des tests *in vitro* et *in vivo*. Elle montre également l'intérêt du modèle expérimental, intermédiaire entre l'*in vitro* et l'*in vivo*, en larves *G. mellonella* pour l'évaluation de l'efficacité des phages contre les souches de *S. aureus* responsables des mammites bovines. Afin d'améliorer la compréhension de cette efficacité, nous proposerions, en guise de perspectives, d'effectuer des études complémentaires *in vivo* en modifiant certains paramètres tels que le rapport

phage/bactérie et la voie d'inoculation des phages et/ou des bactéries. Certains facteurs tels que l'immunité ainsi que la présence dans le lait de substances pouvant influencer l'activité des phages devraient aussi être étudiés. En ce qui concerne la résistance à la méticilline, la non-expression ou la sous-expression du gène *mecA* ainsi que l'activité de la PBP2a codé par le gène *mecA2*, tels que suspectés dans cette étude devraient être étudiés en profondeur notamment par une détection d'ARNm et de PBP2a dans la souche de *S. vitulinus* bovine concernée. Enfin, ce travail met un accent particulier sur la nécessité d'intégrer dans le futur une nouvelle classification de cassette au sein des CNS, vu l'importance de ces bactéries en santé publique.

Bibliographie

A

- Abedon, S.T., Thomas-Abedon, C., Thomas, A., Mazure, H., 2011. Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage* 1, 174–178. doi:10.4161/bact.1.3.16591
- Ackermann, H., 2009. Phage classification and characterization. *Methods Mol. Biol.* 501, 127–140. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_13.
- Afifi, M., Kabera, F., Stryhn, H., Roy, J., Heider, L., Godden, S., Montelpare, W., Sanchez, J., Dufour, S., 2018. Antimicrobial-based dry cow therapy approaches for cure and prevention of intramammary infections: a protocol for a systematic review and meta-analysis. *Anim. Heal. Res. Rev.* 19, 74–78. doi:10.1017/S1466252318000051.
- Aires-de-Sousa, M., 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 373–380. doi:10.1016/j.cmi.2016.11.002
- Ajuebor, J., Buttimer, C., Arroyo-Moreno, S., Chanishvili, N., Gabriel, E.M., O’Mahony, J., McAuliffe, O., Neve, H., Franz, C., Coffey, A., 2018. Comparison of Staphylococcus phage K with close phage relatives commonly employed in phage therapeutics. *Antibiotics* 7. doi:10.3390/antibiotics7020037
- Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A., Troitsky, N., 1998. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J. Infect.* 36, 5–15. doi:10.1016/s0163-4453(98)92874-2.
- Álvarez, A., Fernández, L., Gutiérrez, D., Iglesias, B., Rodríguez, A., García, P., 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals: Latest trends and treatments based on bacteriophages. *J. Clin. Microbiol.* 57, 1–8. doi:10.1128/JCM.01006-19
- Anand, K.B., Agrawal, P., Kumar, S., Kapila, K., 2009. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for mecA gene for detection of MRSA. *Indian J. Med. Microbiol.* 27, 27–9.
- Anderson, M.E.C., Lefebvre, S.L., Rankin, S.C., Aceto, H., Morley, P.S., Caron, J.P., Welsh, R.D., Holbrook, T.C., Moore, B., Taylor, D.R., Weese, J.S., 2009. Retrospective multicentre study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 115 horses. *Equine Vet. J.* 41, 401–405. doi:10.2746/042516408X345134

- Angelichio, M.J., Camilli, A., 2002. *In vivo* Expression Technology. *Society* 70, 6518–6523. doi:10.1128/IAI.70.12.6518
- Angelopoulou, A., Warda, A.K., Hill, C., Ross, R.P., 2019. Non-antibiotic microbial solutions for bovine mastitis—live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins. *Crit. Rev. Microbiol.* 0, 1–17. doi:10.1080/1040841X.2019.1648381
- ANSCI, 2016. Mastitis detection [WWW Document]. ANSCI illinois. URL <http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/Mastitis/detection.html> (accessed 9.12.16).
- Argudín, M.A., Dodémont, M., Vandendriessche, S., Rottiers, S., Tribes, C., Roisin, S., de Mendonça, R., Nonhoff, C., Deplano, A., Denis, O., 2016. Low occurrence of the new species *Staphylococcus argenteus* in a *Staphylococcus aureus* collection of human isolates from Belgium. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1017–1022. doi:10.1007/s10096-016-2632-x
- Arias, C., Murray, B.E., 2009. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge. *N Engl J Med.* 360, 439–443. doi:10.1056/NEJMp0804651
- Ashraf, A., Imran, M., 2018. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Trop. Anim. Health Prod.* 50, 1193–1202. doi:10.1007/s11250-018-1629-0
- Atyah MA1, Zamri-Saad M, S.-Z.A., 2010. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet. Microbiol.* 144, 502–504. doi:10.1016/j.vetmic.2010.02.004
- Azam, A.H., Tanji, Y., 2019. Bacteriophage-host arm race : an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 2121–2131. doi:10.1007/s00253-019-09629-x

B

- Baba, T., Kuwahara-Arai, K., Uchiyama, I., Takeuchi, F., Ito, T., Hiramatsu, K., 2009. Complete genome sequence of *Macrocooccus caseolyticus* strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *J. Bacteriol.* 191, 1180–1190. doi:10.1128/JB.01058-08
- Bai, J., Kim, Y.T., Ryu, S., Lee, J.H., 2016. Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. *Front. Microbiol.* 7, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2016.00474

- Bai, Q., Zhang, W., Yang, Y., Tang, F., Nguyen, X., Liu, G., Lu, C., 2013. Characterization and genome sequencing of a novel bacteriophage infecting *Streptococcus agalactiae* with high similarity to a phage from *Streptococcus pyogenes*. *Arch. Virol.* 158, 1733–1741. doi:10.1007/s00705-013-1667-x
- Baig, S., Johannesen, T.B., Overballe-Petersen, S., Larsen, J., Larsen, A.R., Stegger, M., 2018. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 61, 74–76. doi:10.1016/j.meegid.2018.03.013
- Baker, A.E., O'Toole, G.A., 2017. Bacteria, rev your engines: Stator dynamics regulate flagellar motility. *J. Bacteriol.* 199, 1–8. doi:10.1128/JB.00088-17
- Bardiau, M., Caplin, J., Dettileux, J., Graber, H., Moroni, P., Taminiau, B., Mainil, J.G., 2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Vet. Microbiol.* 185, 1–6. doi:10.1016/j.vetmic.2016.01.003
- Bardiau, M., Yamazaki, K., Duprez, J.N., Taminiau, B., Mainil, J.G., Ote, I., 2013a. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. *Lett. Appl. Microbiol.* 57, 181–186. doi:10.1111/lam.12099
- Bardiau, M., Yamazaki, K., Ote, I., Misawa, N., Mainil, J., 2013b. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats. *Microbiol. Immunol.* 57, 496–501. doi:10.1111/1348-0421.12059
- Barreiro, J.R., Gonçalves, J.L., Grenfell, R., Leite, R.F., Juliano, L., Santos, M. V., 2018. Direct identification of bovine mastitis pathogens by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in pre-incubated milk. *Brazilian J. Microbiol.* 49, 801–807. doi:10.1016/j.bjm.2018.04.012
- Barton, M., Hawkes, M., Moore, D., Conly, J., Nicolle, L., Allen, U., Boyd, N., Embree, J., Van Horne, L., Le Saux, N., Richardson, S., Moore, A., Tran, D., Waters, V., Vearncombe, M., Katz, K., Weese, J.S., Embil, J., Ofner-Agostini, M., Ford-Jones, E.L., 2006. Guidelines for the Prevention and Management of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Perspective for Canadian Health Care Practitioners. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 17, 4C-24C. doi:10.1155/2006/971352
- Basdew, I.H., Laing, M.D., 2011. Mini-Review : Biological control of bovine mastitis using

- bacteriophage therapy. *Sci. against Microb. Pathog. Commun. Curr. Res. Technol. Adv.* 386–393.
- Becker, K., van Alen, S., Idelevich, E.A., Schleimer, N., Seggewiß, J., Mellmann, A., Kaspar, U., Peters, G., 2018. Plasmid-encoded transferable mecB-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 242–248. doi:10.3201/eid2402.171074
- Bedi, M.S., Verma, V., Chhibber, S., 2009. Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1145–1151. doi:10.1007/s11274-009-9991-8
- Beeton, M.L., Alves, D.R., Enright, M.C., Jenkins, A.T.A., 2015. Assessing phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* using a *Galleria mellonella* infection model. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 196–200. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.04.005
- Belleghem, J. Van, Deschaght, P., Vergauwen, B., 2012. Study of *Staphylococcus aureus* phage ISP and derived proteins potential use as antibacterial therapeutics and anti-inflammatory properties. University of Ghent.
- Blasdel, B., Abedon, S., 2017. Superinfection Immunity, in: Reference Module in Life Sciences. pp. 584–586. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.07217-4
- Bondy-Denomy, J., Pawluk, A., Maxwell, K.L., Davidson, A.R., 2013. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 493, 429–432. doi:10.1038/nature11723
- Bradley, A.J., Leach, K.A., Breen, J.E., Green, L.E., Green, M.J., 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet. Rec.* 160, 253–257. doi:10.1136/vr.160.8.253
- Breyne, K., Honaker, R.W., Hobbs, Z., Richter, M., Zaczek, M., Spangler, T., Steenbrugge, J., Lu, R., Kinkhabwala, A., Marchon, B., Meyer, E., Mokres, L., 2017. Efficacy and safety of a Bovine-Associated *Staphylococcus aureus* Phage Cocktail in a murine model of mastitis. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02348
- Brouillette, E., Malouin, F., 2005. The Pathogenesis and Control of *Staphylococcus Aureus*-Induced Mastitis: Study Models in the Mouse. *microbes Infect.* 7, 560–568. doi:10.1016/j.micinf.2004.11.008

