

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار – عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE
MICROBIOLOGIE APPLIQUEE



THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En MICROBIOLOGIE

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline : Emergence et
mécanismes de résistance

Présentée par : **Rahima TOUAITIA**

Directrice de thèse : Pr. Nafissa BOUTEFNOUCHET

Université d'Annaba

Membres de Jury :

Président : Pr. Houria CHETTIBI

Université d'Annaba

Examineur : MCA. Tarek MERAD

Université d'Annaba

Examineur : MCA. Abdelbasset MECHAI

Université de Tébessa

Invité : Pr. Abdelghani DJAHOUDI

Université d'Annaba

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Je remercie avant tous, Dieu le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné durant toutes les longues années d'études afin que je puisse arriver là.

*Tout d'abord, Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude au Professeur **Mohammed TAZIR** pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser la plus importante partie de ma thèse dans son service. J'ai pu bénéficier de ses précieux conseils, de son sens critique et de sa rigueur dans le travail.*

*Ma profonde et sincère gratitude et reconnaissance s'adresse à **Madame Nafissa BOUTEFNOUCHET** (Professeur à l'Université de Annaba), qui m'a encadrée pendant ces années. Je la remercie pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses compétences scientifiques, ses qualités humaines, et ses inestimables conseils. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez portée pendant ces années.*

*Je tiens également à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude à **Madame Houria CHETIBI** (Professeur à l'Université d'Annaba), pour avoir honoré ce travail en l'évaluant et en acceptant de présider le jury.*

*J'exprime toute ma gratitude à Monsieur **Tarek MERAD** (Maître de conférences à l'Université d'Annaba) pour avoir accepté de juger ce travail et faire partie de ce jury en qualité d'examineur.*

*Toute ma reconnaissance à Monsieur **Abdelbasset MECHAI** (Maitre de Conférences à l'Université de Tebessa) pour avoir pris sur son temps et accepté d'examiner ce travail et participer à ce jury*

*Ces mêmes remerciements s'adressent à Monsieur **Abdelghani DJAHOUDI** (Professeur à l'Université d'Annaba) pour avoir accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ma thèse.*

*Je tiens aussi à remercier vivement les maitres assistants **Dr. Hanifa ZIANE** et **Dr. Mohamed BACHTARZI** pour m'avoir aidé, conseillé et encouragée durant mon stage de biologie moléculaire.*

Je tiens tout particulièrement à remercier:

*Tout le personnel du laboratoire de microbiologie du CHU Mostapha Bacha –Alger- pour leur accueil et sympathie, spécialement **Soumia BEKTACHE**, ainsi que le personnel du laboratoire de recherche du département de biochimie de l'université d'Annaba pour leur gentillesse.*

Sur une note personnelle j'adresse toute mon affection:

A mes très chers parents. Je leur exprime ma profonde gratitude pour leur soutien moral ainsi que pour leurs encouragements durant tout mon parcours vers un avenir meilleur.

*J'exprime également toute ma reconnaissance à mon mari **Dr. Riadh BOUSSAHIA**; Ses sacrifices, son soutien moral et matériel, sa gentillesse sans égal, son profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Sans son aide, ses conseils et ses encouragements ce travail n'aurait vu le jour.*

Je veux aussi remercier énormément mes beaux parents qui m'ont apporté un soutien sans faille depuis le début. Merci pour votre confiance et vos encouragements.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes frères, mes sœurs et ma belle sœur pour leurs complicité et encouragements,

Merci à tous mes amis et collègues d'Annaba et à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*Enfin merci à ma petite fille. Une petite fleur, pleine de vitalité et de douceur. Tu émerveilles ma vie par ta présence. **Layane**, cette thèse t'est dédiée.*

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Partie 1: Revue de la littérature

I - Etude de l'espèce *Staphylococcus aureus* 3

1- Historique de la taxonomie 3

2- Habitat.....5

3- Caractères bactériologiques 5

4- Facteurs de virulences.....7

4-1- Protéines de surface (colonisation) 7

4-2- Facteurs protégeant la bactérie de la phagocytose.....9

4-3- Facteurs conduisant à l'extension de l'infection 10

4-3-1- Toxines staphylococciques 10

4-3-2- Super antigènes 12

4-3-3- Les enzymes.....14

5- Support génétique de la virulence 15

6- Régulation des facteurs de virulence 16

II- Résistance de *S.aureus* aux antibiotiques 17

1- Résistance de *S.aureus* aux bêta- lactamines.....18

1-1- Mécanisme de résistance 20

2- Résistance à la méthicilline 19

2-1- Mécanisme de résistance 20

2-2- Facteurs influençant l'expression de la méthicillino-résistance. 22

3- Résistance de *S.aureus* aux glycopeptides 23

3-1- Mécanisme d'action 23

3-2- Résistance à la vancomycine 24

3-3- *S.aureus* de sensibilité intermédiaire à la vancomycine (VISA) 25

3-4- La résistance hétérogène des souches VISA 25

4- Résistance de *S.aureus* aux aminosides 26

4-1- Mécanisme de résistance 26

5- Résistance de <i>S.aureus</i> aux macrolides	27
5-1- Mécanisme de résistance	27
III- Epidémiologie.....	28
IV- Méthodes de typage	31
1- Multilocus sequence typing	32
2- Profil de macro restriction génomique par électrophorèse en champs pulsé	32
3- Typage du gène <i>spa</i>	32
4- Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis	33

Partie 2: Partie expérimentale

Matériels et Méthodes	34
1- Objectif de l'étude	34
2- Isolement des souches bactériennes	34
3- Purification des souches	34
4- Conservation des souches	35
5- Identification des souches	35
5-1- Recherche de la catalase.....	35
5-2- Recherche de la coagulase.....	36
5-3- Recherche de la DNase (Désoxyribonucléase)	37
5-3-1- Technique à l'acide chlorhydrique	38
5-3-2- Technique au bleu de toluidine.....	38
6- Le test Pastorex Staph Plus	40
7- Détermination du profil biochimique.....	41
8- Détection phénotypique de la méthicillino-résistance	42
8-1- Méthode de diffusion du disque d'Oxacilline 1ug.....	42
8-2- Méthode de diffusion du disque d'Oxacilline (5ug) à 30°C	42
8-3- Méthode de diffusion du disque de Céfoxitine.....	43
8-4- Test de screening à l'Oxacilline	43
8-5- Détection de la résistance à l'oxacilline par la mise en évidence de la PLP2a (BioMerieux)	44
9- Test de sensibilité aux antibiotiques	45
10- Détermination des CMI par test de sensibilité en microdilution (système d'inoculation Prompt TM * D)	47
11- Recherche des phénotypes de résistance MLSB.....	51
12- Recherche de la résistance de <i>S. aureus</i> à la vancomycine (Test de Screening) ..	52

13- Détermination de la CMI vis-à-vis de vancomycine par E-test.....	53
14- Détection de la sensibilité diminuée au glycopeptides (GISA)	54
15- Analyse de population.....	54
16- Détection des gènes de virulence par PCR.....	57
16-1- Identification par PCR.....	57
A- L'extraction de l'ADN	59
B- Sélection de la méthode PCR pour l'identification des gènes de virulences ..	60
- PCR Duplexe <i>gyrA- mecA</i>	60
- PCR Duplexe <i>Luk-PV- tst1</i>	60
C- Détection des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.....	61
- Préparation du gel à 1,5%	62
- Solution de dépôt sur gel d'agarose à 1,5 %	62
Résultats.....	64
1- Les isolats bactériens.....	64
1-1- Aspect macroscopiques et microscopique des isolats bactériens	64
2- Identification biochimique.....	64
2-1- Les tests catalase, coagulase et DNase.....	64
2-2- Test d'agglutination Pastorex Staph plus.....	65
3- Biotypage des souches de <i>S.aureus</i> selon les profils numériques en API Staph...	65
4- Prévalence des souches SARM	66
4-1- répartition des SARM selon l'origine de prélèvements	66
4-2- répartition des SARM selon l'âge	67
4-3- répartition des SARM selon le sexe	67
5- Détection de la méthicillino-résistance	68
6- Détection de résistance hétérogène à la l'oxacilline	69
7- Recherches de la PLP2a dans les SARM hétérogènes.....	70
8- Tests de sensibilité aux antibiotiques	70
8-1- Les bêtalactamines	70
8-2- Les aminosides.....	70
8-3- Les macrolides	70
8-4- Autre antibiotiques.....	71
9- Détection du phénotype MLSB chez les souches SARM résistance à l'érythromycine	73
10- Détection de sensibilité diminuée aux glycopeptides	75

11- Profils de résistance des souches GISA	76
12- Analyse des sous population des souches GISA	78
13- Recherche moléculaire de la résistance et gènes de virulence.....	79
13-1- Amplification des gènes <i>mecA</i> et <i>gyrA</i>	80
13-2- Amplification des gènes codant pour la PVL et TSST	82
Discussion	84
1- Identification des souches	84
2- Prévalence des SARM	82
2-1- Prévalence des SARM selon l'origine du prélèvement.....	87
2-2- Prévalence des SARM selon le sexe	87
2-3- Prévalence des SARM selon l'âge.....	87
3- Résistance aux antibiotiques	89
3-1- Bêtalactamines.....	89
3-2- Aminosides.....	89
3-3- Macrolides, synergistine et lincosamides	91
3-4- Glycopeptides	92
3-4-1- Sensibilité intermédiaire aux glycopeptides	93
3-5- Fluoroquinolones	95
3-6- Autres antibiotiques	96
3-6-1- Chloramphénicol.....	96
3-6-2- Cyclines.....	96
3-6-3- Rifampicine	96
3-6-4- Fosfomycine	96
3-6-5- Trémithoprime	97
3-6-6- Acide fusidique.....	97
4- Bases moléculaires de résistance et gènes de virulence	98
3-1- Confirmation de l'espèce <i>S.aureus</i> par détection du gène <i>gyrA</i>	98
3-2- Recherche du gène <i>mecA</i> par PCR	98
3-3- Recherche de la production de la PVL.....	100
3-4- Recherche de la production TSST 1	101
Conclusion	103
Références bibliographiques	106
Résumé	
Annexe	

16S: Svedberg (vitesse de sédimentation)

ADN: Acide désoxyribonucléique

agr : accessory gene regulator

ANT : Aminosides-nucléotidyltransférases

ADH : Arginine dihydrolase

APH : Phosphotransférase

AP-HP: Assistance publique – Hôpitaux de Paris

ARN: Acide ribonucléique

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

ATCC: American Type Culture Collection

BHIB : Brain-Heart Infusion Broth

CA-SFM: Comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie

CC: Complexe clonal

CCLIN: le réseau de Microbiologie CCLIN Paris Nord

CHU: Centre Hospitalo-Universitaire

ClfA: Clumping factor A

ClfB: Clumping factor B

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CNRS: Centre National de Référence des Staphylocoques

COIBVH: Collège de Bactériologie Virologie Hygiène des Hôpitaux

DNase : Désoxyribonucléase

D O : Densité Optique

EARSS: European Antimicrobial Persistence Surveillance System

ECIL: European Conference on Infections in Leukemia

EF-G : Facteur d'élongation GTPase

EHUO : Etablissement Hospitalier et Universitaire d'Oran

ETA: La toxine exfoliatrice A

ETB: La toxine exfoliatrice B

FEM: Factors essential for methicillin resistance

GC % : Pourcentage en guanine + cytosine du génome (coefficient de Chagaff)

GISA: *Glycopeptide Intermediate-sensitive Staphylococcus aureus*

IDSA: La société Américaine des maladies infectieuse

IWG-SCC: International Working Group on Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome

LukF-PV: Fast eluted Panton Valentine

LukS-PV: Slow eluted Panton Valentine

MH : Muller Hinton

MLSB: Macrolides, Lincosamides et Streptogramine Bismuth

MLST: Multi-locus sequence type

MLVA: Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis

MRSA- C: SARM communautaire

MSCRAMM: Microbial Surface component Recognizing Adhesive Matrix Molecule.