Buntaran, L., Hatta, M., Sultan, A.R., Dwiyantri, R., Sabir, M., 2013. Scmec type II gene is common among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Jakarta, Indonesia. BMC Res. Notes 6, 0–6. doi:10.1186/1756-0500-6-110

C

Cain RJ and Va'zquez-Boland JA, 2015. Survival strategy of intracellular bacterial pathogens, in: Yi-Wei T and Andrew S (Ed.), Molecular Medical Microbiology. Academic press, London. UK, pp. 491–515.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10, 421. doi:10.1186/1471-2105-10-421

Cameron, M., Barkema, H.W., De Buck, J., De Vlieghe, S., Chaffer, M., Lewis, J., Keefe, G.P., 2017. Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol. J. Dairy Sci. 100, 2137–2147. doi:10.3168/jds.2016-12020

Cameron, M., Perry, J., Middleton, J.R., Chaffer, M., Lewis, J., Keefe, G.P., 2018. Short communication: Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and a custom reference spectra expanded database for the identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci. J. Dairy Sci. 101, 590–595. doi:10.3168/jds.2017-13226

Cantekin, Z., Ergun, Y., Solmaz, H., Özge Özmen, G., Demir, M., Saidi, R., 2015. PCR assay with host specific internal control for *Staphylococcus aureus* from bovine milk samples. Maced. Vet. Rev. 38, 97–100. doi:10.14432/j.macvetrev.2015.01.038

Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P., Iannelli, D., 2007. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 2765–2773. doi:10.1128/AAC.01513-06

Carpina, N., Manning, K.A., Dokland, T., Marina, A., Penade, R., 2016. Convergent evolution of pathogenicity islands in helper cos phage interference. Philos. Trans. 371, 1–9. doi:10.1098/rstb.2015.050

Carson, D.A., Barkema, H.W., Naushad, S., Buck, J. De, 2017. Bacteriocins of Non- aureus Staphylococci Isolated from Bovine Milk. Appl. Environ. Microbiol. 83, 1–21.

doi:10.1128/AEM.01015-17.

- CBIPvet, 2020. Vet Compendium [WWW Document]. Base données médicaments vétérinaire mammites Bov. URL https://www.vetcompendium.be/fr/database?f%5B0%5D=type%3Adiergeneesmiddel&f%5B1%5D=field_doeldier%3A2305&f%5B2%5D=field_doeldier%3A2299 (accessed 1.10.20).
- Cederlöf, S.E., Toft, N., Aalbaek, B., Klaas, I.C., 2012. Latent class analysis of the diagnostic characteristics of PCR and conventional bacteriological culture in diagnosing intramammary infections caused by *Staphylococcus aureus* in dairy cows at dry off. *Acta Vet. Scand.* 54, 65. doi:10.1186/1751-0147-54-65
- Centeno-cuadros, A., Tela, J., Delibes, M., Edelaar, P., Carette, M., 2017. Validation of loop-mediated isothermal amplification for fast and portable sex determination across the phylogeny of birds. *Mol. Ecol. Resour.* 18, 1–13. doi:10.1111/1755-0998.12732
- Ceotto-Vigoder, H., Marques, S.L.S., Santos, I.N.S., Alves, M.D.B., Barrias, E.S., Potter, A., Alviano, D.S., Bastos, M.C.F., 2016. Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *J. Appl. Microbiol.* 121, 101–114. doi:10.1111/jam.13136
- Chandler, R.L., 1970. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *J. Med. Microbiol.* 3, 273–282.
- Chattopadhyay, M.K., Jagannadham, M. V., 2015. Vesicles-mediated resistance to antibiotics in bacteria. *Front. Microbiol.* 6, 6–8. doi:10.1371/journal.pone.00
- Chaudhary, K., Chattopadhyay, A., Pratap, D., 2018. Anti-CRISPR proteins: Counterattack of phages on bacterial defense (CRISPR/Cas) system. *J. Cell. Physiol.* 233, 57–59. doi:10.1002/jcp.25877
- Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X.X., Trakulsomboon, S., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chavalit, T., Song, J., Kondo, Y., 2006. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCC mec) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a proposal for a new nomenclature for SCCmec Elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1001–1012. doi:10.1128/AAC.50.3.1001
- Ciorba, di V., Odone, A., Veronesi, L., Pasquarella, C., Signorelli, C., 2015. Antibiotic Resistance as a Major Public Health Concern: Epidemiology and Economic Impact. *animali di Ig.* 27, 562–579. doi:10.7416/ai.2015.2048

- Clausen, P.T.L.C., Aarestrup, F.M., Lund, O., 2018. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics* 19, 1–8. doi:10.1186/s12859-018-2336-6
- Coates-Brown, R., Moran, J.C., Pongchaikul, P., Darby, A.C., Horsburgh, M.J., 2018. Comparative genomics of *Staphylococcus* reveals determinants of speciation and diversification of antimicrobial defense. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2018.02753
- Coffey, A., Ross, R.P., 2002. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: Molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 303–321. doi:10.1023/A1020639717
- Cohen, J., 1960. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ. Psychol. Meas.* 20, 37–46. doi:10.1177/001316446002000104
- Cohn, L.A., Middleton, J.R., 2010. A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 20, 31–45. doi:10.1111/j.1476-4431.2009.00497.x
- Corrente, M., D'Abramo, M., Latronico, F., Greco, M.F., Bellacicco, A.L., Greco, G., Martella, V., Buonavoglia, D., 2009. Methicillin-resistant coagulase negative staphylococci isolated from horses. *New Microbiol.* 32, 311–314.
- Costa, P., Pereira, C., Gomes, A.T.P.C., Almeida, A., 2019. Efficiency of Single Phage Suspensions and Phage Cocktail in the Inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* : An In Vitro Preliminary Study. doi:10.3390/microorganisms7040094
- Cotter, P., Hill, C., Ross, R., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777–788. doi:10.1038/nrmicro1273.
- Cuny, C., Abdelbary, M.M.H., Köck, R., Layer, F., Scheidemann, W., Werner, G., Witte, W., 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from infections in horses in Germany are frequent colonizers of veterinarians but rare among MRSA from infections in humans. *One Heal.* 2, 11–17. doi:10.1016/j.onehlt.2015.11.004

D

- D'Hérelle F., 1925. Essai de traitement de la peste bubonique par le bactériophage. *Presse Med.* 33, 1393.
- Da Silva Duarte, Roberto, P., Oliveirade, S., Andrew, D., Andréda, K., Xavier, S., Geovana, C., M.P.,

- F.P., Cynthia, V., Sérgio, C.S., 2018. A T4virus prevents biofilm formation by *Trueperella pyogenes*. *Vet. Microbiol.* 218, 45–51. doi:10.1016/j.vetmic.2018.03.025
- Da Silva Duarte, V., Dias, R.S., Kropinski, A.M., Campanaro, S., Treu, L., Siqueira, C., Vieira, M.S., Da Silva Paes, I., Santana, G.R., Martins, F., Crispim, J.S., Da Silva Xavier, A., Ferro, C.G., Vidigal, P.M.P., Da Silva, C.C., De Paula, S.O., 2018. Genomic analysis and immune response in a murine mastitis model of vB-EcoM-UFV13, a potential biocontrol agent for use in dairy cows. *Sci. Rep.* 8, 1–12. doi:10.1038/s41598-018-24896-w
- Dabrowska, K., Abedon, T., 2019. Pharmacologically aware phage therapy : pharmacodynamic and pharmacokinetic obstacles to phage antibacterial action in animal and human bodies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 83, 1–25. doi:10.1128/MMBR.00012-19
- Daley, P., Bajgai, J., Penney, C., Williams, K., Whitney, H., Golding, G.R., Weese, S., 2016. A cross sectional study of animal and human colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in an Aboriginal community. *BMC Public Health* 16, 1–7. doi:10.1186/s12889-016-3220-9
- David, M.Z., Daum, R.S., 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 616–687. doi:10.1128/CMR.00081-09
- Davis, M., Iverson, S., Baron, P., Vasse, A., Silbergeld, E., Lautenbach, E., Morris, D., 2012. Household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. *Lancet Infect. Dis.* 12, 703–716. doi:10.1016/S1473-3099(12)70156-1
- Dec M, Wernicki A, Urban-Chmiel R (2020). Efficacy of experimental phage therapies in livestock. *Animal Health Research Reviews* 1–15. [https:// doi.org/10.1017/S1466252319000161](https://doi.org/10.1017/S1466252319000161)
- Denis, O., Jans, B., Deplano, A., Nonhoff, C., De Ryck, R., Suetens, C., Struelens, M.J., 2009. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among residents of nursing homes in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 1299–1306. doi:10.1093/jac/dkp345
- Deresinski, S., 2009. Bacteriophage Therapy: Exploiting Smaller Fleas. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1096–1101. doi:10.1086/597405
- Descloux, S., Rossano, A., Perreten, V., 2008. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-

- resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. J. Clin. Microbiol. 46, 1818–1823.
doi:10.1128/JCM.02255-07
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D.A., Horvath, P., Moineau, S., 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. J. Bacteriol. 190, 1390–1400. doi:10.1128/JB.01412-07
- Devriese LA, H.J., 1975. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. Res. Vet. Sci. 19, 23–27.
- Dias, R., Eller, M., Duarte, V., Pereira, A., Silva, C., Mantovani, C., Oliveira, C., Silva, L., M, E.D.A., De Paula, S., 2013. Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Am. Soc. Anim. Sci. 91, 3930–3939. doi:10.2527/jas2012-5884
- Donovan, D.M., Lardeo, M., Foster-Frey, J., 2006. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. FEMS Microbiol. Lett. 265, 133–139. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00483.x
- Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., Keren, M., Amitai, G., Sorek, R., 2018. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. Microbiology 359, 0–12. doi:10.1126/science.aar4120
- Doyle, M.E., Hartmann, F.A., Lee Wong, A.C., 2012. Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? Anim. Health Res. Rev. 13, 157–180. doi:10.1017/S1466252312000187
- du Preez JH, 2000. Bovine mastitis therapy and why it fails. J. south African Vet. Assoc. 71, 201–208. doi:10.4102/jsava.v71i3.714
- Dublanchet, A., 2009. La phagothérapie: des virus pour combattre les infections, FAVRE. ed. Lausanne, Suisse. doi:DOI:10.4267/2042/62299
- Dublanchet, A., Fruciano, E., 2008. Brève histoire de la phagothérapie A short history of phage therapy 38, 415–420. doi:10.1016/j.medmal.2008.06.016
- Duckworth, D.H., 1976. “Who discovered bacteriophage?” Bacteriol. Rev. 40, 793–802. doi:10.1128/membr.40.4.793-802.1976
- Dufour, N., 2016. Phagothérapie et pneumonies acquises sous ventilation mécanique à *Escherichia coli* : une approche thérapeutique possible ? Aspects fondamentaux et éléments de faisabilité .

Université Paris Diderot, Paris.

Dufour, N., Delattre, R., Ricard, J.D., Debarbieux, L., 2017. The lysis of pathogenic *Escherichia coli* by bacteriophages releases less endotoxin than by β -lactams. *Clin. Infect. Dis.* 64, 1582–1588. doi:10.1093/cid/cix184

Dy, R.L., Richter, C., Salmond, G.P.C., Fineran, P.C., 2014. Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. *Annu. Rev. Virol.* 1, 307–331. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085500

E

El-Sayed, A., Awad, W., Abdou, N.-E., Castañeda Vázquez, H., 2017. Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 5, 89–97. doi:10.1016/j.ijvsm.2017.08.002

Elbir, H., Feil, E.J., Drancourt, M., Roux, V., El Sanousi, S.M., Eshag, M., Colque-Navarro, P., Kühn, I., Flock, J.I., 2010. Ovine clone ST1464: A predominant genotype of *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolated from sheep in Sudan. *J. Infect. Dev. Ctries.* 4, 235–238. doi:10.3855/jidc.632

Emond, E., Dion, E., Walker, S.A., Vedamuthu, E.R., Kondo, J.K., Moineau, S., 1998. AbiQ, an abortive infection mechanism from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4748–4756. doi:10.1128/aem.64.12.4748-4756.1998

Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R.P., McAuliffe, O., Coffey, A., 2014. Phage Therapy in the Food Industry. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5, 327–349. doi:10.1146/annurev-food-030713-092415

Erskine, R., Wagner, S., DeGraves, F., 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19, 109–138. doi:10.1016/s0749-0720(02)00067-1

F

FAO/WHO, 2001. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

- Feliciano, C.S., Namburete, E.I., Rodrigues Plaça, J., Peronni, K., Dippenaar, A., Warren, R.M., Silva, W.A., Bollela, V.R., 2018. Accuracy of whole genome sequencing versus phenotypic (MGIT) and commercial molecular tests for detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in Brazil and Mozambique. *Tuberculosis* 110, 59–67. doi:10.1016/j.tube.2018.04.003
- Fenton, M., Keary, R., McAuliffe, O., Ross, R.P., O'Mahony, J., Coffey, A., 2013. Bacteriophage-derived peptidase CHAPK eliminates and prevents staphylococcal biofilms. *Int. J. Microbiol.* 2013. doi:10.1155/2013/625341
- Fischetti, V., 2005. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol.* 13, 491–496. doi:10.1016/j.tim.2005.08.007
- Fitzgerald, J.R., 2012. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: Origin, evolution and public health threat. *Trends Microbiol.* 20, 192–198. doi:10.1016/j.tim.2012.01.006
- Fluit, A.C., 2012. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 735–744. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03846.x
- Founou, L.L., Founou, R.C., Allam, M., Ismail, A., Finyom Djoko, C., Essack, S.Y., 2019. Genome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pigs: Detection of the clonal lineage ST398 in Cameroon and South Africa. *Zoonoses Public Health* 66, 512–525. doi:10.1111/zph.12586
- Friman, M., Hiitiö, H., Niemi, M., Holopainen, J., Pyörälä, S., Simojoki, H., 2017. The effect of a cannula milk sampling technique on the microbiological diagnosis of bovine mastitis. *Vet. J.* 226, 57–61. doi:10.1016/j.tvjl.2017.07.003

G

- Ganaie, M.Y., Qureshi, S., Kashoo, Z., Wani, S.A., Hussain, M.I., Kumar, R., Maqbool, R., Sikander, P., Banday, M.S., Malla, W.A., Mondal, P., Khan, R.I.N., 2018. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages against *Staphylococcus aureus* from India: newer therapeutic agents against Bovine mastitis. *Vet. Res. Commun.* 42, 289–295. doi:10.1007/s11259-018-9736-y
- García-Álvarez, L., Holden, M.T.G., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., 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.R., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J.,

- Holmes, M.A., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 595–603. doi:10.1016/S1473-3099(11)70126-8
- García, P., Madera, C., Martínez, B., Rodríguez, A., Evaristo Suárez, J., 2009. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *J. Dairy Sci.* 92, 3019–3026. doi:10.3168/jds.2008-1744
- Garza-González, E., Morfin-Otero, R., Llaca-Díaz, J.M., Rodriguez-Noriega, E., 2010a. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol. Infect.* 138, 645–654. doi:10.1017/S0950268809991361
- Garza-González, E., Morfin-Otero, R., Llaca-Díaz, J.M., Rodriguez-Noriega, E., 2010b. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol. Infect.* 138, 645–654. doi:10.1017/S0950268809991361
- George P. C. Salmond and Peter C. Fineran, 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 777–786. doi:10.1038/nrmicro3564
- Gill, J.J., Pacan, J.C., Carson, M.E., Leslie, K.E., Griffiths, M.W., Sabour, P.M., 2006. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2912–2918. doi:10.1128/AAC.01630-05
- Gogoi-tiwari, J., Williams, V., Waryah, C.B., Costantino, P., Al-salami, H., Mathavan, S., Wells, K., Tiwari, H.K., Hegde, N., Isloor, S., Al-sallami, H., Mukkur, T., 2017. Mammary Gland Pathology Subsequent to Acute Infection with Strong versus Weak Biofilm Forming *Staphylococcus aureus* Bovine Mastitis Isolates : A Pilot Study Using Non- Invasive Mouse Mastitis Model. *PLoS One* 12, 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0170668
- Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., Cohen, O., Doron, S., Charpak-amikam, Y., Afik, S., Ofir, G., Sorek, R., 2015. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J.* 34, 169–183. doi:10.15252/embj.201489455.
- Golding, G., Levett, P., McDonald, R., Irvine, J., Quinn, B., Nsungu, M., Woods, S., Khan, M., Ofner-Agostini, M., Mulvey, M., Partnership, T.N.A.R., 2011. High Rates of *Staphylococcus aureus*

- USA400 Infection, Northern Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 4–11. doi:10.3201/eid1704.100482
- Gómez-Sanz, E., Ceballos, S., Ruiz-Ripa, L., Zarazaga, M., Torres, C., 2019. Clonally diverse methicillin and multidrug resistant coagulase negative staphylococci are ubiquitous and pose transfer ability between pets and their owners. *Front. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00485
- Grenier, D., Bertrand, J., Mayrand, D., 1995. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles promote bacterial resistance to chlorhexidine. *Oral Microbiol. Immunol.* 10, 319–320. doi:10.1111/j.1399-302X.1995.tb00161.x
- Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., Kaltsatos, V., 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50, 245–259. doi:10.1016/s0169-409x(01)00160-0
- Guinane, C.M., Zakour, N.L.B., Tormo-Mas, M.A., Weinert, L.A., Lowder, B. V., Cartwright, R.A., Smyth, D.S., Smyth, C.J., Lindsay, J.A., Gould, K.A., Witney, A., Hinds, J., Bollback, J.P., Rambaut, A., Penadés, J.R., Fitzgerald, J.R., 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol. Evol.* 2, 454–466. doi:10.1093/gbe/evq031
- Gussmann, M., Steeneveld, W., Kirkeby, C., Hogeveen, H., Nielen, M., Farre, M., Halasa, T., 2019. Economic and epidemiological impact of different intervention strategies for clinical contagious mastitis. *J. Dairy Sci.* 102, 1483–1493. doi:10.3168/jds.2018-14939

H

- Hajia, M., 2017. Limitations of Different PCR Protocols Used in Diagnostic Laboratories: A Short Review. *Mod. Med. Lab. J.* 1, 01–06. doi:10.30699/mmlj17-01-01
- Halasa, T., Huijps, K., Osterås, O., Hogeveen, H., 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q* 29, 18–31. doi:10.1080/01652176.2007.9695224
- Hamza, A., Perveen, S., Abbas, Z., Ur Rehman, S., 2016. The Lytic SA Phage Demonstrate Bactericidal Activity against Mastitis Causing *Staphylococcus aureus*. *Open Life Sci.* 11, 39–45. doi:10.1515/biol-2016-0005
- Hans-W. Ackermann, 2011. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli . Note by M. F.

- d'Herelle, presented by M. Roux. *Comptes Rendus Academie des Sciences* 1917; 165:373–5.
Bacteriophage 1, 3–5. doi:10.4161/bact.1.1.14941
- Hanzen, C., 2010. Prevalence des mammites en Wallonie. Osam, Liège.
- Haran, K.P., Godden, S.M., Boxrud, D., Jawahir, S., Bender, J.B., Sreevatsan, S., 2012. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms 688–695.
doi:10.1128/JCM.05214-11
- Harmon RJ, 1994. Physiology of Mastitis and Factors Affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77, 2103–2112. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77153-8
- Hartmann FA1, Trostle SS, K.A., 1997. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a postoperative wound infection in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 211, 590–592.
- Hassoun, A., Linden, P.K., Friedman, B., 2017. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit. Care* 21, 211. doi:10.1186/s13054-017-1801-3
- Hiitiö, H., Riva, R., Autio, T., Pohjanvirta, T., Holopainen, J., Pyörälä, S., Pelkonen, S., 2015. Performance of a real-time PCR assay in routine bovine mastitis diagnostics compared with in-depth conventional culture. *J. Dairy Res.* 82, 200–208. doi:10.1017/S0022029915000084
- Hiramatsu, K., Ito, T., Tsubakishita, S., Sasaki, T., Takeuchi, F., Morimoto, Y., Katayama, Y., Matsuo, M., Kuwahara-Arai, K., Hishinuma, T., Baba, T., 2013. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Chemother.* 45, 117–136.
doi:10.3947/ic.2013.45.2.117
- Ho, C.M., Lin, C.Y., Ho, M.W., Lin, H.C., Chen, C.J., Lin, L.C., Lu, J.J., 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with SCCmec type V and spa types t437 or t1081 associated to discordant susceptibility results between oxacillin and cefoxitin, Central Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 86, 405–411. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.025
- Hogan, J., Smith, K., Hoblet, K., Schoenberger, P., Todhunter, D., Hueston, W., Pritchard, D., Bowman, G., Heider, L., Brockett, B. et al., 1989. Field Survey of Clinical Mastitis in Low Somatic Cell Count Herds. *J. Dairy Sci.* 72, 1547–1556. doi:10.3168/jds.s0022-0302(89)79266-3

- Holden, M.T.G., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P.J., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G., Parkhill, J., 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9786–9791. doi:10.1073/pnas.0402521101
- Holmes, M.A., Zadoks, R.N., 2011. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 373–382. doi:10.1007/s10911-011-9237-x
- Hyman, P., Abedon, S., 2009. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol. Biol.* 501, 175–202. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_18.
- ## I
- Issa, A., Bada-alamedji, R., Duprez, J., Djika, M., 2013. Bacterial mastitis in the Azawak zebu breed at the Sahelian experimental station in Toukounous (Niger): Identification and typing of *Staphylococcus aureus* 4, 168–178.
- Ito, T., Hiramatsu, K., Oliveira, D.C., De Lencastre, H., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Giffard, P.M., Coleman, D., Tenover, F.C., Boyle-Vavra, S., Skov, R.L., Enright, M.C., Kreiswirth, B., Kwan, S.K., Grundmann, H., Laurent, F., Sollid, J.E., Kearns, A.M., Goering, R., John, J.F., Daum, R., Soderquist, B., 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4961–4967. doi:10.1128/AAC.00579-09
- Itou, T., Katayama, Y., Hiramatsu, K., 2000. A new mobile genetic element, staphylococcal cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nippon saikingaku zasshi. Japanese J. Bacteriol.* 55, 483–498. doi:10.3412/jsb.55.483
- Iwano, H., Inoue, Y., Takasago, T., Kobayashi, H., Furusawa, T., Taniguchi, K., Fujiki, J., Yokota, H., Usui, M., Tanji, Y., Hagiwara, K., Higuchi, H., Tamura, Y., 2018. Bacteriophage Φ SA012 Has a Broad Host Range against *Staphylococcus aureus* and Effective Lytic Capacity in a Mouse Mastitis Model. *Biology (Basel)*. 7, 8. doi:10.3390/biology7010008

J

- J. Scott Weese, 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen in small animals. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 41, 150–157. doi:10.5326/0410150
- Jadhav, R.K., Animal, M., Singh, V.K., 2017. Review of treatment strategies for successful management of bovine mastitis.
- Jeon, J., Park, J.H., Yong, D., 2019. Efficacy of bacteriophage treatment against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in *Galleria mellonella* larvae and a mouse model of acute pneumonia. *BMC Microbiol.* 19, 1–14. doi:10.1186/s12866-019-1443-5
- Johnson, A.P., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The European landscape. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 43–48. doi:10.1093/jac/dkr076
- Juhász-Kaszanyitzky, É., Jánosi, S., Somogyi, P., Dán, Á., Van Der Graaf-van Bloois, L., Van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A., 2007. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 630–632. doi:10.3201/eid1304.060833

K

- Kadja, M., Kpodekon, 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 Kadja. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.* 195–205. doi:10.4314/bahpa.v58i3.64207
- Karginov, Fedor V. and Hannon, G.J., 2010. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol. Cell.* 37, 1–23. doi:10.1016/j.molcel.2009.12.033.
- Kay, B.D., Fildes, P., 1960. The Inactivation of a Bacteriophage by a Component of Papain. *Biochem. J* 75, 139–145.
- Kaya, H., Hasman, H., Larsen, J., Stegger, M., Johannesen, B., Allesøe, L., 2018. SCCmecFinder, a Web-based tool for typing of Cassette Chromosome mec in *Staphylococcus aureus* Using whole-genome sequence data. *msphere* 3, 1–9. doi:10.1128/mSphere.00612-17
- Keen, E.C., 2012. Phage therapy: Concept to cure. *Front. Microbiol.* 3, 1–3. doi:10.3389/fmicb.2012.00238

- Khanna, T., Friendship, R., Dewey, C., Weese, J., 2008. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet. Microbiol.* 128, 298–303. doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.006
- Kim, M.S., Kim, Y.D., Hong, S.S., Park, K., Ko, K.S., Myung, H., 2015. phage-encoded colanic acid-degrading enzyme permits lytic phage: Infection of a capsule-forming resistant mutant *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 900–909. doi:10.1128/AEM.02606-14
- Kjellman, E.E., Slettemeås, J.S., Small, H., Sunde, M., 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from healthy dogs in Norway - occurrence, genotypes and comparison to clinical MRSP. *Microbiologyopen* 4, 857–866. doi:10.1002/mbo3.258
- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Meaney, W.J., Ross, R.P., Hill, C., 2010. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *J. Dairy Res.* 77, 231–238. doi:10.1017/s0022029909990239
- Kluytmans, J.A.J.W., Wertheim, H.F.L., 2005. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection* 33, 3–8. doi:10.1007/s15010-005-4012-9
- Koboldt, D.C., Zhang, Q., Larson, D.E., Shen, D., McLellan, M.D., Lin, L., Miller, C.A., Mardis, E.R., Ding, L., Wilson, R.K., 2012. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 22, 568–576. doi:10.1101/gr.129684.111
- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J.E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R.L., Struelens, M.J., Tacconelli, E., Torné, A.N., Witte, W., Friedrich, A.W., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance* 15, 1–9. doi:10.2807/ese.15.41.19688-en
- Koivula, M., Pitkälä, A., Pyörälä, S., Mäntysaari, E.A., Koivula, M., Pitka, A., 2007. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agric. Scand.* 57, 89–96. doi:10.1080/09064700701488941
- Kondo, Y., Ito, T., Ma, X.X., Watanabe, S., Kreiswirth, B.N., Etienne, J., Hiramatsu, K., 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: Rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 264–274. doi:10.1128/AAC.00165-06

- Koskinen, M., Holopainen, J., Pyörälä, S., Bredbacka, P., Pitkälä, A., Barkema, H., Bexiga, R., Roberson, J., Søilverød, L., Piccinini, R., Kelton, D., Lehmusto, H., Niskala, S., Salmikivi, L., 2009. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 92, 952–959. doi:10.3168/jds.2008-1549
- Koskinen, M.T., Wellenberg, G.J., Sampimon, O.C., Holopainen, J., Rothkamp, A., Salmikivi, L., van Haeringen, W.A., Lam, T.J.G.M., Pyörälä, S., 2010. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J. Dairy Sci.* 93, 5707–5715. doi:10.3168/jds.2010-3167
- Kourtis, A.P., Hatfield, K., Baggs, J., Mu, Y., See, I., Epton, E., Nadle, J., Kainer, M.A., Dumyati, G., Petit, S., Ray, S.M., Ham, D., Capers, C., Ewing, H., Coffin, N., McDonald, L.C., Jernigan, J., Cardo, D., 2019. Vital signs: Epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections - United States. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 68, 214–219. doi:10.15585/mmwr.mm6809e1
- Kutateladze, M., Adamia, R., 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.* 28, 591–595. doi:10.1016/j.tibtech.2010.08.001
- Kutter, E., 2009. Phage Host Range and Efficiency of Plating. *Methods Mol. Biol.* 141–149. doi:DOI:10.1007/978-1-60327-164-6_14
- Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., Abedon, S., 2010. Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11, 69–86. doi:10.2174/138920110790725401
- Kwiatek, M., Parasion, S., Mizak, L., Gryko, R., Bartoszcze, M., Kocik, J., 2012. Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains. *Arch. Virol.* 157, 225–234. doi:10.1007/s00705-011-1160-3