NNIS : The National Nosocomial Infection Surveillance System

ONERBA: L'Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques

Pb : Paires de bases

PLP: Protéines de liaison aux pénicillines

PCR: Polymerase Chain Reaction

PFGE: Pulsed Field Electrophoresis Gel

PH: Potentiel hydrogène

PI: Point isoélectrique

PLP: Protéine liant la pénicilline

PM: Poids moléculaire

PVL: Leucocidine de Panton-Valentine

RAISIN: Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SARME: SARM épidémique

SARM-H : SARM hospitalier

SASM: *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline

SCC *mec*: La cassette chromosomique staphylococcique *mec*

ST: Sequence type

TSST-1: Toxic shock syndrome toxin 1

TSB : bouillon tryptone soja

UFC: Unité formant une colonie

VAST : Vancomycin Agar Screen Test

VISA: Vancomycin Intermediate-sensitive *Staphylococcus aureus*

VNTR: variable number tandem repeats

VRSA: Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*

Figure N° 01: Représentation schématique du système agr	16
Figure N° 02: La résistance aux antibiotiques de <i>S. aureus</i>	18
Figure N° 03: Structure du noyau bêta-Lactame.	18
Figure N° 04: Schéma de l'action des pénicillines se liant au site de transpeptidation d'une PLP inactivant ainsi l'enzyme	20
Figure N° 05: Le complexe du gène <i>mecA</i>	21
Figure N° 06: Représentation de différents types de <i>SCCmec</i>	22
Figure N° 07: Mécanismes d'action de la vancomycine et de résistance de <i>S. aureus</i> à la vancomycine	25
Figure N° 08: Organigramme de l'identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Figure N° 09: Les étapes de microdilution CMI	49
Figure N° 10: Système d'inoculation RENOK microscan.....	51
Figure N° 11: Schéma explicatif du D-test.....	52
Figure N° 12: Méthode d'analyse de Population	55
Figure N° 13 : Graphe semi logarithmique du comptage des colonies testé pour une hétérorésistance en fonction de la concentration d'antibiotique	57
Figure N° 14: image représentative du programme de la PCR utilisé	58
Figure N° 15: Identification de <i>S.aureus</i> par test d'agglutination	65
Figure N° 16: Répartition des SARM selon l'origine de prélèvement	66
Figure N° 17: Répartition des SARM selon l'âge	67
Figure N° 18: Répartition des SARM selon le sexe	67
Figure N°19 : Test de screening de <i>Staphylococcus aureus</i>	68
Figure N° 20: Répartition des <i>S.aureus</i> selon la résistance à la méthicilline	69
Figure N° 21: Détection de méthicillino-résistance hétérogène (A) et homogène (B) par disques d'oxacilline et céfoxitine	69
Figure N° 22: Taux de résistance et de sensibilité des souches SARM aux antibiotiques	71

Figure N° 23: Exemple de résultat d'antibiogramme d'une souche SARM multirésistante	72
Figure N° 24: Détection du phénotype MLSb chez les souches SARM résistante à l'érythromycine.....	74
Figure N° 25: Détermination de la CMI par E-test vis-à-vis la vancomycine pour la souche GISA (47)	75
Figure N° 26: détermination de la CMI vis-à-vis la vancomycine par E-Test pour la souche GISA (04)	76
Figure N° 27: Graphe semi logarithmique du comptage des colonies GISA pour une hétérorésistance en fonction de la concentration de la vancomycine.....	78
Figure N° 28 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification par PCR des gènes <i>mecA</i> et <i>gyrA</i>	81
Figure N° 29 : Graphique de l'intensité des bandes de PCR <i>mecA</i>	82
Figure N° 30 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des produits d'amplification par PCR des gènes codant pour PVL et TSST.....	80

Tableau N° 01: Classification phénotypique des espèces et sous-espèces du genre <i>Staphylococcus</i>	04
Tableau N° 02: Les antibiotiques testés pour le <i>S.aureus</i> selon CA-SFM 2013	46
Tableau N° 03: Tableau de comptage des colonies	56
Tableau N° 04 : Propriétés des couples d'amorces utilisées	60
Tableau N° 05 : Préparation du mix en volume pour l'amplification.....	61
Tableau N° 06: Répartition des <i>S.aureus</i> selon le biotype	66
Tableau N° 07: Phénotypes de résistance de SARM aux aminosides	73
Tableau N° 08: Phénotypes de résistance de SARM aux macrolides	74
Tableau N° 09: Profil de résistance des souches GISA	77
Tableau N° 10: Profil moléculaire de la résistance à la méthicilline et gènes de virulence de 12 souches SARM	79

Introduction

Depuis leur découverte et leur utilisation lors de la seconde guerre mondiale, les antibiotiques ont permis de faire considérablement reculer la mortalité par maladie infectieuse au cours du XXe siècle (InVS et ANSM, 2014). Malheureusement, la résistance bactérienne aux antibiotiques a rapidement constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale. Celle-ci apparut rapidement, dès 1942, avec la première souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la pénicilline. (Ben redjeb et al, 2000). Cependant, La résistance bactérienne aux antibiotiques est en perpétuelle évolution, cette résistance est liée essentiellement à un usage excessif des antibiotiques aussi bien en médecine humaine, qu'en médecine vétérinaire ou dans l'alimentation animale.

En 1959, la méthicilline a été découverte, c'est une bêtalactamine mais dont le noyau est résistant à l'action des pénicillinases. Peu après l'introduction de ce nouvel antibiotique ont apparu des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA).

En fait, les MRSA sont résistants non seulement à la méthicilline mais également à tous les autres antibiotiques de la même famille ainsi que très fréquemment à des antibiotiques appartenant aux autres familles (Ito et Hiramatsu, 1998).

L'émergence de souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline, conduit à l'utilisation des glycopeptides comme alternative dans le traitement des infections à SARM. Cette pression de sélection a d'abord conduit à l'émergence de staphylocoque coagulase négatif de sensibilité diminuée aux glycopeptides au début des années 80. Les premiers cas d'infection documentée à *S. aureus* avec une sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) à la fin des années 90 initialement au Japon (Hiramatsu et al, 1997) aux USA (Awad et al, 2007) ne sont donc pas complètement surprenants.

Depuis, différents travaux (Mastouri et al, 2006; Hiramatsu et al, 1997) ont tenté de définir les caractéristiques microbiologiques des GISA, de proposer des méthodes standardisées de détection, d'identifier les caractéristiques cliniques et épidémiologiques des patients infectés par de telles souches et d'étudier les conséquences thérapeutiques de cette résistance.

Outre les nombreuses résistances que *S.aureus* peut présenter vis-à-vis des antibiotiques, il peut être étonnant de constater combien ce dernier est également armé de facteurs de virulence pour annihiler bon nombre des défenses que son hôte pourrait lui opposer. C'est en fait une véritable ingénierie dont dispose *S. aureus* pour répondre aux périls d'un hôte hostile qui lui oppose anticorps, phagocytose ou cytotoxicité. Parmi ces facteurs on cite les toxines dont les plus répandues la Leucocidine de Panton Valentine et la toxine du syndrome du choc toxique staphylococcique.

Les objectifs de cette étude consistaient à:

- mettre en évidence la prévalence de SARM dans la communauté d'Annaba,
- étudier le profil de résistance des SARM vis-à-vis différentes familles d'antibiotiques,
- déterminer la fréquence des souches de SARM ayant une résistance diminuée au glycopeptides (GISA),
- déterminer le support génétique de la résistance à la méthicilline par la détection du gène *mecA* par PCR,
- recherche des gènes de virulences de *S.aureus* par PCR.

Ce manuscrit comporte deux parties :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique qui décrit l'espèce *S.aureus*, son épidémiologie et sa résistance aux antibiotiques.

La seconde partie est réservée aux matériels et méthodes utilisés dans ce travail, présentation des résultats de nos travaux expérimentaux et une discussion qui se terminera par une conclusion et perspectives pour les futures recherches.

*Revue de la
littérature*

I- Etude de l'espèce *Staphylococcus aureus*

1. Historique de la taxonomie :

Les staphylocoques ont été mis en évidence pour la première fois en 1878 dans le pus d'abcès par Koch en Allemagne. La dénomination de *Staphylococcus* a été introduite en 1883 par Ogston et provient de l'association des termes grecs Staphylê, grappe de raisin et Kokkos, grain. La classification des staphylocoques a connu de nombreux bouleversements; lors de la première édition en 1923 du « Bergey's Manual ® of Determinative Bacteriology », les staphylocoques étaient classés dans la famille des *Streptococcaceae* puis lors de la deuxième édition en 1926 dans la famille des *Micrococcaceae*. En 1948 cette famille comprenait alors le genre *Micrococcus* et *Staphylococcus*. Ce n'est qu'en 1957 que les staphylocoques et les microcoques furent séparés sur la base de leur capacité à utiliser le glucose en anaérobiose. Cependant ce test mena beaucoup de confusion en attribuant certaines espèces du genre *Staphylococcus* au genre *Micrococcus* (Fauchère et Avril, 2002). En 1974, Baird-Parker sépare définitivement le genre *Staphylococcus* du genre *Micrococcus* grâce à la différence du contenu en guanine et en cytosine de leur ADN, 66- 75% pour *Micrococcus* et 30-39% pour *Staphylococcus*. En 2001, les chercheurs (Garrity et al, 2002) ont proposé de radier le genre *Staphylococcus* de la famille des *Micrococcaceae* (genre *Micrococcus* et *Stomatococcus*) grâce l'analyse des séquences de la sous-unité 16S de l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr 16S) ainsi que d'autres analyses génétiques. Actuellement sa position taxonomique est bien définie il s'agit de la famille *Staphylococcaceae* (Garrity et al, 2002). Cette famille comporte les genres *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Salinicoccus*, *Macrooccus*, ainsi que le plus important le genre *Staphylococcus* (Dworkin et al,2006).

Selon la 9^{ème} édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, les staphylocoques sont classés comme suivant:

Règne : *Bacteria*

Division: *Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre : *Staphylococcus* (Prescott, 2010).

Le genre *Staphylococcus* comprend actuellement 53 espèces et sous-espèces (tableau N°1). Néanmoins, le nombre d'espèce n'a cessé d'augmenter au cours des 20 dernières années et le genre a été remanié.

Les critères de base de la classification des espèces de staphylocoque restent la production de la coagulase libre, enzyme responsable de la coagulation du sérum humain. On distingue ainsi sept espèces et sous-espèces à coagulase positive dont *S.aureus*, et quarante six à coagulase négative (Le Loir Y et Gantier M, 2010).

Tableau N° 1 : Classification phénotypique des espèces et sous-espèces du genre *Staphylococcus* (Le Loir Y et Gantier M, 2010).

Espèces et sous espèces à coagulase positive	Espèces et sous-espèces à coagulase négative	
1. <i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	1. <i>S. auricularis</i>	24. <i>S. arlettae</i>
2. <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	2. <i>S. capitis</i> subsp. <i>Capitis</i>	25. <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>
3. <i>S. delphini</i>	3. <i>S. capitis</i> subsp. <i>Ureolyticus</i>	26. <i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>
4. <i>S. hyicus</i>	4. <i>S. caprae</i>	27. <i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>
5. <i>S. intermedius</i>	5. <i>S. carnosus</i> subsp. <i>Carnosus</i>	28. <i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i>
6. <i>S. lutrae</i>	6. <i>S. carnosus</i> subsp. <i>Utilis</i>	29. <i>S. gallinarum</i>
7. <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	7. <i>S. chromogenes</i>	30. <i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>
	8. <i>S. condimenti</i>	31. <i>S. kloosii</i>
	9. <i>S. epidermidis</i>	32. <i>S. nepalensis</i>
	10. <i>S. felis</i>	33. <i>S. saprophyticus</i>
	11. <i>S. haemolyticus</i>	34. <i>S. fleurettii</i>
	12. <i>S. hominis</i> subsp. <i>Hominis</i>	35. <i>S. lentus</i>
	13. <i>S. lugdunensis</i>	36. <i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>
	14. <i>S. muscae</i>	37. <i>S. sciuri</i> subsp. <i>Rodentium</i>
	15. <i>S. pasteurii</i>	38. <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>Saprophyticus</i>
	16. <i>S. piscifermentans</i>	39. <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>
	17. <i>S. saccharolyticus</i>	40. <i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>
	18. <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>Schleiferi</i>	41. <i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i>
	19. <i>S. simulans</i>	42. <i>S. xylosus</i>
	20. <i>S. warneri</i>	43. <i>S. sciuri</i> subsp. <i>Sciuri</i>
	21. <i>S. vitulinus</i>	44. <i>S. sciuri</i> subsp. <i>lentus</i>
	22. <i>S. pettenkoferi</i>	45. <i>S. pseudointermedius</i>
	23. <i>S. simiae</i>	46. <i>S. pulvereri</i>

2. Habitat :

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Sa niche écologique dominante est la partie antérieure du nez (Kluytmans et al, 1997). Le taux de portage nasal chez les sujets sains varie entre 20% et 55% selon la population étudiée (Nouwen et al, 2001). Trois profils de portage nasal peuvent être distingués : environ 20% des sujets sains sont porteurs permanents, 60% sont des porteurs intermittents, et 20% ne sont pas porteurs (Kluytmans et al, 1997). Ces profils peuvent changer dans le temps.

Ces capacités expliquent que ces bactéries soient aussi des commensaux occasionnels ou permanents de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux qui semblent constituer le principal réservoir de ces germes, secondairement localisés dans la nature, vrai semblablement par les squames et les poils (Eyque et al, 1998).

S.aureus possède des capacités d'adaptation et de résistance au stress importantes et il est capable de survivre dans un large éventail d'habitats environnementaux. La bactérie peut être isolée de façon sporadique dans le sol, l'eau douce, le sable de la plage, l'eau de mer, la surface des plantes. Concrètement, elle est largement présente dans les poussières dispersées dans l'air et les surfaces (Dworkin et al, 2006).

3. Caractères bactériologiques :

Les staphylocoques se présentent sous forme de coques en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chainettes de trois à cinq éléments positivement colorés au Gram (Fauchère et Avril, 2002), le mode de regroupement dit en grappe de raisin ou en amas est plus caractéristique après culture sur un milieu gélosé . La disposition en amas s'explique par la division cellulaire des staphylocoques en trois plans successifs et perpendiculaires les uns aux autres et par le fait que les cellules filles ne se séparent pas complètement de la cellule mère dont elles sont issues.

Le *S. aureus* est une bactérie aéro-anaérobie facultative, et se cultive bien sur les milieux ordinaires (Gélose nutritive, bouillon nutritif...), se cultive également sur gélose au sang et le milieu sélectif chapman. C'est une bactérie mésophile (37 °C de croissance optimale), neutrophile (pH 7 optimal) et halophile (se développe à de fortes

concentrations de NaCl). Elle est aussi relativement résistante aux inhibiteurs bactériens comme le cristal violet et le tellurite de potassium (Trouillet, 2011).

En bouillon ordinaire, la culture est rapide et les staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt.

Sur gélose nutritive on observe des colonies opaques, régulièrement rondes, lisses, plus ou moins bombées avec un diamètre variant de 1,5 à 2 mm. La plus part des souches produisent alors un pigment doré non diffusable en 24 heures à 37°C, pigment qui sera plus prononcé après 24 à 48 heures de plus à la température ambiante.

Sur le milieu Chapman *S.aureus* donne des colonies jaunes dorée avec un virage du milieu vers le jaune orangé, ce qui signifie une fermentation du mannitol par la bactérie, alors que les autres staphylocoques donnent des colonies blanchâtres d'où le nom de staphylocoque blanc.

En milieu gélose au sang, on observe fréquemment une zone claire d'hémolyse (beta-hémolyse) autour des colonies. Ceci est lié au fait que certains staphylocoques en particulier *S.aureus*, sont susceptibles de synthétiser quatre hémolysines distinctes et variables d'une souche à l'autre, et dont l'activité diffère selon le type d'hématie en cause (Tchougoune, 2007).

L'étude des différents caractères biochimiques et métaboliques des souches de staphylocoques a permis le développement de galeries d'identification rapides et efficaces permettant de définir les différents profils biochimiques des souches appartenant à une même espèce (Aouati, 2009).

Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, réduisant le tellurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (Le Minor and Veron, 1990).

De plus, la plupart des souches de *S. aureus* contrairement aux autres espèces produisent de l'hémolyse bêta, caractéristique utile lorsqu'on cherche à identifier un staphylocoque.

S. aureus possède également un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser de nombreux et divers substrats glucidiques, protéiques et lipidiques (Couture, 1990).

Le métabolisme glucidique est particulièrement intéressant. La plupart des sucres sont fermentés; (glucose, saccharose, lévulose, lactose et mannitol), le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobiose ainsi que le mannitol. L'utilisation du mannitol est une indication importante parce que ce polyalcool est fermenté par *S. aureus* et *S. epidermidis*. Cependant, la production de pigments (caractères culturels), d'hémolyse et la dégradation du mannitol n'ont pas toujours lieu; ce sont des indices auxquels on ne peut se fier pour identifier le germe de façon certaine. Il faut donc procéder à son identification par l'étude de différentes propriétés biologiques et biochimiques (Couture, 1990). Ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylocoagulase (Fauchere et Avril, 2002).

Cependant, certaines souches de *S.aureus* peuvent ne pas produire de coagulase libre en raison d'une mutation. Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus* (Couture, 1990).

4. Facteurs de virulence:

La synthèse des facteurs de virulence chez *S.aureus* est biphasique. A la phase initiale de la croissance bactérienne, ce sont surtout les gènes codant pour des adhésines qui sont activés. Secondairement, les gènes des toxines prennent le relais. Cette activation séquentielle est sous la dépendance du système de régulation de la virulence appelé *agr* (accessory gene regulator) (Bronner et al, 2004; Dufour et al, 2002).

4.1. Protéines de surface (colonisation):

Pour qu'une bactérie colonise un tissu, il faut au préalable qu'elle y adhère. Cette étape est déterminante dans le développement ultérieur de l'infection. *S. aureus* colonise la peau et les muqueuses en adhérant aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire.

S. aureus possède un grand nombre de protéines exposées à la surface de la bactérie et qui ont la capacité de se fixer sur des molécules de l'hôte. On parle d'adhésines. Un certain nombre de ces adhésines appartiennent à la famille des Microbial Surface

component Recognizing Adhesive Matrix Molecule (MSCRAMM) c'est-à-dire qu'elles reconnaissent les molécules de la matrice extracellulaire. Plus d'une dizaine d'adhésines ont été identifiées, les mieux caractérisées sont :

➤ **La protéine A :**

Elle est considérée comme une MSCRAMM car elle se lie au facteur de von Willebrand. Le facteur de von Willebrand est un peptide présent au niveau de l'endothélium lésé. Il s'agit d'une protéine (PM: 42 kDa, pI: 5.1) caractéristique de l'espèce *S. aureus*, constitutive de la paroi et insoluble à l'état natif. Elle est élaborée par plus de 90% des souches d'origine humaine (**biotype A**) (Baggett et al, 2004).

➤ **La Coagulase :**

La coagulase est une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte et forme un complexe appelé staphylothrombine. La thrombine activée transforme donc le fibrinogène en fibrine. C'est la base du test de la coagulase en tube. C'est un marqueur classique de l'identification de *S. aureus*. Il n'y a cependant pas d'argument formel en faveur du rôle de la coagulase dans la virulence des souches (Baggett et al, 2004). Cependant, on peut considérer logiquement qu'elle intervient dans la constitution des thrombophlébites staphylococciques et que le caillot permet aux bactéries qu'il contient de se protéger contre les défenses de l'hôte (Bronner et al, 2004).

➤ **Les protéines de liaison au fibrinogène:**

En plus de la coagulase " libre ", on retrouve une coagulase insoluble " liée ", à la surface des bactéries. Elle est appelée clumping factor, diffusible dans le milieu après autolyse, et réagit avec le fibrinogène ou des monomères solubles de fibrine. Ce facteur d'affinité pour le fibrinogène peut être mis en évidence par contact de la souche à étudier avec les hématies de moutons ou de particules de latex recouvertes de fibrinogène. Une agglutination apparaît en quelques secondes et est retrouvée chez 98% des souches de *S. aureus*. Cette adhésine joue un rôle dans les infections des plaies et les infections sur corps étranger. Il semble que le ClfB soit fortement impliqué dans la colonisation nasale (Bronner et al, 2004).

➤ **La protéine de liaison à la fibronectine :**

La fibronectine est une glyco-protéine dimérique qui sert notamment à ancrer les cellules des tissus dans la matrice extracellulaire. Cette protéine contribue à l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques mais aussi aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang. Elle joue un rôle très important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers. Elle serait impliquée dans les phénomènes d'internalisation du staphylocoque dans la cellule endothéliale, cette étape prenant part à la physiopathologie des endocardites infectieuses à *S. aureus*. La Fibronectine Permet au staphylocoque de s'accrocher à nos cellules sous-endothéliales, soit à la membrane basale des vaisseaux sanguins (Batard et al 2007).

➤ **La protéine de liaison au collagène :**

L'attachement au collagène est nécessaire et suffisant pour l'adhésion de *S. aureus* au cartilage in vitro. Ce récepteur du collagène pourrait constituer un facteur de virulence important dans les infections osseuses et articulaires à *S. aureus* (Buckingham et al, 2004).

➤ **Les sidérophores :**

Le fer est indispensable à la croissance des staphylocoques et l'une des méthodes de défense de l'hôte est la diminution de la fraction disponible du fer (fixation à la lactoferrine et à la transferrine). *S. aureus* s'adapte en sécrétant des sidérophores capables de capter et de transporter le fer dans la bactérie. Certaines souches virulentes de *S. aureus* pourraient produire 2 types de sidérophores : un premier dont la production serait limitée par des gènes chromosomiques et un second synthétisé par des plasmides à des quantités beaucoup plus élevées (Cox et al, 1995).

4.2. Facteurs protégeant la bactérie de la phagocytose:

➤ **La capsule :**

Des polysaccharides capsulaires sont trouvés chez 90 % des souches. Onze types capsulaires ont été décrits et les types 5 et 8 sont les plus fréquents en pathologie humaine. La majorité des staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) appartiennent au type 5. La capsule permet une meilleure résistance des souches à

l'opsonisation et à la phagocytose. Certaines souches produisent un exo polysaccharide (glycocalix) qui entraîne la formation d'un biofilm, engluant les bactéries et constituant ainsi une forme de résistance au site de colonisation. Il existe 14 sérotypes mis en évidence par réaction d'agglutination au moyen d'immunsérums (Baggett et al, 2004).

➤ **La paroi :**

Elle est formée du peptidoglycane, des acides teichoïques et lipoteichoïques. Les acides teichoïques sont des polymères linéaires du ribitol phosphate, liés de façon covalente au peptidoglycane, et représentent les constituants principaux de la paroi ; les acides lipoteichoïques sont des polymères de glycérol phosphate avec un glycolipide terminal ancré à la membrane cytoplasmique. Ces composants possèdent des effets biologiques démontrés in vitro, notamment une activité endotoxin-like stimulant la sécrétion de cytokines par les cellules lympho-monocytaires, l'activation du complément et l'agrégation plaquettaire (Baggett et al, 2004).

4.3. Facteurs conduisant à l'extension de l'infection:

4.3.1. Toxines staphylococciques :

S. aureus produit plusieurs toxines ayant pour cible les membranes cellulaires. Ces toxines se fixent à des cellules cibles et provoquent la formation de canaux membranaires laissant passer les ions (pore-forming toxins). On peut citer les hémolysines et les toxines synergohmynenotropes.

➤ **Les hémolysines :**

Quatre hémolysines différentes ont été identifiées, elles diffèrent par leur mécanisme d'action et leur spécificité d'action sur les hématies (humaines et animales) (Kloos et Lamb, 1981).

• **L'alpha-hémolysine ou alpha-toxines :**

C'est une exotoxine protéique de PM de 33 kDa et de pI de 8.55, thermostable, antigénique, induisant la formation d'anticorps neutralisants, son gène de structure est cloné et la séquence d'acide aminé est connue. La toxine est inactivée à 60°C et réactivée à 100°C (effet Arrhénius). Synthétisée par 80 à 90% des souches

pathogènes, elle est cytotoxique et cytolytique pour une grande variété de types cellulaires, elle agit sur de nombreuses membranes cellulaires (érythrocytes, leucocytes, plaquettes, fibroblastes), et entraînerait la formation de canaux intra membranaires créant des troubles osmotiques et une lyse et permettant le passage de molécules de petite taille (Davido, 2010).

- **Béta-hémolysine ou bêta-toxine :**

Elle est thermolabile de PM de 26 à 38 kDa et de pI 9.4, synthétisée par 94% de souches animales et par 54% de souches humaines. Elle agit sur un grand nombre de cellules incluant les globules rouges, les globules blancs et les fibroblastes. Son activité hémolytique est remarquable par les conditions d'apparition, car elle est de type "chaud-froid": les érythrocytes soumis à son action à 37°C ne sont pas lysés sauf si on les refroidit à 4°C.

Le rôle pathogène de cette toxine n'est pas précis, car elle est instable à l'état purifié et ses effets cytopathiques sont mal connus (Gras, 2006).

- **Gamma-hémolysine ou gamma-toxine :**

Elle est antigénique chez l'homme, et est formée de deux constituants I (PM: 29 kDa, pI: 9.8) et II (PM: 26 kDa, pI: 9.9) agissant en synergie et dont le cholestérol inhibe l'action. Elle est active sur les hématies de lapin, de mouton, d'homme mais inactive sur les hématies de cheval. Elle est cependant inhibée par l'agar, certains polymères sulfatés, le cholestérol et bien d'autres lipides. Elle présente une activité antigénique chez l'homme (Merlet, 2010).

- **Delta-hémolysine ou delta-toxine :**

Petit peptide d'environ 3 kDa, constitué de 26 acides aminés. Elle forme une hélice alpha avec un domaine hydrophobe d'un côté et un domaine hydrophile à son opposé. Elle est synthétisée par 97% des souches de *S. aureus* en phase stationnaire de croissance. Ce peptide est capable de lyser différentes cellules dont les érythrocytes ainsi que des structures subcellulaires telles que les organelles et les protoplastes mais son activité est inhibée par la présence de phospholipides (Loulergue et Tourret, 2003).

➤ **Leucocidine de Panton-Valentine (PVL) :**

La PVL fait partie d'une famille de toxines synergohyménotropes. Ce sont des protéines à deux composants non associés mais agissant en synergie sur les membranes cellulaires. Ces toxines ont des cellules cibles (polynucléaires, monocytes, macrophages) sur lesquelles elles se fixent et provoquent la formation de canaux membranaires laissant passer les cations divalents.

La PVL, constituée d'un composant de classe S pour « Slow eluted » (LukS-PV) et d'un composant de classe F pour « Fast eluted » (LukFPV) est leucotoxique et dermonécrotique. Le locus codant pour la production de PVL est porté par un phage et n'est retrouvé que dans un nombre restreint de souches de *S.aureus* en France (2 à 5 %) alors qu'en Afrique 30 % des souches produisent cette toxine (Batard et al, 2007).

4.3.2. Superantigènes :

Les superantigènes sont des molécules présentant une liaison directe à grande affinité avec les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II des cellules présentant l'antigène, induisant ainsi l'activation polyclonale des lymphocytes T V β (Velasco et al, 2005). *S. aureus* produit trois types de superantigènes : les entérotoxines (dont l'entérotoxine staphylococcique A), la toxine 1 du choc toxique (TSST-1) et les toxines exfoliatives. Les pathologies les mieux connues comme étant associées à ces molécules superantigéniques sont le choc toxique et les dermites exfoliatives (Merlet, 2010).

• **Entérotoxines :**

Elles sont responsables du choc toxique staphylococcique et de toxi-infection alimentaire (Entérotoxines A, B, C1, C2, C3, D et E).

L'entérotoxine A pourrait par ailleurs augmenter le risque de choc septique. Ces propriétés superantigéniques seraient également impliquées dans la chronicisation du portage et de l'infection par *S. aureus* - par une diminution de la réponse anticorps et de la capacité du macrophage à détruire les bactéries internalisées et dans certaines vascularites associées à *S. aureus*, tel le syndrome de Kawasaki de l'enfant.

L'entérotoxine B produit une intoxication alimentaire. Cette toxine garde son activité même après avoir bouilli durant 30 minutes et résiste aux enzymes de l'estomac et du jéjunum. Ces toxines agissent directement sur les récepteurs neuronaux du système gastro intestinal, conduisant ainsi à une stimulation des centres du cerveau responsables des vomissements et de la diarrhée. Dans ce cas-ci, c'est la toxine qui est dangereuse et non le staphylocoque comme tel qui est dangereux.

- **Toxine du syndrome du choc toxique (TSST-1):**

Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) est une exotoxine. Elle se compose de 234 acides aminés. Sa masse moléculaire est d'approximativement 22 kDa et son point isoélectrique est de 7.2. Cette toxine est produite par un nombre limité de souches de *S.aureus* (environ 15 à 20%). TSST-1 déclenche les mécanismes de l'immunité grâce à son activité super-antigénique. Elle permet la liaison entre le récepteur des cellules T (au niveau de la chaîne bêta) et le CMH II (fixation sur la chaîne alpha) ce qui induit le mécanisme pour l'activation des cellules T (Gras, 2006)

- **Exfoliatines :**

Il existe deux types d'exfoliatines: Le type A la toxine exfoliatrice A (ETA), le plus fréquent, qui est d'origine chromosomique et le type B la toxine exfoliatrice B (ETB), qui est d'origine plasmidique. Elles sont responsables d'érythème et de clivage de l'épiderme, causant l'épidermolyse bulleuse staphylococcique (A et B responsables d'infections néonatales : syndrome de Ritter, impétigo bulleux).

Les exfoliatines A et B ont pour cible la desmoglérine-1. Cette glycoprotéine du desmosome est impliquée dans l'adhésion intercellulaire au sein du derme superficiel. Le clivage de la desmoglérine-1 par les toxines exfoliatives interrompt les ponts intercellulaires, aboutissant à la formation de bulles. Les pathologies associées à cette toxine sont la nécrolyse épidermique staphylococcique généralisée (appelée également en pédiatrie syndrome des enfants ébouillantés) et l'impétigo bulleux (Batard et al, 2007).

4.3.3. Les enzymes :

S. aureus possède de nombreuses enzymes impliquées dans sa virulence, ayant une activité protéase, hyaluronidase, collagénase, lipase, ou nucléase.

- **Hyaluronidases :**

Hyaluronidases C'est une enzyme thermolabile qui hydrolyse l'acide hyaluronique. Elle fluidifie la substance fondamentale du tissu conjonctif et peuvent faciliter l'extension de l'infection aux tissus adjacents et peut être recherchée par viscosimétrie.

- **Lactamases :**

Inactivent la pénicilline. Les PBP (penicillin binding proteins) sont situées dans la membrane cytoplasmique, leur modification confère une résistance aux pénicillines A et M et aux céphalosporines (Loulergue et Turret, 2003).

- **Nucléase :(DNase) :**

La nucléase du *S. aureus* est thermostable alors que celle des autres espèces de staphylocoques est thermolabile. L'activité enzymatique est mise en évidence sur milieu à base d'ADN avec du bleu de toluidine (halo rose) .La réaction peut être rendue plus spécifique par séro-inhibition de la nucléase du *S. aureus*, recherche qui peut être pratiquée en 4 heures.

- **Les lipases :**

Elles sont au nombre de 3 : les lipases, les phosphatases et les estérases. Les phosphatases sont localisées sur la membrane cytoplasmique au niveau de l'acide teichoïque. Ce sont les phosphatases alcalines et acides, ayant des pH optimaux respectifs de 10,8 et 5,2 et dont seule la phosphatase acide est partiellement libérée dans le milieu et peut donc être recherchée.

- **Les protéases :**

Elles sont également au nombre de 3 : la sérine protéase, la métalloprotéase et la thiolprotéase.

- **Le lysozyme et la lysostaphine:**

Le lysozyme est une endo-bêta-N-acétylglucosaminidase qui provoque la lyse de la paroi bactérienne. La lysostaphine est constituée de trois enzymes qui agissent respectivement au niveau de la chaîne tétrapeptidique entre l'acide N-acétyl muraminique et la L-alanine, au niveau de la chaîne polysaccharidique et au niveau des ponts polyglycines spécifiques aux staphylocoques.

5. Support génétique de la virulence :

Le génome de *S. aureus* se caractérise par sa complexité et sa plasticité. La comparaison des génomes séquencés et l'analyse par la technique des micropuces à ADN d'un échantillon représentatif des différentes lignées de *S. aureus* montrent qu'environ 75% du génome est hautement conservé (Holden et al, 2004; Lindsay and Holden, 2004). La majorité des gènes de ces régions conservées sont impliqués dans la réplication de l'ADN, la synthèse protéique, les fonctions métaboliques.

Un quart du génome est caractérisé par une variabilité génétique importante et les gènes de ces régions sont dévolus à des fonctions non essentielles à la croissance et à la survie. Ces régions variables sont composées d'éléments génétiques mobiles acquis par transferts horizontaux à partir d'autres souches de *S. aureus* et d'autres espèces bactériennes plus ou moins éloignées (Fitzgerald et al, 2001). Ces éléments génétiques mobiles comprennent des génomes prophages, des transposons, des séquences d'insertion, des plasmides, des cassettes chromosomiques, des îlots de pathogénicité et des îlots génomiques (Lindsay and Holden, 2004). La plupart de ces éléments génétiques mobiles transportent des gènes de virulence ou des gènes de résistances aux antibiotiques (Iandolo, 2002).

Il existe un très grand nombre de gènes liés à la virulence : au moins 40 gènes codant pour des toxines, 20 codant pour des facteurs d'adhésion et 44 régulant la transcription de produits associés à la virulence. Les gènes codant pour les toxines sont regroupés dans des îlots de pathogénicité qui sont des éléments génétiques mobiles (Kuroda et al, 2001). Près de 75% des souches cliniques de *S. aureus* ont des gènes codant pour des toxines (Becker et al, 2003).

6. Régulation des facteurs de virulence :

Deux grandes familles de régulateurs contrôlent l'expression des facteurs de virulence chez *S. aureus*. Ce sont les systèmes de régulation à deux composants, dont le mieux connu est le système *agr* (**accessory gene regulator**), et les homologues de *SarA*. D'une façon générale, le système *agr* peut être considéré pour *S. aureus* comme un stimulateur des exotoxines, et un inhibiteur des facteurs de colonisation et de la formation des biofilms. Il induit l'expression d'exoprotéines en même temps qu'il réprime l'expression de protéines de surface. Les protéines de surface sont principalement synthétisées pendant la phase de croissance, et les exoprotéines pendant la phase stationnaire (figure N°01). Les différentes étapes de l'infection staphylococcique requièrent un panel différent de facteurs de virulence : la phase initiale d'infection demande la présence des protéines de surface pour pouvoir se lier à la matrice extracellulaire et permettre la colonisation du tissu, tandis que la sécrétion d'exoprotéines favorise la dissémination de l'infection (Batard et al, 2007).

Le système *agr* possède un polymorphisme génétique avec quatre groupes alléliques identifiés. Ce polymorphisme pourrait expliquer la diversité des infections entraînées par *S. aureus*. Par exemple, le système *agr* type IV est retrouvé dans les souches productrices d'exfoliatines alors que les souches produisant TSST-1 ont un système *agr* de type III (Jarraud et al, 2002).

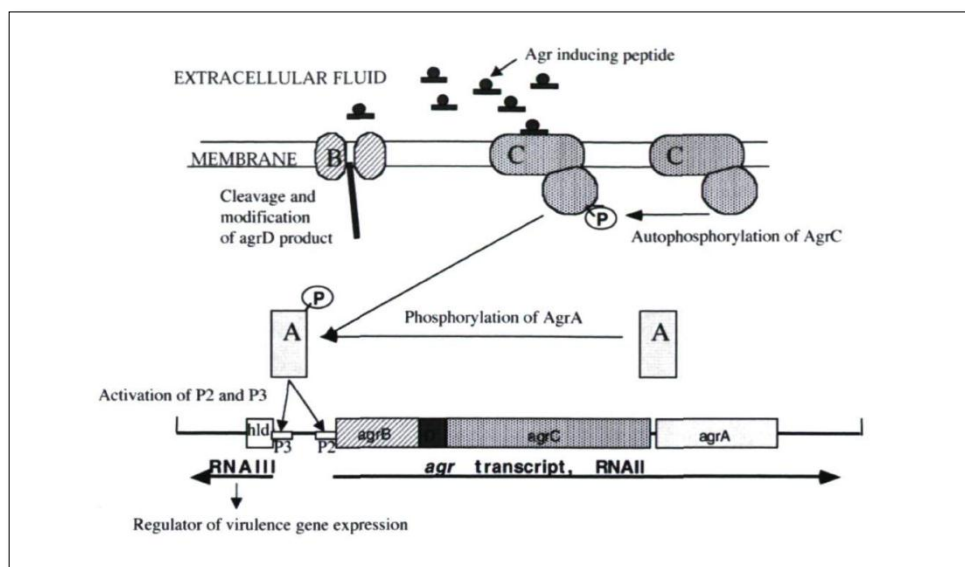


Figure N° 01 : Représentation schématique du système *agr* (Arvidson et al, 2001).

II- Résistance de *S.aureus* aux antibiotiques :

S.aureus ne possède aucune résistance naturelle aux antibiotiques. Entre 1940 et 1950, la pénicilline était l'antibiotique de choix pour traiter les infections à *S. aureus*. Cependant la sensibilité à la pénicilline a été de courte durée suite à l'apparition de souches résistantes productrices des β -lactamases (Appelbaum, 2006). *S. aureus* possède une très grande plasticité génétique. Sous la pression de sélection des antibiotiques, il a très rapidement acquis des gènes portés par des plasmides codant pour des pénicillinases (Grundmann et al, 2006).

En 1959, la méthicilline est découverte. C'est aussi une bêtalactamine mais dont le noyau beta-lactame est résistant à l'action des pénicillinases. Peu après l'introduction de ce nouvel antibiotique apparaissent des souches de *S.aureus* résistantes que l'on appellera *S.aureus* résistants à la méthicilline (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA). En fait, les MRSA sont résistants non seulement à la méthicilline mais également à tous les autres antibiotiques de la même classe ainsi que très fréquemment à des antibiotiques appartenant à d'autres classes (figure N° 02). Au cours des années qui suivent, de nombreuses épidémies hospitalières sont observées, avant tout en Europe mais également aux Etats-Unis. La situation se péjore encore au cours des 15 dernières années. Dans beaucoup de cas, les MRSA s'installent de manière endémique dans les hôpitaux (Otter et French, 2010).

De plus, au sein de ces souches résistantes plus de la moitié ne sont sensibles qu'à la vancomycine (Lowy, 2003). La vancomycine est un antibiotique de la famille des glycopeptides, qui tout comme les bêtalactamines inhibe la synthèse de la paroi. La rapidité et l'efficacité avec laquelle *S. aureus* acquiert des facteurs de résistance aux molécules antibiotiques sont particulièrement inquiétantes, et responsables actuellement de nombreux problèmes thérapeutiques, principalement dans les structures hospitalières. Cependant, ce problème ne concerne pas uniquement les hôpitaux mais également le reste de la population. En effet depuis plusieurs années, le nombre d'infections à staphylocoques au sein de la population augmente, ainsi que la capacité de résistance des souches incriminées. Depuis 2001, 70% des souches isolées lors d'infections à *S. aureus* au sein de la population sont résistantes à la méthicilline (Maltezou et Giamarellou, 2006). Parallèlement à l'émergence des SARM, la

consommation des glycopeptides (teicoplanine, vancomycine) a considérablement augmenté. Les premiers rapports sur la résistance aux glycopeptides associée à un échec thérapeutique ont été publiés en 1995 pour la teicoplanine et en 1997 pour la vancomycine. Les SARM de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) sont définis par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) élevées pour la vancomycine et la teicoplanine (Lowy 2003).

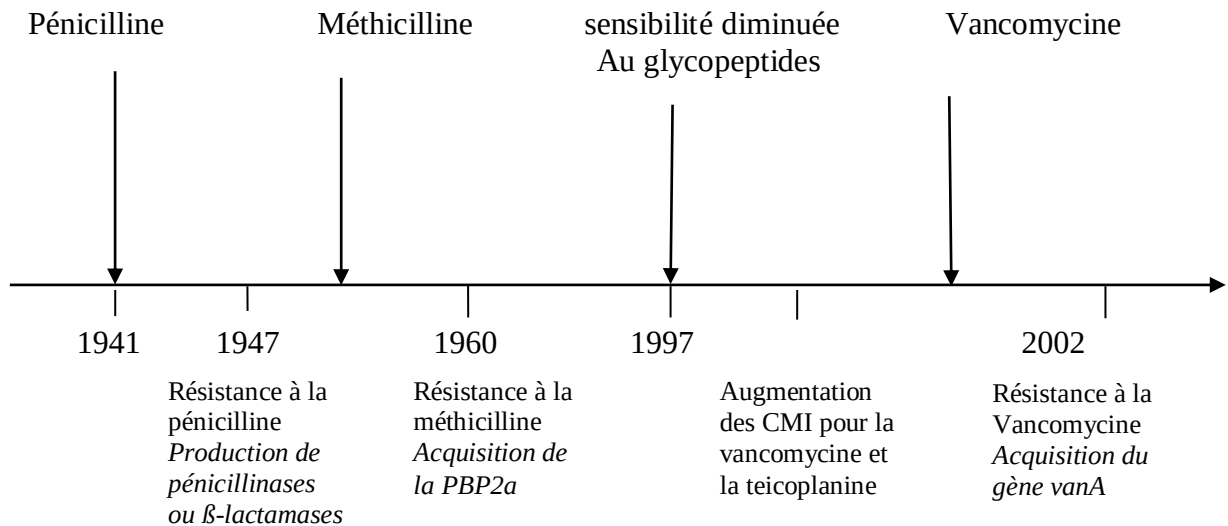


Figure N° 02: Résistance aux antibiotiques de *S. aureus* (Lowy 2003).

1. Résistance de *S.aureus* aux bêtalactamines :

La famille des bêtalactamines comprend plusieurs classes d'antibiotiques. Parmi elles se trouvent les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les pénèmes (hybrides entre les pénicillines et les céphalosporines). Ces antimicrobiens ont tous une structure en commun: l'anneau bêta –Lactame (figure N° 03).

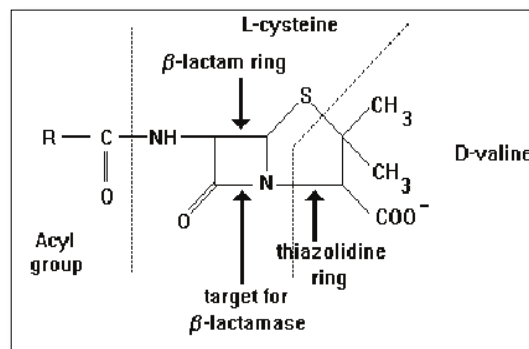


Figure N° 03: Structure du noyau bêta-Lactame (Poole, 2004).

1.1. Mécanisme de résistance:

La résistance aux β -lactamines chez les staphylocoques repose sur deux grands types de mécanismes : un mécanisme de résistance extrinsèque par production d'enzymes inactivant l'antibiotique et un mécanisme de résistance intrinsèque par modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) ou par acquisition de nouvelles PLP (Mainardi et al, 1996).