L

- Labrie, S., Samson, J., Moineau, S., 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 317–327. doi:10.1038/nrmicro2315. Epub 2010 Mar 29.
- Labrie, S.J., Moineau, S., 2007. Abortive infection mechanisms and prophage sequences significantly influence the genetic makeup of emerging lytic lactococcal phages. *J. Bacteriol.* 189, 1482–1487.

doi:10.1128/JB.01111-06

- Lago, A., Godden, S.M., Bey, R., Ruegg, P.L., Leslie, K., 2011. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results : I . Effects on antibiotic use , milk withholding time , and short-term clinical and bacteriological outcomes. *J. Dairy Sci.* 94, 4441–4456. doi:10.3168/jds.2010-4046
- Lakhundi, S., Zhang, K., 2018. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, 1–103. doi:10.1128/CMR.00020-18.
- Lam, T., Schukken, Y., Grommers, F., Smit, J., Brand, A., 1993. Within-herd and between-herd variation in diagnosis of clinical mastitis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202, 938–942.
- Lam, T.J.G.M., Olde Riekerink, R.G.M., Sampimon, O.C., Smith, H., 2009. Mastitis diagnostics and performance monitoring: A practical approach. *Ir. Vet. J.* 62, 34–39. doi:10.1186/2046-0481-62-S4-S34
- Leelahapongsathon, K., Schukken, Y.H., Suriyasathaporn, W., 2014. Quarter, cow, and farm risk factors for intramammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 1067–1078. doi:10.1007/s11250-014-0603-8
- Lefkowitz, E.J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G., Smith, D.B., 2018. Virus taxonomy : the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 46, 708–717. doi:10.1093/nar/gkx932
- Leimbach, V.K.S., 2017. Mastitis treatment — Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 52, 21–29. doi:10.1111/rda.13032
- Leonard, F., Markey, B., 2008. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet. J.* 175, 27–36. doi:10.1016/j.tvjl.2006.11.008
- Li, L., Zhang, Z., 2014. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. *Mol. Biol. Rep.* 41, 5829–5838. doi:10.1007/s11033-014-3457-2
- Lindsay, J.A., 2010. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 98–103. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.013

- Liu, J., Chen, D., Peters, B.M., Li, L., Li, B., Xu, Z., Shirliff, M.E., 2016. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.* 101, 56–67. doi:10.1016/j.micpath.2016.10.028
- Loeffler, A., Lloyd, D.H., 2010. Companion animals: A reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? *Epidemiol. Infect.* 138, 595–605. doi:10.1017/S0950268809991476
- Loncaric, I., Lepuschitz, S., Ruppitsch, W., Trstan, A., Andreadis, T., Bouchlis, N., Marbach, H., Schauer, B., Szostak, P., Feßler, A., Künzel, F., Licka, T., Springer, B., Spersger, J., 2019. Increased Genetic Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Isolated From Companion Animals. *Vet. Microbiol.* 235, 118–126. doi:10.1016/j.vetmic.2019.06.013.
- Łoś Marcin and Węgrzyn Grzegorz, 2012. Pseudolysogeny, in: Małgorzata Łobocka, W.T.S. (Ed.), *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 339–349. doi:10.1016/B978-0-12-394621-8.00019-4
- Lozano, C., Gharsa, H., Ben Slama, K., Zarazaga, M., Torres, C., 2016. *Staphylococcus aureus* in Animals and Food: Methicillin Resistance, Prevalence and Population Structure. A Review in the African Continent. *Microorganisms* 4, 12. doi:10.3390/microorganisms4010012
- Ly-Chatain, M.H., 2014. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Front. Microbiol.* 5, 51. doi:10.3389/fmicb.2014.00051

M

- Maciejewska, B., Olszak, T., Drulis-Kawa, Z., 2018. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2563–2581. doi:10.1007/s00253-018-8811-1
- Maes, N., Magdalena, J., Gheldre, Y. De, Struelens, M.J., 2002. Evaluation of a Triplex PCR Assay To Discriminate *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci and Determine Methicillin Resistance from Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1514–1517. doi:10.1128/JCM.40.4.1514
- Mahmmod, Y., Klaas, I., Nielsen, S., Katholm, J., Toft, N., 2013a. Effect of presampling procedures on real-time PCR used for diagnosis of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* in dairy cows at routine milk recordings. *J. Dairy Sci.* 96, 2226–2233. doi:10.3168/jds.2012-6059

- Mahmmod, Y., Toft, N., Katholm, J., Grønbaek, C., Klaas, I., 2013b. Estimation of Test Characteristics of Real-Time PCR and Bacterial Culture for Diagnosis of Subclinical Intramammary Infections With *Streptococcus Agalactiae* in Danish Dairy Cattle in 2012 Using Latent Class Analysis. *Prev. Vet. Med.* 109, 264–270. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.10.018.
- Mahmmod, Y.S., Klaas, I.C., Enevoldsen, C., 2017. DNA carryover in milk samples from routine milk recording used for PCR-based diagnosis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 100, 5709–5716. doi:10.3168/jds.2016-12330
- Mahmmod, Y.S., Nonnemann, B., Svennesen, L., Pedersen, K., Klaas, I.C., 2018. Typeability of MALDI-TOF assay for identification of non-aureus staphylococci associated with bovine intramammary infections and teat apex colonization. *J. Dairy Sci.* 101, 9430–9438. doi:10.3168/jds.2018-14579
- Malik, S., Coombs, G.W., O'Brien, F.G., Peng, H., Barton, M.D., 2006. Molecular typing of methicillin-resistant staphylococci isolated from cats and dogs. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 428–431. doi:10.1093/jac/dkl253
- Malvisi, M., Stuknyte, M., Magro, G., Minozzi, G., Giardini, A., De Noncty, Piccinini, R., 2016. Antibacterial activity and immunomodulatory effects on a bovine mammary epithelial cell line exerted by nisin A-producing *Lactococcus lactis* strains. *J. Dairy Sci.* 99, 2288–2296. doi:10.3168/jds.2015-10161
- Manning, A.J., Kuehn, M.J., 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* 11, 258. doi:10.1186/1471-2180-11-258
- Manohar, P., Nachimuthu, R., Lopes, B.S., 2018. The therapeutic potential of bacteriophages targeting gram-negative bacteria using *Galleria mellonella* infection model. *BMC Microbiol.* 18, 1–11. doi:10.1186/s12866-018-1234-4
- Manohar, P., Tamhankar, A.J., Lundborg, C.S., 2019. Therapeutic Characterization and Efficacy of Bacteriophage Cocktails Infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* Species Isolation of Clinical Bacterial Strains for 10, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2019.00574
- Mansour, N., 2017. Bacteriophages are natural gift, could we pay further attention!
- Martínez-rubio, R., Quiles-puchalt, N., Martí, M., Humphrey, S., Ram, G., Smyth, D., Chen, J.,

- Novick, R.P., Penadés, J.R., 2017. Phage-inducible islands in the Gram-positive cocci. *ISME J.* 11, 1029–1042. doi:10.1038/ismej.2016.163
- Mazzocco, Amanda; Waddell, Thomas E.; Lingohr, Erika and Johnson, R.P., 2009. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system, in: Kropinski, A.M. (Ed.), *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Humana Press, Guelph, Ontario, pp. 81–85. doi:10.1007/978-1-60327-164-6
- McCarthy, A.J., Lindsay, J.A., 2010. Genetic variation in staphylococcus aureus surface and immune evasion genes is lineage associated: Implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiol.* 10. doi:10.1186/1471-2180-10-173
- Mccarthy, A.J., Lindsay, J.A., Loeffler, A., 2012. Are all meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) equal in all hosts? Epidemiological and genetic comparison between animal and human MRSA. *Vet. Dermatol.* 23. doi:10.1111/j.1365-3164.2012.01072.x
- McNEMAR, Q., 1947. Note on the Sampling Error of the Difference Between Correlated Proportions or Percentages. *Psychometrika* 12, 153–157. doi:10.1007/bf02295996
- Meyer, C., 2020. Dictionnaire des Sciences Animales [WWW Document]. URL <http://dico-sciences-animales.cirad.fr/> (accessed 3.5.20).
- Michele Bes al, Y.B. a, 2002. *Staphylococcus: Actualités Taxonomiques Et Identification*. *Rev. française des Lab.* 23–30.
- Middleton, J.R., Fales, W.H., Luby, C.D., Oaks, J.L., Sanchez, S., Kinyon, J.M., Wu, C.C., Maddox, C.W., Welsh, R.D., Hartmann, F., 2005. Surveillance of *Staphylococcus aureus* in Veterinary Teaching Hospitals 43, 2916–2919. doi:10.1128/JCM.43.6.2916
- Monk, A.B., Rees, C.D., Barrow, P., Hagens, S., Harper, D.R., 2010. Bacteriophage applications: Where are we now? *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 363–369. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02916.x
- Morison J., 1935. Bacteriophage in cholera. *Trans. R. Soc. Trop. Med.* 28, 563.
- Murugan, K., Babu, K., Sundaresan, R., Rajan, R., Sashital1, D.G., 2017. The revolution continues: Newly discovered systems expand the CRISPR-Cas toolkit. *Mol. Cell.* 68, 15–25. doi:10.1016/j.molcel.2017.09.007.
- Mustapha, M., Bukar-Kolo, Y.M., Geidam, Y.A., Gulani, I.A., 2014. Review on Methicillin-resistant

Staphylococcus aureus (MRSA) in Dogs and Cats. Int. J. Anim. Vet. Adv. 6, 61–73.
doi:10.19026/ijava.6.5619

N

Nam, H.M., Lee, A.L., Jung, S.C., Kim, M.N., Jang, G.C., Wee, S.H., Lim, S.K., 2011. Antimicrobial susceptibility of staphylococcus aureus and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. Foodborne Pathog. Dis. 8, 231–238. doi:10.1089/fpd.2010.0661

Nemati, M., Hermans, K., Lipinska, U., Denis, O., Deplano, A., Struelens, M., Devriese, L.A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2008. Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: First detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 3817–3819. doi:10.1128/AAC.00613-08

New England Biolabs, 2019. Loop-Mediated Isothermal Amplification [WWW Document]. URL <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp> (accessed 11.18.19).