- **Résistance par production de β -lactamases:**

Une β -lactamase est une enzyme qui hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines, les rendant inactives. L'existence d'une pénicillinase entraîne une résistance à la pénicilline G et aux pénicillines A (ampicilline, amoxicilline, etc.), aux carboxypénicillines (ticarcilline), et aux uréidopénicillines (pipéracilline). Ce mode de résistance est présent chez 90 % des isolats cliniques de *S.aureus*. Le gène *blaZ* codant pour les pénicillinases de staphylocoque peut être porté soit par un transposon soit être chromosomique. La production de β -lactamases peut être constitutive ou, le plus souvent, inductible. L'activité des β -lactamines est restaurée en présence d'un inhibiteur de β -lactamases de type acide clavulanique, tazobactam ou sulbactam (Mainardi et al, 1996).

- **Résistance par une protéine de liaison à la pénicilline additionnelle la PLP2a:**

Les PLP sont des protéines possédant une activité enzymatique (transpeptidases, carboxypeptidases ou glycosyltransférases) impliquée dans la synthèse de la paroi bactérienne et possédant une affinité pour les β -lactamines.

2. Résistance à la méthicilline :

Dans la fin des années 1950 des nouveaux bêta-lactamines semi-synthétiques ont été développés et sont devenus disponibles. Ils sont stables à l'action des pénicillinases. Le groupe comprend la méthicilline, l'oxacilline, nafcilline, flucloxacilline et dicloxacilline, méthicilline étant le prototype (Fisher et al, 2005; Guignard et al, 2005).

2.1.Mécanisme de résistance:

La résistance à la méthicilline, qui entraîne une résistance à toutes les β -lactamines, est déterminée par la présence d'un gène chromosomique (*mecA*) qui code pour la PLP2a. Cette PLP additionnelle a moins d'affinité pour les β -lactamines et en particulier pour la méthicilline (De Jonge et al, 1993).

Les PLP, enzymes essentiels qui catalysent la transpeptidation des liens entre les peptidoglycanes de la paroi cellulaire, sont la cible des bêtalactamines chez les souches sensibles de *S. aureus* (Gilmore et al, 2008) (figure N° 04). La liaison de méthicilline, ou autre β -lactamine, aux PLP inhibe la réaction de transpeptidation de celle-ci, ce qui entraîne un arrêt de la biosynthèse de la paroi conduisant à la mort de la bactérie (Prescott et al, 2000). Chez les SARM la PLP2a est soit constitutionnellement présente ou induite lorsque la bactérie est en présence d'une bêtalactamine. La PLP2a, ayant une faible affinité pour les bêtalactamines, n'est pas affectée par ces antibiotiques et permet ainsi à la bactérie de continuer la biosynthèse de sa paroi (Gilmore et al, 2008).

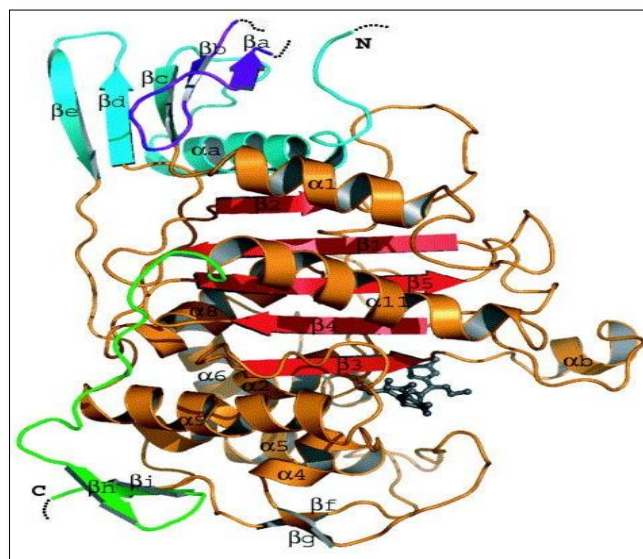


Figure N° 04: Schéma de l'action des pénicillines se liant au site de transpeptidation d'une PLP inactivant ainsi l'enzyme (Contreras-Martel et al, 2006).

Cette résistance est située sur un élément mobile de résistance, la cassette *SCCmec* (Deurenberg et al, 2008). La *SCCmec* est une séquence d'ADN de 21 à 67-kb qui est toujours située près de l'origine de réplication du chromosome de la bactérie. Cette séquence contient les complexes de gènes *mec* et *ccr*. Le complexe *ccr* est composé des gènes *ccr* entourés de cadres de lecture ouverts qui n'ont pour la plupart aucune fonction connue (IWG-SCC 2009). Le complexe *mec* contient le gène *mecA* qui code pour la PLP2a (Chambers et al, 1988). L'expression de la PLP2a est contrôlée par deux ensembles de gènes régulateurs qui contrôlent l'expression de *mecA*. Le premier ensemble inclus *mecR1* et *mecI* qui sont situés dans le segment d'ADN *mec* immédiatement avant *mecA*. L'autre ensemble de gènes régulateurs est constitué de *blaR1* et *blaI* et sont situés sur le chromosome. Ils servent également à réguler *blaZ* codant pour une pénicillinase (penicillinase staphylococcique). Les protéines *MecI* et *BlaI* sont deux répresseurs agissant sur *mecA* et *blaZ*. Les protéines *MecR1* et *BlaR1* sont des molécules de type transducteur senseur spécifiques pour leur répresseur correspondant. Ce sont des protéines transmembranaires avec un domaine senseur extracellulaire et un domaine métalloprotéase intracellulaire. En présence de β -lactamine, ces protéines vont respectivement inhiber l'action de *MecI* et *BlaI* permettant ainsi la traduction de *mecA* et la synthèse de PLP2a (Salyers et al, 2002) (Figure N°05).

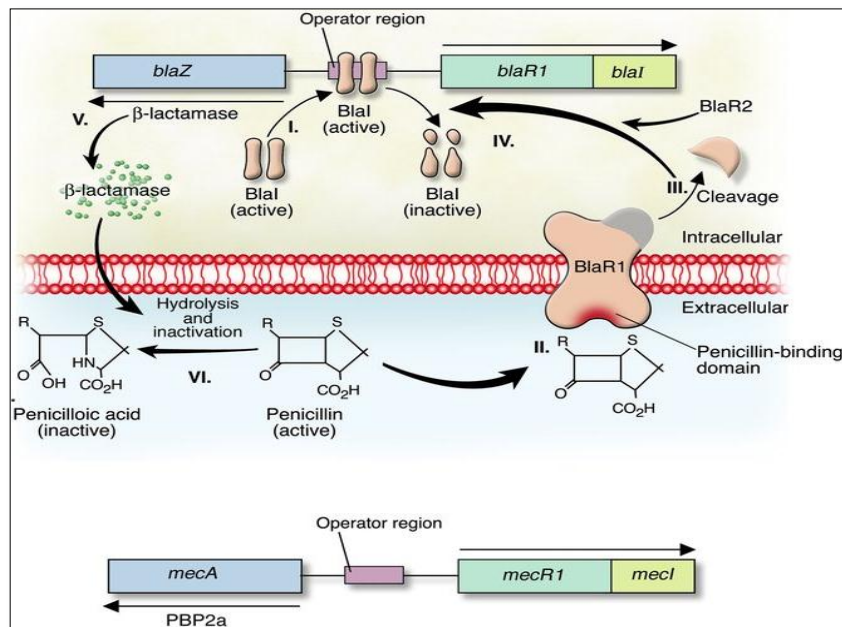


Figure N° 05: Le complexe du gène *mecA* (Lowy, 2003)

L'origine du gène *mecA* est incertaine. L'hypothèse la plus probable est que ce gène proviendrait d'un homologue du gène *mecA* présent chez *Staphylococcus sciuri* qui a 88% de similarité au niveau des acides aminés (Deurenberg et al, 2008). Cet homologue aurait subi des mutations, car *S. sciuri* n'est pas résistant à la méthicilline et l'introduction du gène provenant de cette bactérie dans une souche de *S. aureus* sensible, ne rend pas cette souche résistante (Wu et al, 2001). Les cassettes *mec* sont composées de plusieurs éléments situés dans la région X (*orfX*). Ces cassettes comprennent plusieurs gènes dont le complexe de gènes *mec*, le complexe de gènes *ccr* ainsi qu'une région J (IWG-SCC 2009). Ces complexes et régions, selon leurs arrangements et compositions, servent à différencier les cassettes *mec* (figure N° 06).

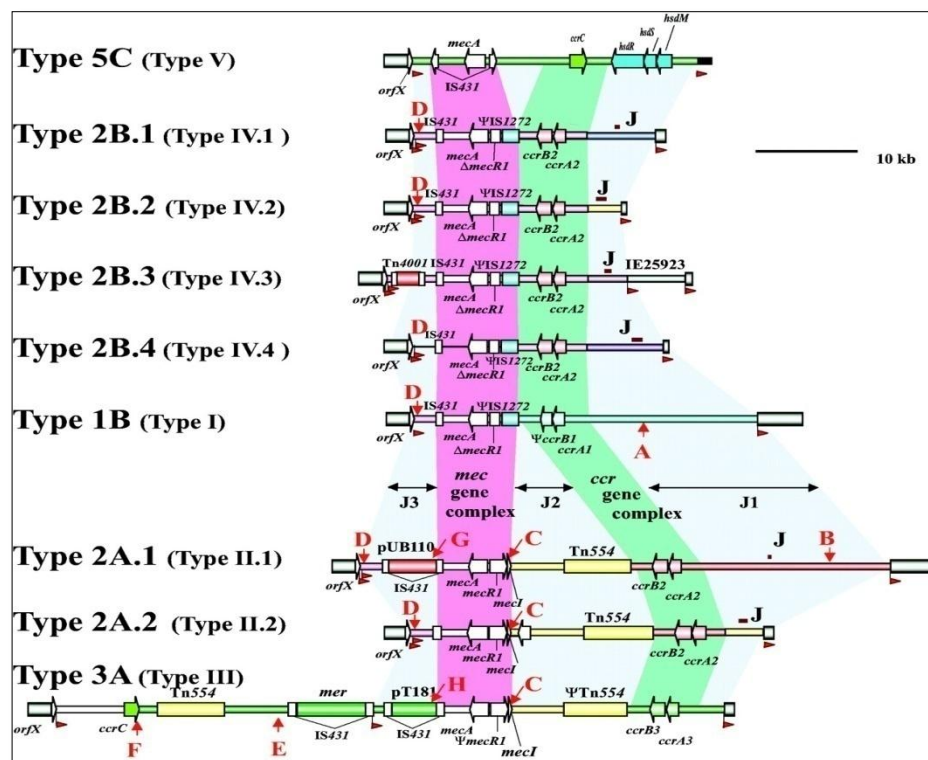


Figure N° 06 : Représentation de différents types de SCCmec
(Chongtrakoo et al, 2006)

2.2. Facteurs influençant l'expression de la méthicillino-résistance

Plusieurs autres gènes sont impliqués dans l'expression de la résistance à la méthicilline. Il s'agit des gènes auxiliaires *fem* pour «factors essential for methicillin resistance») nécessaires dans l'expression de la résistance de haut niveau chez les

souches présentant une résistance hétérogène à la méthicilline (Berger-Bächi, 1994 et 1995). Leur existence a été initialement suspectée devant l'absence de relation d'une souche à l'autre entre le niveau de résistance et le niveau d'expression de PLP2a. Ces autres gènes de résistance sont trouvés chez toutes les souches de *S. aureus*, indépendamment de la présence du gène *mecA*. Ils ne sont pas responsables à eux seuls de la résistance à la méthicilline, mais peuvent augmenter le niveau de résistance chez une souche SARM. Les protéines *FemA*, *FemB* et *FemX* sont impliquées dans la synthèse du pont pentaglycine qui lie les chaînes glycanes. *FemX* catalyse l'incorporation de la première glycine, *FemA* celle des glycines 2 et 3, et *FemB* ajoute les glycines 4 et 5. *FemA* et *FemB* ne sont pas interchangeables. Par conséquent, l'inactivation des gènes codant pour chacune de ces protéines conduit à l'obtention d'une paroi cellulaire déstructurée contenant des ponts mono- ou triglycine respectivement (Ehlert et al, 1997). L'inactivation de *femA* ou *femB* conduit à une large réduction de la résistance à la méthicilline et à une augmentation de la sensibilité à plusieurs antibiotiques. Mais la compensation de l'inactivation par mutations peut restaurer la viabilité cellulaire et la résistance à la méthicilline. Cependant la croissance est sévèrement affectée (Hübscher et al, 2007).

3. Résistance de *S.aureus* aux glycopeptides:

La vancomycine et la teicoplanine sont des antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à coques à Gram positif, essentiellement les staphylocoques, les streptocoques et les entérocoques, en cas de multirésistance aux antibiotiques et d'intolérance aux β -lactamines. Ces antibiotiques constituent le traitement de choix dans les infections à SARM. Les glycopeptides présentent de nombreuses limitations: une bactéricidie lente, une fluctuation de CMI, une faible pénétration intracellulaire, une toxicité potentielle, et enfin le développement de la résistance souvent associée à un échec thérapeutique (Levine, 2006).

3.1. Mécanisme d'action:

Les glycopeptides inhibent la synthèse du composant essentiel de la paroi cellulaire, le peptidoglycane. L'inhibition est due à l'affinité de ces antibiotiques pour l'extrémité (Dalanyl-D-alanine) des précurseurs du peptidoglycane. Ceux-ci, après avoir été

synthétisés dans le cytoplasme bactérien, sont transportés à travers la membrane cytoplasmique pour finalement être branchés par des enzymes (transglycosylases et transpeptidases) au peptidoglycane en cours d'élongation. La fixation du glycopeptide sur l'extrémité du précurseur empêche, par encombrement stérique, son branchement au peptidoglycane (Daurel et Leclercq, 2010) (Figure N° 7).

3.2. Résistance à la vancomycine :

La résistance à la vancomycine fut rapportée pour la première fois chez les entérocoques en 1988 et les premières souches de SARM portant le gène *vanA* ont été isolées au Michigan en 2002. Depuis cette date, des souches VRSA ont été isolées dans d'autres pays du monde (Ng et al, 2011). La résistance de VRSA est acquise par transposition du gène *vanA* de souches d'*Enterococcus faecalis* résistantes à la vancomycine chez les patients coinfectés (Showsh et al, 2001). L'opéron *van* code pour une déhydrogénase *VanH*, qui réduit le pyruvate en D-lactate, et une *VanA*-ligase qui catalyse la formation d'une liaison ester entre la D-alanine et le D-lactate. Le résultat de l'action de ces deux enzymes est la synthèse d'un nouveau précurseur de synthèse du peptidoglycane se terminant par le depsipeptide D-alanyl-D-lactate au lieu du dipeptide D-alanyl-D-alanine. Ainsi, il se forme une liaison ester terminale au lieu d'une liaison amide nécessaire dans la formation des ponts hydrogènes avec la vancomycine, ce qui entraîne une réduction de l'affinité de la vancomycine pour la chaîne pentapeptide. (Ng et al, 2011).

Suivant les recommandations du CLSI, une souche de *S. aureus* est dite sensible à la vancomycine si sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est ≤ 4 mg/L. Une souche de *S. aureus* de sensibilité intermédiaire à la vancomycine (GISA ou VISA pour *Glycopeptide ou Vancomycin Intermediate-sensitive Staphylococcus aureus*) se définit par une CMI comprise entre 8 et 16 mg/L. Les souches résistantes à la vancomycine (VRSA pour *Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus*) ont une CMI > 32 mg/L (Tiwari, 2009; Ng et al, 2011).

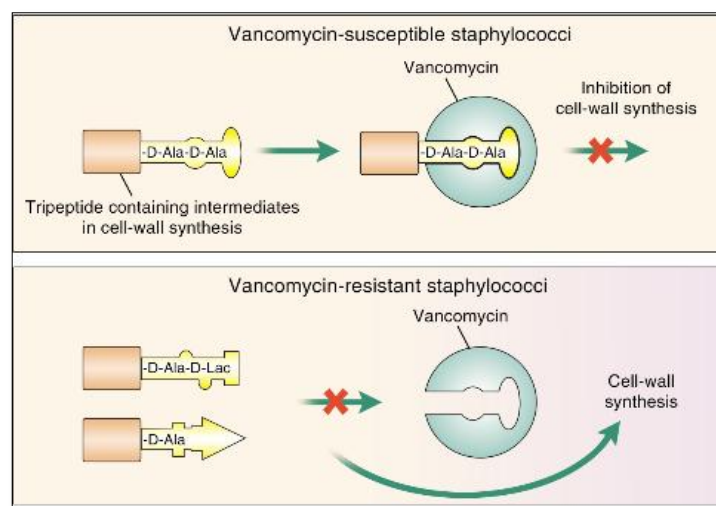


Figure N° 07: Mécanismes d'action de la vancomycine et de résistance de *S. aureus* à la vancomycine (Lowy, 2003)

3.3. *S.aureus* de sensibilité intermédiaire à la vancomycine (VISA)

Depuis la découverte de SARM de sensibilité diminuée à la vancomycine au Japon en 1996, plusieurs rapports similaires font état de l'isolement de ces souches à travers plusieurs pays du monde, y compris en Afrique (Gemmell, 2004; Mastouri et al, 2006; Touaitia et al, 2015).

La réduction de la sensibilité à la vancomycine est due aux changements affectant la biosynthèse du peptidoglycane et à l'activité autolytique (Reipert et al, 2003). Les souches VISA synthétisent des quantités additionnelles du peptidoglycane avec un accroissement du nombre de résidus D-ala-D-ala qui fixent la vancomycine. Ainsi, le mécanisme de résistance à la vancomycine est lié à un épaissement de la paroi bactérienne qui piège la vancomycine dans les couches superficielles du peptidoglycane l'empêchant ainsi d'atteindre la membrane cytoplasmique où le peptidoglycane est synthétisé (Hiramatsu, 2001).

3.4. La résistance hétérogène des souches VISA :

Ces souches sont identifiées comme sensibles à la vancomycine (CMI de 2 à 4 mg/l) mais présentent des sous-populations de sensibilité diminuée (CMI de 6 à 8 mg/L) (Hiramatsu, 2001). Leur signification clinique et la nécessité de les identifier ne sont

pas consensuelles. Cependant, elles pourraient constituer le principal réservoir des souches VISA/GISA.

Alors que la détermination des CMI permet d'identifier les souches GISA (contrairement à la diffusion en milieu gélosé et aux techniques automatisées qui ne sont pas appropriées), l'identification des souches hétéro-GISA est plus difficile. En effet, l'inoculum utilisé pour la détermination des CMI (10^{-4}) est inférieur à la proportion de bactéries de sensibilité diminuée dans la population des souches hétéro-VISA (10^7 à 10^5). Cependant, certains critères permettent de suspecter un hétéro-VISA. Par la méthode de diffusion, un diamètre d'inhibition < 17 mm pour la vancomycine ou la teicoplanine, ou un diamètre d'inhibition de la teicoplanine inférieur ou égal d'au moins 3 mm à celui de la vancomycine peuvent être évocateurs. (Lee, 1995).

4. Résistance de *S.aureus* aux aminosides :

Les staphylocoques sont normalement sensibles à tous les aminosides, antibiotiques bactéricides, concentration dépendante. Les aminosides sont surtout utilisés en association avec les β -lactamines ou les glycopeptides (Bismuth et Leclercq, 2000).

4.1. Mécanisme de résistance:

Le principal mécanisme de résistance aux aminosides (kanamycine, amikacine, tobramycine, gentamicine) est lié à des modifications de la cible ribosomale par des enzymes codées par des gènes plasmidiques ou transposables. Il existe trois enzymes de résistance, chacune d'entre elles conférant un phénotype de résistance spécifique aux aminosides

- Une résistance de haut niveau à la kanamycine et l'amikacine (phénotype K); la résistance à la kanamycine traduit la présence d'une enzyme inactivatrice aminoglycoside phosphotransférase (3')-III.
- Une résistance de haut niveau à la kanamycine, à l'amikacine et à la tobramycine (phénotype KT); la résistance à la kanamycine et à la tobramycine due à la production d'un aminoglycoside nucléotidyltransférase (4') (4'').

- Une résistance de haut niveau à la kanamycine, à l'amikacine, à la tobramycine et à la gentamicine (phénotype KTG) due à la synthèse d'une enzyme bifonctionnelle, aminoglycoside acétyltransférase (6')-phosphotransférase (2''). (Quincampoix et Mainardi, 2001 ; Leclercq , 2002).

5. Résistance de *S.aureus* aux macrolides:

Les macrolides ont une activité bactériostatique sur les staphylocoques, seules les streptogramines, association de deux composés agissant en synergie, ont une activité bactéricide temps dépendante (Bismuth et Leclercq, 2000).

5.1. Mécanisme de résistance :

Les Macrolides, Lincosamides et Streptogramines (MLS) inhibent la synthèse protéique en stimulant la dissociation entre ribosomes et l'ARN de transfert. Les mécanismes de résistances aux macrolides (érythromycine, spiramycine), lincosamides (clindamycine) et streptogramines (pristinamycine, quinupristine-dalfopristine) comprennent la modification de la cible, des systèmes d'efflux et des enzymes inactivatrices.

Le mécanisme le plus fréquemment en cause est la production d'une enzyme d'origine plasmidique qui modifie la cible ribosomale par méthylation. La résistance est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B (pristinamycine I et quinupristine), d'où son nom de MLSB, car ces antibiotiques ont des sites de fixation communs. La résistance MLSB est dite inductible quand la méthylase est produite seulement en présence de macrolide inducteur (comme l'érythromycine), ou constitutive, lorsque la production est permanente, et indépendante de l'antibiotique (Leclercq, 2002).

III- Epidémiologie :

Depuis leur apparition au début des années 1960 les souches de SARM se sont rapidement répandues sur l'ensemble des continents. La prévalence des SARM dans le monde est très hétérogène et variable : elle varie avec les régions, la période d'étude, les services et les conditions de vie des populations concernées.

L'étude effectuée par l'« European Antimicrobial Persistence Surveillance System » (EARSS) de 1999 à 2002 sur la prévalence du SARM dans 26 pays Européens, s'en est sortie avec un taux global de prévalence égal à 20 %, variant de 0,5 à 44,4 % selon un gradient croissant nord-sud (Tiemersma et al, 2004). Dans certains pays du Sud de l'Europe, les fréquences de SARM sont très variables, allant de 5 à 50%. La Roumanie enregistre le taux de SARM le plus élevé avec plus de 50% des souches (Decousser et al, 2003).

Selon le réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN 2013) et en termes de densité d'incidence, les taux de SARM ont diminué en France depuis une dizaine d'années passant de 0,59 cas pour 1 000 journées d'hospitalisation en 2006 à 0,38 cas pour 1 000 journées d'hospitalisation en 2011.

La situation ne demeure pas meilleure aux Etats-Unis et au Canada, puisque la proportion des SARM isolés au sein des établissements hospitaliers est passée de 35,9 % en 1992 à 64,4 % en 2003 avec une incidence d'environ 1.600.000 victimes par an aux Etats-Unis (Klevens et al, 2006) ; Au Canada la prévalence est passée de 16,6 % en 2002 à 48 % en 2003 avec une mortalité moyenne de 30 % des cas (Honeyman et al, 2002).

En revanche, les données épidémiologiques en Afrique s'estiment rares. Les données semblent plus hétérogènes selon les pays, le nombre des souches de SARM est plus élevé en Afrique noire (21 à 30%) (Kesah et al, 2003).

Une étude récente menée en République Démocratique du Congo sur le portage nasal des staphylocoques conclut à une prévalence des SARM de 63,1%, 66,7%, et 23,3% respectivement chez les patients hospitalisés, le personnel soignant et chez les patients en ambulatoire (Vlieghe et al, 2009).

Dans les pays du Maghreb les taux de SARM sont variables et en augmentation. Au Maroc, dans une étude prospective qui a duré deux années, de mars 2006 à mars 2008 et qui a été réalisée dans deux hôpitaux universitaires à Rabat, Le taux de résistance de *S. aureus* à la méthicilline était de 19,3% (Elhamzaoui et al, 2009). Une autre étude réalisée au centre Hospitalier Universitaire Internationale Cheikh Zaid de Rabat a montré que le *S. aureus* représentait 10% du total des germes isolés au niveau des services de réanimation avec 37,5% de souches résistantes à la méthicilline (Benouda and Elhamzaoui, 2009).

En Tunisie Les SARM ne constituent pas encore un problème de santé publique mais on pourrait assister les prochaines années à une émergence pouvant être liée, en partie, à la diffusion des souches hospitalières dans la communauté (Meddeb et al, 2009). Plusieurs études Tunisiennes hospitalières se sont intéressées à la prévalence des SARM. La première étude menée au service de réanimation des brûlés à l'hôpital Aziza Othmana sur 139 patients de 2000 à 2003 avait retrouvée une fréquence globale des SARM de 69 % (Halem et al, 2006). Une deuxième étude menée au laboratoire de microbiologie et d'immunologie de Sousse (Messadi et al, 2006), colligeant les infections communautaires et hospitalières avait isolé entre septembre 2003 et mars 2004 un SARM dans 12.9 % des cas. Une troisième étude menée au service de bactériologie de l'hôpital La Rabta de Tunis sur une période de 3ans (2003 à 2005), portant sur 817 souches de *S.aureus* avait retrouvée une prévalence du SARM de 20,6 %. Une augmentation de ce taux avait été notée, la résistance était passée de 17 % en 2003 à 28 % en 2005 (Zribi et al, 2006). La dernière étude est une étude prospective menée au service de Dermatologie et de Bactériologie de l'hôpital La Rabta de Tunis sur une période de trois mois (Février- Avril 2008) a signalé un taux de SARM de 32 % (Meddeb et al, 2009).

En Algérie, la fréquence de l'infection à SARM était estimée à 14 % au cours de l'année 2001 (Ramdani-Bouguessa et al, 2006). Les hôpitaux algériens ont de ce fait, démontré une augmentation importante de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline en ces dernières années (Bekkhoucha et al, 2008), avec un taux passé de 10 % en 1997 aux environs de 40 % en 2005 (Antri et al, 2010).

Selon le 13ème rapport d'évaluation du réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques en 2011, l'analyse globale des données concernant

l'espèce *Staphylococcus aureus* aboutit à un pourcentage de résistance à la méthicilline de 35,37 % des isolats. Les souches de *S. aureus* isolées en réanimation ont enregistré les taux de résistances les plus élevés à la méthicilline (45,74%) suivies des souches multirésistantes isolées en chirurgie (34%) et en médecine (18,5%). A Oran, le taux de SARM représentait 54 % de l'ensemble des souches de *Staphylococcus aureus* identifiées, en 2010, au niveau des services de réanimation adulte de l'Etablissement Hospitalier et Universitaire d'Oran (EHUO) (Dali-Yahia et al, 2010).

Les SARM sont aussi la cause des infections communautaires tant humaines qu'animales. Elles sont provoquées par des souches hospitalières qui ont disséminé en-dehors de l'hôpital. Les SARM communautaires ont émergé aux États-Unis à la fin des années 1990, dans des populations jeunes, sans facteur de risque particulier. Ces souches étaient génétiquement différentes de celle provenant des hôpitaux et provoquaient principalement des infections cutanées et des pneumopathies nécrosantes. Leur virulence est liée à la présence de la toxine de la Panton-Valentine.

La diffusion des différents clones des SARM communautaires est complexe et mal élucidée (Tristan et al, 2007). Le clone le plus répandu est le clone américain USA300, particulièrement épidémique. Ce clone a diffusé dans de nombreux pays dans le monde, notamment en Europe. En France, la prévalence de la résistance à la méthicilline chez les staphylocoques isolés en ville reste toutefois encore assez basse. La souche USA300 est présente en France, mais le clone principalement détecté est le clone ST 80 (Vandenesch et al, 2009). D'autres clones sont également présents en France (ST5, ST8, ST59, ST377).

Comme décrit dans d'autres parties du monde, SARM est aussi responsable d'infections communautaires en Afrique. Le profil génétique des souches africaines semble différent de celui rencontré dans les autres parties du monde (Shrestha et al, 2005). Les voyageurs et les migrants sont maintenant considérés comme des vecteurs majeurs de ces infections parmi les populations.