Ngassam Tchamba, C., Rao, A.S., Boyen, F., Haesebrouck, F., Duprez, J.N., Théron, L., Thiry, D., Mainil, J.G., 2019. Comparison of quantitative PCR and MALDI-TOF mass spectrometry assays for identification of bacteria in milk samples from cows with subclinical mastitis. J. Appl. Microbiol. 127, 683–692. doi:10.1111/jam.14358

Nienhoff, U., Kadlec, K., Chaberny, I., Verspohl, J., Gerlach, G., Kreienbrock, L., Schwarz, S., Simon, D., Nolte, I., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. Vet. Microbiol. 150, 191–197.
doi:10.1016/j.vetmic.2010.12.018

NMC, 2020. Recommended mastitis control program [WWW Document]. URL <https://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2020/04/RECOMMENDED-MASTITIS-CONTROL-PROGRAM-International.pdf> (accessed 5.15.20).

Nonnemann, B., Lyhs, U., Svennesen, L., Kristensen, K.A., Klaas, I.C., Pedersen, K., 2019. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. J. Dairy Sci. 102, 2515–2524.
doi:10.3168/jds.2018-15424

Norberg, E., Hogeveen, H., Korsgaard, I.R., Friggens, N.C., Sloth, K.H.M.N., Løvendahl, P., 2004.

Electrical conductivity of milk: Ability to predict mastitis status. *J. Dairy Sci.* 87, 1099–1107.
doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73256-7

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000.
Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acid Res.* 28, E63.
doi:10.1093/nar/28.12.e63

Nyman, A., Waller, P., Emanuelson, U., Frössling, J., 2016. Sensitivity and specificity of PCR
analysis and bacteriological culture of milk samples for identification of intramammary
infections in dairy cows using latent class analysis. *Prev. Vet. Med.* 135, 123–131.
doi:10.1016/j.prevetmed.2016.11.009

O

O' Rourke D, 2009. Nutrition and udder health in dairy cows : a review. *Ir. Vet. J.* 62, 15–20.

O'Flaherty, S., Ross, R.P., Flynn, J., Meaney, W.J., Fitzgerald, G.F., Coffey, A., 2005. Isolation and
characterization of two anti-staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic
Staphylococcus aureus associated with bovine infections. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 482–486.
doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01781.x

O'Hara, F.P., Suaya, J.A., Ray, G.T., Baxter, R., Brown, M.L., Mera, R.M., Close, N.M., Thomas, E.,
Amrine-Madsen, H., 2016. Spa Typing and Multilocus Sequence Typing Show Comparable
Performance in a Macroepidemiologic Study of *Staphylococcus aureus* in the United States.
Microb. Drug Resist. 22, 88–96. doi:10.1089/mdr.2014.0238

O'Mahony, R., Abbott, Y., Leonard, F., Markey, B., Quinn, P., Pollock, P., Fanning, S., Rossney, A.,
2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary
personnel in Ireland. *Vet. Microbiol.* 109, 285–296. doi:10.1016/j.vetmic.2005.06.003

Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., 2018. DISARM is a widespread
bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nat. Microbiol.* 3, 90–98.
doi:10.1038/s41564-017-0051-0.DISARM

Oliveira, D.C., de Lencastre, H., 2011. Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* is not affected
by the overexpression in trans of the *mecA* gene repressor: A surprising observation. *PLoS One*
6. doi:10.1371/journal.pone.0023287

- Ote, I., Taminau, B., Duprez, J.N., Dizier, I., Mainil, J.G., 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 153, 285–292. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.042
- Otsuka, Y., Yonesaki, T., 2012. Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins. *Mol. Microbiol.* 83, 669–681. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.07975.x
- Otter, J.A., French, G.L., 2011. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *J. Hosp. Infect.* 79, 189–193. doi:10.1016/j.jhin.2011.04.028
- Ove Jessen, Rosendal Kirsten, Per Bülow, Viggo Faber, K.R.E., 1969. Changing staphylococci and staphylococcal infections, a ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. *N. Engl. J. Med.* 281, 627–635.
- ## P
- Pantosti, A., Sanchini, A., Monaco, & M., 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2, 323–334. doi:10.2217/17460913.2.3.323
- Pellegrino, M.S., Frola, I.D., Natanael, B., Gobelli, D., Nader-Macias, M.E.F., Bogni, C.I., 2019. In Vitro Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Milk as Potential Probiotic Strains to Prevent Bovine Mastitis. *Probiotics Antimicrob Proteins* 11, 74–84. doi:10.1007/s12602-017-9383-6
- Peng, C., Hanawa, T., Azam, A.H., LeBlanc, C., Ung, P., Matsuda, T., Onishi, H., Miyanaga, K., Tanji, Y., 2019. Silviavirus phage ϕ MR003 displays a broad host range against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of human origin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 7751–7765. doi:10.1007/s00253-019-10039-2
- Pillai, M., Latha, R., Sarkar, G., 2012. Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus* by Polymerase Chain Reaction and Conventional Methods: A Comparative Study. *J. Lab. Physicians* 4, 83. doi:10.4103/0974-2727.105587
- Pirnay, J.P., Verbeken, G., Ceysens, P.J., Huys, I., de Vos, D., Ameloot, C., Fauconnier, A., 2018. The magistral phage. *Viruses* 10, 1–7. doi:10.3390/v10020064

- Pletinckx, L., Verheghe, M., Dewulf, J., Crombé, F., De Bleecker, Y., Rasschaert, G., Goddeeris, B., De Man, I., 2011. Screening of poultry-pig farms for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: sampling methodology and within herd prevalence in broiler flocks and pigs. *Infect. Genet. Evol.* 11, 2133–2137. doi:10.1016/j.meegid.2011.07.008
- Pomba, C., Baptista, F., Couto, N., Loução, F., Hasman, H., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates with indistinguishable ApaI restriction patterns in colonized and infected pigs and humans. *J. Antimicrob. Chemother.* 2479–2481. doi:10.1093/jac/dkq330
- Porter, J., Anderson, J., Carter, L., Donjacour, E., Paros, M., 2016. In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 99, 2053–2062. doi:10.3168/jds.2015-9748
- Price, L.B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, S., Pearson, T., Laurent, F., Keim, P., Skov, R., Aarestrup, F.M., 2012. Attachments_2016513 3, 1–7. doi:10.1128/mBio.00305-11.Editor
- Principi, N., Silvestri, E., Esposito, S., 2019. Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. *Front. Pharmacol.* 10, 1–9. doi:10.3389/fphar.2019.00513
- Pyörälä S, 2009. Treatment of mastitis during lactation. *Ir. Vet. J.* 62, 40–44. doi:10.1186/2046-0481-62-S4-S40

R

- Rainard P, P.B., 1988. Effect of naturally occurring intramammary infections by minor pathogens on new infections by major pathogens in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 49, 327–329.
- Ramarao, N., Nielsen-Ieroux, C., Lereclus, D., 2012. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis 1–7. doi:10.3791/4392
- Ravat, F., Jault, P., Gabard, J., 2015. Bacteriophages et phagothérapie : utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann. Burns Fire Disasters* 28, 13–20.
- Reyes-robles, T., Dillard, R.S., Cairns, L.S., Silva-valenzuela, C.A., Housman, M., Ali, A., Wright, E.R., 2018. *Vibrio cholerae* Outer Membrane Vesicles Inhibit Bacteriophage Infection. *J. Bacteriol.* 200, 1–9.