En Algérie Ramdani-Bougoussa et al ont signalé un taux très élevé d'infections communautaires et nosocomiales liées au SARM de type ST 80 dans une étude

réalisée au sein du CHU Mostapha Pacha en 2006. Une autre étude récente a été réalisée dans 4 hôpitaux situés à Annaba entre février et octobre 2010 a montré un taux important de SARM de 62.2% avec une propagation du clone européen ST80 d'origine communautaire (Alioua et al, 2014).

Quelques autres clones de SARM sont disséminés à travers le monde : on parle de SARM épidémique (SARME) (Witte, 2004). Par exemple, le clone ibérique isolé en Espagne en 1989 a été retrouvé par la suite dans différents pays d'Europe et aux Etats-Unis (Oliveira et al, 2001). Le clone brésilien isolé en 1995 a par la suite été retrouvé en Argentine, au Paraguay, au Portugal et en République Tchèque (Teixeira et al, 1995). En Grande-Bretagne, le clone SARME-16 est responsable de plus de 50% des infections à SARM (Moore and Lindsay, 2002). Ce comportement épidémique est lié en partie à un avantage sélectif de ces souches par la capacité à résister aux antibiotiques ou à survivre dans l'environnement hospitalier (Blanc et al, 2000). En dehors de l'hôpital, ces souches perdent leur avantage sélectif et sont rapidement remplacées par des SASM.

IV- Méthodes de typage des SARM:

Pour développer des stratégies de contrôle de la dissémination des SARM, une connaissance de leur évolution moléculaire est nécessaire. Pour cela de nouvelles méthodes basées sur l'analyse de l'ADN se sont très vite imposées du fait de leur supériorité en reproductibilité et en pouvoir discriminant, on parle alors de méthodes de typage moléculaire

1. Multilocus sequence typing (MLST) :

Le MLST est basé sur l'analyse des séquences de gènes conservés (house keeping genes) de *S. aureus*, soit les gènes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL*. Pour chaque gène, un allèle distinct est assigné à chaque séquence différente. Les allèles des sept gènes définissent la lignée de la souche et résulte en un profil allélique désigné séquence type (sequence type, ST).

L'évolution de cette méthode a mené à l'apparition des complexes clonaux (CC) et repose sur le même principe avec un nombre de variants de locus simple plus élevé (Malachowa et al, 2005).

2. Profil de macro restriction génomique par électrophorèse en champs pulsé (PFGE):

Le PFGE est l'une des méthodes les plus discriminantes pour le typage des *S. aureus*. Elle est considérée comme la méthode normalisée pour le typage des SARM. Lors de cette méthode de typage, l'ADN chromosomique des *S. aureus* est digéré avec l'enzyme de restriction *SmaI*. Cet enzyme est le plus utilisé dans la classification des souches d'origine humaine. Les fragments d'ADN résultants sont séparés sur gel d'agarose soumis à un champ électrique ayant un gradient de voltage alternatif. Le schéma de bandes qui en résulte est ensuite analysé par un logiciel. Les souches ainsi typées peuvent porter différents noms dépendamment du pays.

Aux Etats-Unis, elles portent le nom de USA suivi d'un numéro, en Europe, EMRSA suivi d'un numéro et au Canada, C-MRSA suivi d'un numéro (Khanna et al, 2008; Malachowa et al, 2005).

3. Typage du gène *spa*:

Le typage par le gène *spa* est basé sur le séquençage d'un seul locus de *S. aureus*. Il vise à déterminer la variation de la séquence de la région polymorphique X du locus de la protéine A (*spa*) (Frénay et al, 1996; Malachowa et al, 2005). La diversité du gène *spa* consiste principalement en un nombre de répétition de 24 pb. Le pouvoir discriminant du "*spa* typing" se situe entre ceux du PFGE et du MLST (Malachowa et al, 2005). Le partage d'information entre institutions pour cette méthode est relativement simple étant donné la mise en place d'un site de référence sur internet. Les souches typées portent le nom de type (t) suivi d'un numéro correspondant.

4. Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) :

Le typage par MLVA est basé sur la détection de courtes séquences répétées ayant un nombre de copies variables, comme les répétitions en tandem variables en nombre (variable number tandem repeats, VNTR) (Moser et al, 2009). Ces VNTR sont parfois hautement polymorphiques avec des variations dans le nombre d'unités répétées.

Les fragments correspondants aux VNTR de ces gènes sont amplifiés par PCR (Sabat et al, 2003). Suite à cette amplification, le poids moléculaire des fragments est évalué après une migration sur gel d'agarose et les données sont analysées avec un logiciel spécial.

Cette méthode est plus rapide que les autres et moins coûteuse, car elle ne nécessite aucun séquençage. (Schouls et al, 2009).

Matériels et méthodes

1. Objectif de l'étude :

Ce travail représente une étude prospective, portant sur 150 souches de *S.aureus* issues de prélèvements cliniques responsables des infections communautaires de la ville d'Annaba ont été recueillies au cours d'une période de deux ans allant de février 2010 à février 2012.

Les prélèvements provenant de divers produits pathologiques (urine, pus et muqueuse vaginale) ont été effectués selon la technique appropriée à chaque prélèvement ; ensuite, les souches de *S. aureus* ont été isolées et identifiées.

Les différentes manipulations microbiologiques et moléculaires ont été respectivement réalisées dans le laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquée à l'université de Annaba et le laboratoire de microbiologie du CHU Mostapha Bacha à Alger.

Les objectifs de cette étude consistaient à :

- Mettre en évidence la prévalence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline dans la communauté d'Annaba,
- Etudier le profil de résistance des SARM vis-à-vis différentes familles d'antibiotiques,
- Déterminer la fréquence des souches de SARM ayant une sensibilité diminuée au glycopeptides (GISA),
- Caractérisation moléculaire des souches SARM par la recherche du gène de résistance à la méthicilline et des gènes de virulence par PCR.

2. Isolement des souches bactériennes:

L'isolement des souches bactériennes a été réalisé à partir des tubes de bouillon nutritif présentant un trouble. Trois types de milieux ont été utilisés: la gélose chapman, gélose au sang frais (GSF) et gélose au sang cuit (GSC) et incubés pendant 18 à 24 h à 37°C.

3. Purification des souches:

Cette étape est basée sur les caractères culturels et la coloration de Gram. A partir des colonies isolées sur les différents milieux (Chapman, GSF et GSC), procéder directement à la coloration de Gram. Ensuite, sélectionner les colonies présentant des cocci à Gram positif. La purification se fait en poursuivant le repiquage sur le même type de milieu jusqu'à l'obtention d'un isolat pur présentant les mêmes caractéristiques que celui obtenu en premier isolement. La dernière culture pure doit être faite sur gélose nutritive pour faire l'objet d'autres tests (tests préliminaires, identification biochimique, antibiogramme...).

4. Conservation des souches:

La conservation de courte durée des isolats purifiés a été réalisée par ensemencement sur gélose nutritive inclinée par l'anse de platine. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

La conservation de longue durée des souches a été réalisée par piqure central dans la gélose de conservation en tube. Après incubation pendant 24 heures à 37°C. Les tubes ont été stockés à la température ambiante.

5. Identification des souches:

Suite aux études macroscopiques et microscopiques, toutes les souches ont été identifiées grâce aux tests biochimiques (production de catalase, DNase et de coagulase et confirmées par le test d'agglutination et la galerie miniaturisée API Staph (Bio Mérieux).

5.1. Recherche de la catalase:

✓ Principe:

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H_2O_2 dont l'accumulation a un effet létal pour les bactéries.

La catalase a la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 avec dégagement d' O_2) sous forme gazeuse selon la réaction suivante:



✓ **Technique:**

A partir d'un milieu solide et aérobie, prélever une quantité suffisante de culture et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame.

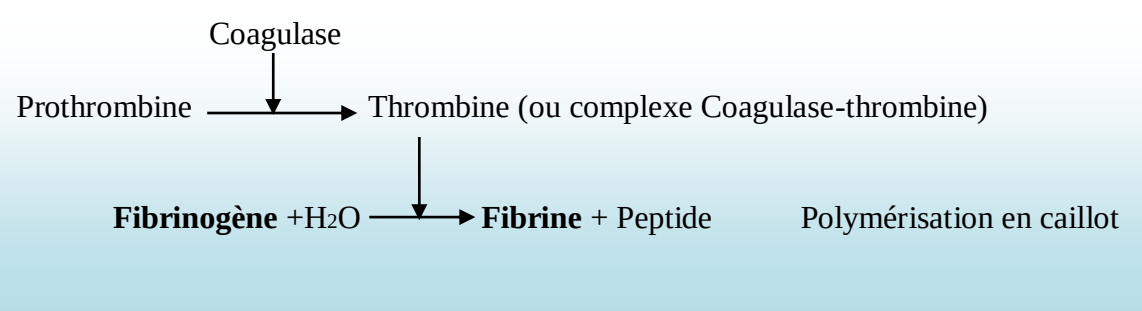
✓ **Lecture :**

La présence de catalase est marquée par la formation immédiate des bulles d' O_2 .

5.2. Recherche de la coagulase:

✓ **Principe:**

La propriété de *Staphylococcus aureus* de provoquer la coagulation d'un plasma recueilli sur anticoagulant est un critère important de son identification. Elle est due à la sécrétion d'une enzyme thermostable ; la staphylocoagulase ou coagulase. La staphylocoagulase agit en liaison avec la prothrombine et en absence de calcium.



Parmi les *staphylococcus*, pratiquement seul *Staphylococcus aureus* la possède, certaines souches de *S. aureus* peuvent en être dépourvues (10 à 15 % en milieu hospitalier), la perte de la coagulase étant souvent liée à un traitement antibiotique.

Dans l'organisme, l'action de la coagulase est à l'origine de microcaillots de fibrine à l'intérieur desquels les bactéries peuvent proliférer à l'abri des défenses de l'organisme.

La recherche de la coagulase de *Staphylococcus* est compliquée par la présence d'un récepteur au fibrinogène provoquant l'agglutination de la souche placée dans un plasma oxalaté (on parle de coagulase « liée »).

✓ **Technique:**

- Réaliser une culture en bouillon BHIB.
- Etuver 24h à 37°C.
- Mettre dans un tube à hémolyse 4 gouttes de bouillon agité et 4 gouttes de plasma de lapin oxalaté.
- Placer le tube au bain d'eau à 37°C durant 2 à 24h.

✓ **Lecture:**

- Observer toutes les heures.
- une coagulation pourra être observée par une prise en masse du liquide (Joffin and Leyral, 2001).

5.3. Recherche de la DNase (Désoxyribonucléase):

✓ **Principe :**

Certaines bactéries sont capables d'hydrolyser l'acide désoxyribonucléique grâce à une enzyme : la DNase. La mise en évidence chez *Staphylococcus* d'une DNase thermostable suffit à l'identification de l'espèce *aureus*. La réaction catalysée est la suivante :



Les deux réactifs utilisés pour la recherche d'une DNase sont :

→ L'acide chlorhydrique HCl 1mol/dm³, qui précipite les molécules d'ADN combinées à des protéines.

→ Le bleu de toluidine qui se colore en rose en présence des composés d'hydrolyse de l'ADN.

5.3.1. Technique à l'acide chlorhydrique

- Les bactéries sont ensemencées en réalisant une strie large à la surface de la gélose à ADN. Il est possible d'étudier simultanément 4 ou 5 souches différentes sur une même boîte de Pétrie.
- Il faut ensuite incuber à 37°C jusqu'à obtention d'une culture suffisante, en générale le temps est 24 h.
- Après l'incubation, inonder la surface du milieu avec quelques millilitres d'HCl et réaspirer l'excès.
- Attendre 10 à 15 min (Denis et al, 2007)

✓ Lecture :

La lecture se fait sur un fond noir. Lorsque l'ADN est hydrolysé, un halo clair est visible au pourtour de la strie, alors que l'ADN, sous l'action de l'acide, est à l'origine d'un précipité blanchâtre.

5.3.2. Technique au bleu de toluidine

- A partir d'une culture en bouillon cœur cerveau, placer un aliquote de la culture agitée de 24h au bain d'eau à 100°C durant 15 min.
- Percer le milieu de cupules à l'aide d'un emporte-pièce ou d'une pipette Pasteur.
- Prélever une goutte de bouillon bouilli et la mettre dans une cupule.
- Faire de même avec une goutte de bouillon non chauffé.
- Incuber durant 4h à 37°C et faire une première lecture puis une deuxième à 24h.

✓ Lecture :

Rose : plus d'ADN donc **DNase+**

Bleu : ADN toujours présent, **pas de DNase** (Joffin and Leyral, 2001).

L'organigramme de la figure N° 8 illustre les étapes de l'identification de l'espèce *S.aureus* par la mise en évidence des tests précédents.