- Reyher, K.K., Dohoo, I.R., Scholl, D.T., Keefe, G.P., 2012. Evaluation of minor pathogen intramammary infection, susceptibility parameters, and somatic cell counts on the development of new intramammary infections with major mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 95, 3766–3780. doi:10.3168/jds.2011-5148
- Riekerink, R.G.M.O., Barkema, H.W., Kelton, D.F., Scholl, D.T., 2008. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 91, 1366–1377. doi:10.3168/jds.2007-0757
- Röhrig, C., Huemer, M., Lorgé, D., Luterbacher, S., Phothaworn, P., Schefer, C., Sobieraj, A.M., Zinsli, L. V, Shambat, M., Leimer, N., Keller, A.P., Eichenseher, F., 2020. Targeting Hidden Pathogens: Cell-Penetrating Enzybiotics Eradicate Intracellular Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio* 11, 1–19. doi:10.1128/mBio.00209-20. Editor
- Rolinson, G.N., Jevons, M.P., Rolinson, G.N., 1961. “Celbenin”-resistant staphylococci. *Br. Med. J.* 1, 125. doi:10.1136/bmj.1.5219.124-a
- Rolo J, Worning P, N.J., Bowden R, Bouchami O, D.P., Guardabassi L, Perreten V, Tomasz A, W., H, de Lencastre H, M.M., 2016. Evolutionary origin of the staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec). *Antimicrob Agents Chemother* 16. doi:10.1128/AAC.02302-16.
- S**
- Sachi, S., Ferdous, J., Sikder, M.H., Hussani, S.M.A.K., 2019. Antibiotic residues in milk : Past , present , and future. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 6, 315–332. doi:10.5455/javar.2019.f350
- Sader, H.S., Farrell, D.J., Jones, R.N., 2010. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from skin and skin-structure infections in European medical centres. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36, 28–32. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.03.016
- Salmund, G.P.C., Fineran, P.C., 2015. A century of the phage: Past, present and future. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 777–786. doi:10.1038/nrmicro3564
- Sambrook, J., G.M., 2012. [Molecular Cloning: A Laboratory Manual], 4th ed., v. ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.3724/SP.J.1141.2012.01075
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata, T., Hiramatsu, K., 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 48, 765–769. doi:10.1128/JCM.01232-09

- Schaumburg, F., Alabi, A.S., Peters, G., Becker, K., 2014. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Africa. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 589–596. doi:10.1111/1469-0691.12690
- Schaumburg, F., Peters, G., Alabi, A., Becker, K., Idelevich, E.A., 2016. Missense mutations of PBP2a are associated with reduced susceptibility to ceftaroline and ceftobiprole in African MRSA. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 41–44. doi:10.1093/jac/dkv325
- Schmelcher, M., Donovan, D.M., Loessner, M.J., 2012a. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 7, 1147–1171. doi:10.2217/fmb.12.97
- Schmelcher, M., Powell, A., MJ, C., Pohl, C., Donovan, D., 2015. Synergistic streptococcal phage λ SA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 8475–8486. doi:10.1007/s00253-015-6579-0.
- Schmelcher, M., Powell, A.M., Becker, S.C., Camp, M.J., Donovan, D.M., 2012b. Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2297–2305. doi:10.1128/AEM.07050-11
- Schnellmann, C., Gerber, V., Rossano, A., Jaquier, V., Panchaud, Y., Doherr, M.G., Thomann, A., Straub, R., Perreten, V., 2006. Presence of new *mecA* and *mph(C)* variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4444–4454. doi:10.1128/JCM.00868-06
- Scholte, C.M., Nelson, D.C., Garcia, M., Linden, S.B., Elsasser, T.H., Kahl, S., Qu, Y., Moyes, K.M., 2018. Short communication: Recombinant bacteriophage endolysin PlyC is nontoxic and does not alter blood neutrophil oxidative response in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101, 6419–6423. doi:10.3168/jds.2017-13908
- Schroeder, J.W., 2012. Bovine Mastitis and Milking Management. NDSU Extension Serv. 1129, 1–16.
- Schukken, Y.H.S., IJson, D.J.W., Elcome, F.W., Ikofsky, L.G.A., Onzalez, R.N.G., 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts 34, 579–596. doi:10.1051/vetres
- Schwendener, S., Cotting, K., Perreten, V., 2017. Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Micrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. *Sci. Rep.* 7, 1–11. doi:10.1038/srep43797

- Scoble, M., 1995. Classification of the Lepidoptera. Oxford Univ. Press.
- Scott LaFee and Heather Buschman, 2018. Turning A Phage [WWW Document]. UC San Diego Heal. Newsroom. URL <https://health.ucsd.edu/news/releases/pages/2018-06-21-turning-a-phage.aspx> (accessed 11.18.19).
- Seed, K.D., 2015. Battling Phages: How Bacteria Defend against Viral Attack. PLoS Pathog. 11, 1–5. doi:10.1371/journal.ppat.1004847
- Seemann, T., 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
- Seguin, J.C., Walker, R.D., Caron, J.P., Kloos, W.E., George, C.G., Hollis, R.J., Jones, R.N., Pfaller, M.A., 1999. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreak in a Veterinary Teaching Hospital : Potential Human-to-Animal Transmission 37, 1459–1463.
- Semenova, Ekaterina and Severinov, K., 2017. Interdependencies Between the Adaptation and Interference Modules Guide Efficient CRISPR-Cas Immunity, in: Evolutionary Biology: Self/Nonsel Evolution, Species and Complex Traits Evolution, Methods and Concepts. pp. 1–396. doi:10.1007/978-3-319-61569-1
- Skurnik, M., Pajunen, M., Kiljunen, S., 2007. Biotechnological challenges of phage therapy. Biotechnol. Lett. 29, 995–1003. doi:10.1007/s10529-007-9346-1
- Snyder, L., 1995. Phage-exclusion enzymes : a bonanza of biochemical and cell biology reagents ? Mol. Microbiol. 15, 415–420. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02255.x
- Souza, R., Rault, L., Seyffert, N., Azevedo, V., Le Loir, Y., Even, S., 2018. *Lactobacillus casei* BL23 modulates the innate immune response in *Staphylococcus aureus*-stimulated bovine mammary epithelial cells. Benef. microbe 9, 985–995. doi:10.3920/BM2018.0010
- Spiliopoulou, I., Petinaki, E., 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection risks from companion animals: current perspectives. Vet. Med. Res. Reports 373. doi:10.2147/vmrr.s91313
- Statistiques Biomedicales, 2017. Comparaison de m_ethodes qualitatives (concordance) [WWW Document].
- Stefani, S., Varaldo, P.E., 2003. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. Clin.

Microbiol. Infect. 9, 1179–1186. doi:10.1111/j.1469-0691.2003.00698.x

Stegger, M., Andersen, P.S., Kearns, A., Pichon, B., Holmes, M.A., Edwards, G., Laurent, F., Teale, C., Skov, R., Larsen, A.R., 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. Clin. Microbiol. Infect. 18, 395–400. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03715.x

Stephen Mc Grath and Douwe van Sinderen, 2007. Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology. Caister Academic Press, Cork, Ireland.

Stevens, M., Piepers, S., Supré, K., Dewulf, J., Vlieghe, S. De, 2016. Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production performance. J. Dairy Sci. 99, 2118–2130. doi:10.3168/jds.2015-10199

Suisselab AG Zollikofen, 2006. Identification des mammites à l'aide de Pathoproof Mammites PCR Assay [WWW Document]. Suisselab. URL <http://www.suisselab.ch/fr/analyses-de-lait/ide%0Antification-de-mammites/evaluation-des-resultats.html>. (accessed 4.22.18).

Sulakvelidze, A., Barrow, P., 2004. No Title, in: Bacteriophages. doi:10.1201/9780203491751.ch13

Svennesen, L., Mahmmod, Y.S., Skjølstrup, N.K., Mathiasen, L.R., Katholm, J., Pedersen, K., Klaas, I.C., Nielsen, S.S., 2018. Accuracy of qPCR and bacterial culture for the diagnosis of bovine intramammary infections and teat skin colonisation with *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* using Bayesian analysis. Prev. Vet. Med. 161, 69–74. doi:10.1016/j.prevetmed.2018.10.013

Sylvestre, F., Boucher, D., Labrecque, O., Côté, G., 2008. Les Infections Associées À *Mycoplasma Bovis* chez les bovins laitiers. Réseau d'alerte et d'information Zoosanitaire 58, 1–4.

T

Tahir, A., Asif, M., Abbas, Z., Ur Rehman, S., 2017. Three bacteriophages SA, SA2 and SNAF can control growth of milk isolated staphylococcal species. Pak. J. Zool. 49, 529–533. doi:10.17582/journal.pjz/2017.49.2.529.533

Takeuchi, I., Osada, K., Azam, A.H., Asakawa, H., Miyanaga, K., Tanji, Y., 2016. The presence of two receptor-binding proteins contributes to the wide host range of staphylococcal twort-like

- phages. Appl. Environ. Microbiol. 82, 5763–5774. doi:10.1128/AEM.01385-16
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M.T., Pyörälä, S., 2009. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. J. Dairy Sci. 92, 2610–2617. doi:10.3168/jds.2008-1729
- Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am. J. Infect. Control 34. doi:10.1016/j.ajic.2006.05.219
- Thermo Scientific, 2015. Protocol Book. Thermo Scientific. PathoProof Complete-16 kit instructions for use. [WWW Document]. URL <https://assets.thermofisher.com/TFSAsse%0Ats/MBD/Instructions/D14910-02-PathoProof Complete-%0A16 IFU.pdf>. (accessed 2.16.18).
- Théron, L., Reding, E., Detilleux, J., Hanzen, C., 2011. Epidemiology of mastitis in 30 wallon dairy farms using a compilation of clinical and subclinical data in a new tool for Udder health assessment . Liège.
- Thiry, D., Passet, V., Danis-wlodarczyk, K., Lood, C., Wagemans, J., Sordi, L. De, Noort, V. Van, Dufour, N., Debarbieux, L., Mainil, J.G., Brisse, S., Lavigne, R., 2019. New Bacteriophages against Emerging Lineages ST23 and ST258 of *Klebsiella pneumoniae* and Efficacy Assessment in *Galleria mellonella* Larvae. Viruses 11, 411. doi:10.3390/v11050411
- Tokateloff, N., Manning, S.T., Weese, J.S., Campbell, J., Rothenburger, J., Stephen, C., Bastura, V., Gow, S.P., Reid-Smith, R., 2009. Article prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in horses in Saskatchewan, Alberta, and British Columbia. Can. Vet. J. 50, 1177–1180.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., Notomi, T., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat. Protoc. 3, 877–882. doi:10.1038/nprot.2008.57
- Tsai, C.J., Mei, J., Loh, S., Proft, T., 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. Virulence 7, 214–229. doi:10.1080/21505594.2015.1135289
- Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., Hiramatsu, K., 2010a. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob. Agents

Chemother. 54, 4352–4359. doi:10.1128/AAC.00356-10

Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., Hiramatsu, K., 2010b. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 4352–4359. doi:10.1128/AAC.00356-10

Turutoglu, H., Hasoksuz, M., Ozturk, D., Yildirim, M., Sagnak, S., 2009. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their mecA genes. Vet. Res. Commun. 33, 945–956. doi:10.1007/s11259-009-9313-5

U

Unal, S.F.A.U., Hoskins J FAU - Flokowitsch J.E., FAU, F.J.E., FAU, W.C.Y., FAU, P.D.A., Skatrud, P.L., 1992. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. JID - 7505564 30, 1685–1691.

Urushibara, N., Paul, S.K., Hossain, M.A., Kawaguchiya, M., Kobayashi, N., 2011. Analysis of staphylococcal cassette chromosome mec in *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus sciuri*: Identification of a novel ccr gene complex with a newly identified ccrA allotype (ccrA7). Microb. Drug Resist. 17, 291–297. doi:10.1089/mdr.2010.0144

V

Van Belleghem, J.D., Dąbrowska, K., Vanechoutte, M., Barr, J.J., Bollyky, P.L., 2019. Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system. Viruses 11. doi:10.3390/v11010010

van de Giessen, A., van Santen-Verheuveld, M., Hengeveld, P., Bosch, T., Broens, E., Reusken, C., 2009. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rats living on pig farms. Prev. Vet. Med. 91, 270–273. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.05.016

Van Griethuysen, A., Van Loo, I., Van Belkum, A., Vandenbroucke-Grauls, C., Wannet, W., Van Keulen, P., Kluytmans, J., 2005. Loss of the mecA gene during storage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 43, 1361–1365. doi:10.1128/JCM.43.3.1361-1365.2005

- van Loo, I., B, D., Savelkoul, P., Woudenberg, J., Roosendaal, R., Belkum, A., Lemmens-den Toom, N., Verhulst, C., van Keulen, P., Kluytmans, J., 2007. Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* in Meat Products, the Netherlands 13, 1753–1755. doi:10.3201/eid1311.070358
- Vandersteegen, K., Kropinski, A.M., Nash, J.H.E., Noben, J.-P., Hermans, K., Lavigne, R., 2013. Romulus and Remus, Two Phage Isolates Representing a Distinct Clade within the Twortlikevirus Genus, Display Suitable Properties for Phage Therapy Applications. *J. Virol.* 87, 3237–3247. doi:10.1128/JVI.02763-12
- Vandersteegen, K., Mattheus, W., Ceyskens, P.J., Bilocq, F., de Vos, D., Pirnay, J.P., Noben, J.P., Merabishvili, M., Lipinska, U., Hermans, K., Lavigne, R., 2011. Microbiological and molecular assessment of bacteriophage ISP for the control of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0024418
- Veiga-Crespo, P., Villa, T.G., 2009. Advantages and Disadvantages in the Use of Antibiotics or Phages as Therapeutic Agents, in: Villa, T.G., Veiga-Crespo, P. (Eds.), *Enzybiotics: Antibiotic Enzymes as Drugs and Therapeutics*. doi:10.1002/9780470570548.ch2
- Vet in training, 2015. Mastitis in dairy cows [WWW Document]. *Vet. Dis. Inf. Blog*. URL <https://vetstudentresearch.blogspot.com/2015/06/mastitis-in-dairy-cows.html> (accessed 8.15.19).
- Viertel, T.M., Ritter, K., Horz, H.P., 2014. Viruses versus bacteria-novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2326–2336. doi:10.1093/jac/dku173
- Viguié, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., O’Kennedy, R., 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 27, 486–493. doi:10.1016/j.tibtech.2009.05.004

W

- Wagenaar, J.A., Yue, H., Pritchard, J., Broekhuizen-Stins, M., Huijsdens, X., Mevius, D.J., Bosch, T., Van Duijkeren, E., 2009. Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet. Microbiol.* 139, 405–409. doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.014
- Wallis, J.K., Krömker, V., Paduch, J.H., 2019. Biofilm challenge: Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Udders versus Staphylococci. *Foods* 8. doi:10.3390/foods8020079

- Walther, B., Wieler, L., Friedrich, A., Hanssen, A., Kohn, B., Brunnberg, L., Lübke-Becker, A., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Vet. Microbiol.* 127, 171–178. doi:10.1016/j.vetmic.2007.07.018
- Wang, Z., Zheng, P., Ji, W., Fu, Q., Wang, H., Yan, Y., Sun, J., 2016. SLPW: A virulent bacteriophage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*. *Front. Microbiol.* 7, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2016.00934
- Watanabe, K., Nakaminami, H., Azuma, C., Tanaka, I., Nakase, K., Matsunaga, N., Okuyama, K., Yamada, K., Utsumi, K., Fujii, T., Noguchi, N., 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* is part of the skin flora on the hands of both healthy individuals and hospital workers. *Biol. Pharm. Bull.* 39, 1868–1875. doi:10.1248/bpb.b16-00528
- Wattiaux, M.A., 1999. Mastitis: the disease and its transmission, *Dairy Essentials*. Madison.
- Weese, J.S., van Duijkeren, E., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 140, 418–429. doi:10.1016/j.vetmic.2009.01.039
- Wielders, C.L.C., Fluit, A.C., Brisse, S., Verhoef, J., Schmitz, F.J., 2002. Gene Is Widely Disseminated in 40, 3970–3975. doi:10.1128/JCM.40.11.3970
- Willkomm, S., Makarova, K.S., Grohmann, D., 2018. DNA silencing by prokaryotic Argonaute proteins adds a new layer of defense against invading nucleic acids. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 376–387. doi:10.1093/femsre/fuy010
- Wills, Q.F., Kerrigan, C., Soothill, J.S., 2005. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1220–1221. doi:10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005
- Wilson, D.J., Middleton, J.R., Adkins, P.R.F., Goodell, G.M., 2019. Test agreement among biochemical methods, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry, and 16S rRNA sequencing for identification of microorganisms isolated from bovine milk. *J. Clin. Microbiol.* 57, 1–8. doi:10.1128/JCM.01381-18
- Wilson DR1, F.B., 1998. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can J Microbiol* 44, 313–329.

Y

Yalcin, C., Stott, A.W., Logue, D.N., Gunn, J., 1999. The economic impact of mastitis-control procedures used in Scottish dairy herds with high bulk-tank somatic-cell counts. *Prev. Vet. Med.* 41, 135–49.

Yamada, K., Namikawa, H., Fujimoto, H., Nakaie, K., Takizawa, E., Okada, Y., Fujita, A., Kawaguchi, H., Nakamura, Y., Abe, J., Kaneko, Y., Kakeya, H., 2017. Clinical characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococcal bacteremia in a tertiary hospital. *Intern. Med.* 56, 781–785. doi:10.2169/internalmedicine.56.7715

Yu, J., Ren, Y., Xi, X., Huang, W., Zhang, H., 2017. A Novel Lactobacilli-Based Teat Disinfectant for Improving Bacterial Communities in the Milks of Cow Teats with Subclinical Mastitis 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01782

Z

Zadoks, R.N., Tassi, R., Martin, E., Holopainen, J., McCallum, S., Gibbons, J., Ballingall, K.T., 2014. Comparison of bacteriological culture and PCR for detection of bacteria in ovine milk—Sheep are not small cows. *J. Dairy Sci.* 97, 6326–6333. doi:10.3168/jds.2014-8351

Zhang, L., Sun, L., Wei, R., Gao, Q., He, T., Xu, C., Liu, X., Ran Wang, 2017. Intracellular *Staphylococcus aureus* Control by Virulent Bacteriophages within MAC-T Bovine Mammary Epithelial Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, 1–4. doi:10.1128/AAC.01990-16

Zhang, Y., Agidi, S., Lejeune, J.T., 2009. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1375–1383. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04322.x

Zhao, Y., Zhou, M., Gao, Y., Liu, H., Yang, W., Yue, J., Chen, D., 2015. Shifted T Helper Cell Polarization in a Murine *Staphylococcus aureus* Mastitis Model. *PLoS One* 10, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0134797

Zhou, Y., Zhang, H., Bao, H., Wang, X., Wang, R., 2017. The lytic activity of recombinant phage lysin LysK Δ amidase against staphylococcal strains associated with bovine and human infections in the Jiangsu province of China. *Res. Vet. Sci.* 111, 113–119. doi:doi:10.1016/j.rvsc.2017.02.011.

**Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire
de l'Université de Liège-4000 Liège (Belgique)**

D/2020/160/8

ISBN 978-2-87543-160-8