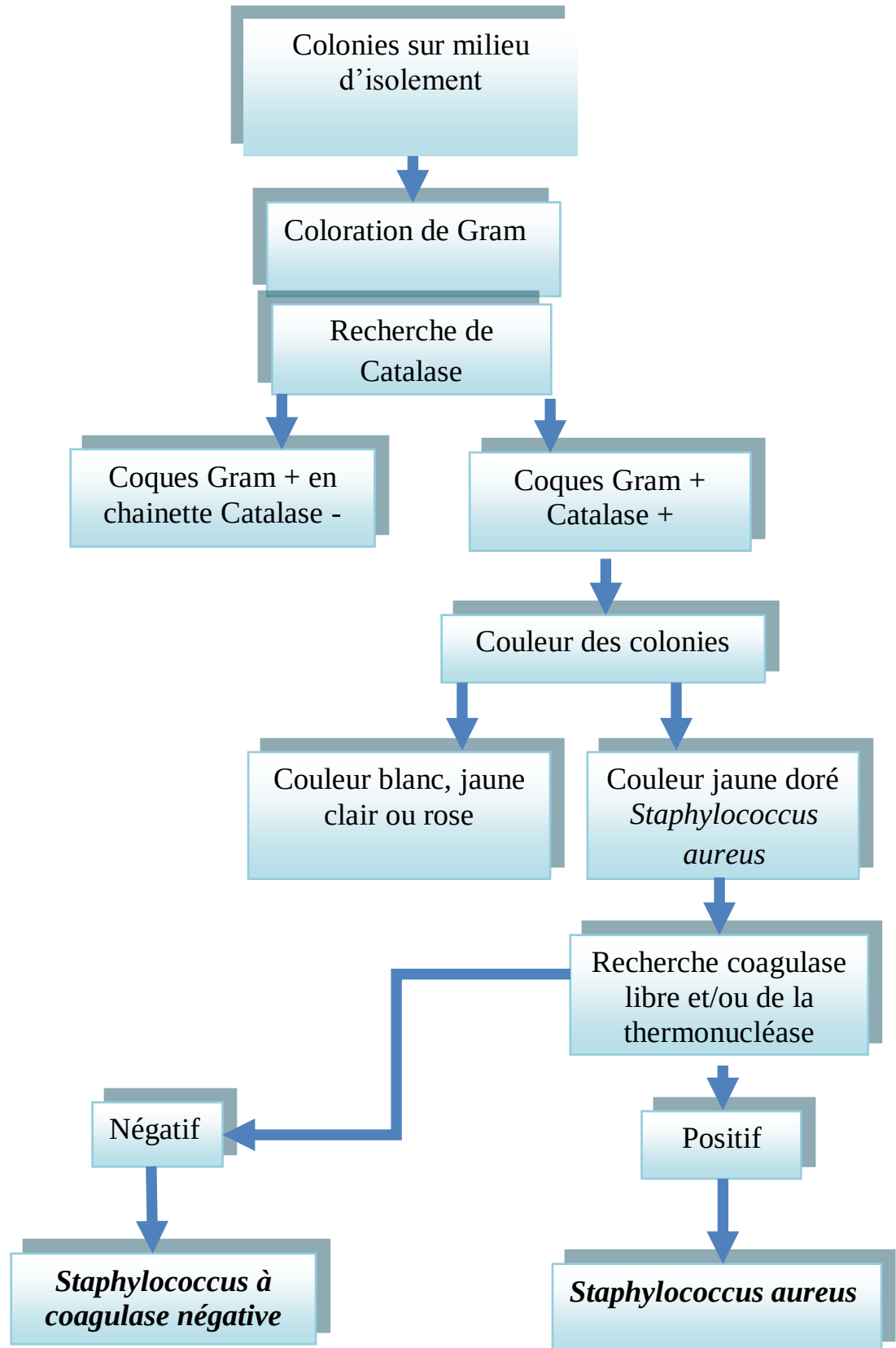


Figure N° 08 : Organigramme de l'identification de *Staphylococcus aureus*

6. Le test Pastorex Staph (Bio Rad):

✓ Principe:

Le réactif Pastorex Staph Plus comprend des particules de latex bleu sensibilisées avec du fibrinogène humain et des anticorps monoclonaux.

- du facteur d'affinité pour le fibrinogène, également appelé coagulase liée ou "clumping factor" de la protéine A par le fragment Fc des IgG de souris.
- de la protéine A qui possède une affinité pour le "fragment cristallisable" (Fc) des immunoglobulines gamma (IgG).
- des polysaccharides capsulaires de *Staphylococcus aureus*.

En présence de colonie de *S. aureus* on pourra observer une agglutination visible à l'œil nu

✓ Technique:

- Laisser les réactifs à température ambiante (18-25 °C) avant utilisation.
- Bien remettre en suspension les réactifs latex. Chasser les bulles retenues dans les compte-gouttes.
- Sur une carte jetable choisir deux cercles adjacents et les identifier.
- Dans l'un des cercles, déposer 1 goutte de R1 (latex anti- *S.aureus*) dans le deuxième, 1 goutte de R2 (latex contrôle négatif) veiller à tenir les flacons compte-gouttes verticalement lors de la distribution des gouttes.
- En utilisant des bâtonnets jetables différents (ou des oeses), ajouter les colonies suspectes dans chacun des deux cercles : soit 1 à 2 colonies de taille moyenne issue d'un milieu non sélectif (ex : gélose Columbia au sang), soit 3 à 6 colonies de petite taille issues d'un milieu sélectif (ex : milieu de Chapman).
- Mélanger soigneusement pendant 10 secondes à l'aide de bâtonnets jetables ou d'oeses. Bien étaler sur toute la surface des cercles.
- Donner à la carte un léger mouvement de rotation pendant 20 secondes et lire la réaction sous éclairage normal sans utiliser de loupe.

✓ **Lecture et interprétation :**

Un résultat positif est indiqué par l'apparition avec le réactif R1 d'une agglutination dans les 30 secondes (temps du mélange + temps de rotation de la carte) et par l'absence d'agglutination avec le réactif R2.

- Un résultat négatif est indiqué par l'absence d'agglutination avec les réactifs R1 et R2.
- La réaction est ininterprétable si le réactif R2 présente une agglutination.

Remarque :

- Si l'agglutination est très faible avec le réactif R1 ou si la réaction est ininterprétable, l'identification de la souche doit alors être effectuée par la recherche de la coagulase ou par l'étude des caractères biochimiques.
- Une réaction sous forme de filaments observés uniquement avec le R1 ne doit pas être considérée comme positive.

7. Système API Staph :

✓ **Principe:**

De nombreux dispositifs d'identification prêts à l'emploi sont proposés et fournissent des résultats fiables. Parmi ces systèmes la galerie API STAPH qui comporte 20 micro-tubes de substrats déshydratés permettant la différenciation de l'espèce *S.aureus* des autres espèces du genre *Staphylococcus*.

✓ **Technique:**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide
- Un inoculum bactérien d'opacité égale à 0,5 Mc Farland est préparé avec l'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure de 18 heures sur gélose Columbia au sang.
- À l'aide d'une pipette remplir l'eau physiologiqueensemencée dans les tubes de la galerie à l'exception des cupules sans pour autant dépasser le niveau des tubes.

- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leurs cupules d'huile de paraffine ensuite renfermer la boîte d'incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

✓ **Lecture:**

la lecture peut s'effectuer, soit directement par rapport aux résultats du tableau d'identification, ou bien après transformation de ces résultats en codes chiffré dont la signification est donnée par un index numérique (API web) (CLSI,2000 ; Murray, 2003).

8. Détection phénotypique de la méthicillino-résistance :

Différentes méthodes de détection de la résistance à la méthicilline ont été évaluées.

8.1. Méthode de diffusion du disque d'Oxacilline (1ug) :

✓ **Principe:**

Un disque d'Oxacilline (1ug) a été appliqué sur une Gélose MH additionnée 2% de NaCl pour la détection des SARM selon les directives de CLSI (the Clinical Laboratory standards Institute).

✓ **Lecture:**

Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, les souches sont considérées résistantes pour diamètre d'inhibition ≤ 10 mm, intermédiaires pour 11-12 mm et sensibles pour diamètres ≥ 13 mm (Rasheed et al, 2010).

8.2. Méthode de diffusion du disque d'Oxacilline (5ug) à 30°C:

Cette méthode permet de détecter la résistance hétérogène à la méthicilline de *S.aureus*. Déposer un disque d'oxacilline 5µg au centre de la boîte et incuber 24 à 48h à 30C°.

✓ **Lecture :**

- La présence de colonies isolées dans la zone d'inhibition autour du disque : SARM et résistance hétérogène.
- Présence de très petite ou pas de zone d'inhibition sans colonies isolées : SARM et résistance homogène (Owona et al,2002).

8.3. Méthode de diffusion du disque de Céfoxitine 30 µg :

✓ Technique:

La détection de la résistance intrinsèque à la méthicilline des souches de *S.aureus* repose sur l'étude de la sensibilité à la céfoxitine dans les conditions usuelles de l'antibiogramme par diffusion (gélose de Mueller-Hinton sans complément, inoculum aux environs de 5×10^6 UFC/ml, incubation de 24 heures à 37°C).

✓ Lecture:

Dans ces conditions toute souche « sensible » à la céfoxitine (diamètre ≥ 27 mm) doit être classée « SASM », alors que toute souche présentant un diamètre inférieur à 27 mm (souche non sensible) doit être considérée comme « SARM » (Elhamzaoui et al, 2009).

8.4. Test de screening à l'Oxacilline :

Le dépistage du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline a été réalisé sur milieu Mueller Hinton additionné de 4% de NaCl et contenant une concentration finale d'Oxacilline de 6 µg/ml selon les lignes directrices du CLSI 2012.

✓ Technique :

→ Préparation de la solution d'oxacilline:

- Diluer 6 mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1 g) dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis faire une solution au 1/10^{ème}.
- Mettre 2 ml de cette solution dans une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre, ajouter 18 ml de gélose Muller Hinton additionnée de 4% de NaCl, mélanger en faisant des mouvements rotatoires.

→ Inoculum:

- A partir d'une culture pure de 24 h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit équivalente à 0,5 Mac Farland, ou à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.
- L'ensemencement se fait par spots, en appliquant verticalement sur la gélose l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne.

- Les souches de références doivent être testées dans les mêmes conditions.
- Incuber 24 h à 37°C.

✓ **Lecture :**

La culture de plus d'une colonie de la souche test suffit pour indiquer une résistance à l'oxacilline, impliquant une résistance à toute les β -lactamines.

8.5.Détection de la résistance à l'oxacilline par la mise en évidence de la PLP2a (BioMerieux) :

Pour *Staphylococcus aureus*, la recherche de la PLP2a ne se fera qu'après le test de screening à l'oxacilline.

✓ **Principe :**

Les particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal dirigé contre la PLP2a vont réagir après extraction spécifiquement avec *S. aureus* méthicillino résistant (MRSA) entraînant l'apparition d'une agglutination visible à l'œil nu.

Les souches de *S. aureus* sensibles à la méthicilline (MSSA) n'agglutinent pas les particules de latex.

✓ **Technique :**

→ **Extraction :**

- Mettre 4 gouttes du réactif d'extraction 1 dans un tube pour micro-centrifugeuse.
- Prélever 3 öses pleines de culture (öse calibrée de 1µl).
- Décharger ces öses dans le liquide d'extraction 1.
- Fermer le tube à l'aide d'un bouchon.
- Mettre ce tube dans un bain-marie bouillant à température comprise entre 95°C et 100°C pendant 3 minutes.
- Retirer le tube et laisser refroidir à température ambiante.
- Ajouter une goutte du second réactif d'extraction puis homogénéiser la suspension.
- Centrifuger à 1500 g pendant 5 mn.
- L'agglutination se fera à partir du surnageant.

→ **Agglutination :**

- Ajouter une goutte de latex sensibilisé (par un anticorps monoclonal anti-PLP2a) dans le cercle test puis déposer 50µl du surnageant (extrait de culture).
- Bien mélanger le tout à l'aide d'un bâtonnet, en étalant le mélange sur toute la surface.
- Répéter cette technique d'agglutination pour le latex contrôle négatif.
- Donner à la carte, un léger mouvement de rotation manuellement ou à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 3mn.
- Observation : l'apparition éventuelle d'une agglutination. (Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale en médecine humaine et vétérinaire, 3ème édition 2005)

✓ **Lecture :**

- Présence d'agglutination : le test est positif : présence de PLP2a (MRSA+).
- Absence d'agglutination : le test est négatif : absence de PLP2a (MSRA-).

9. Test de sensibilité aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion de disque (Bio-Rad, France) en milieu gélosé Muller-Hinton (Bio-Rad) selon les recommandations décrites par la CA-SFM 2013 (comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie). Les antibiotiques testés sont mentionnés dans le tableau N° 02.

Tableau N° 02: les antibiotiques testés pour le *S.aureus* selon CA-SFM 2013

Antibiotiques	Charge du disque	Diamètres critiques	
		S	R
<i>Bêtalactamines</i>			
Pénicilline G	6 µg	≥ 29	< 29
Oxacilline	5 µg	≥20	< 20
Céfoxitine	30 µg	≥ 27	< 25
<i>Aminosides</i>			
Kanamycine	30 UI	≥15	<13
Amikacine	30 µg	≥15	<13
Gentamicine	15 µg	≥20	<20
Tobramycine	10 µg	≥20	<20
<i>Macrolides</i>			
Erythromycine	15 UI	≥22	<19
Lincomycine	15 µg	≥21	<17
Pristinamycine	15 µg	≥22	<19
<i>Glycopeptides</i>			
Vancomycine	30 µg	≥17	-
Teicoplanine	30 µg	≥17	-
<i>Cyclines</i>			
Tétracycline	30 UI	≥23	<21
Minocycline	30 UI	≥23	<21
<i>Autres</i>			
Ofloxacine	5 µg	≥22	<22
Chloramphénicol	30 µg	≥23	<23
Rifampicine	30 µg	≥29	<24
Fosfomycine	50 µg	≥14	<14
Acide fusidique	10 µg	<24	≥24
Triméthoprim	5 µg	≥20	≥16
Triméthoprim/sulfaméthoxazole	1,25+23,75 µg	<16	<13

✓ **Technique:**

- Repiquer une colonie à partir d'une culture pure développée de 24 heures sur un milieu d'isolement dans 10 ml de bouillon Cœur Cerveau (BHIB).
- Incuber à 37° C pendant 6 à 7 heures sous agitation.
- Grâce à un colorimètre, mesurer la densité optique de l'inoculum et ajuster en ajoutant la culture s'il est très faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est très fort, la densité optique doit être entre 0.08 et 0.1 à 625 nm équivalente à 10⁸ UFC /ml (0,5 Mc Farland).

- Dans les 15 minutes suivant l'ajustement de la turbidité de l'inoculum, tremper un écouvillon dans cette suspension.
- Presser fermement contre la paroi intérieure du tube juste au-dessus du niveau du liquide, tourner l'écouvillon pour enlever le liquide excédentaire.
- Etaler à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application afin d'obtenir une distribution égale de l'inoculum.
- Appliquer les disques d'antibiotiques sur les boîtes de Pétri dès que possible à moins de 15 minutes après l'ensemencement à l'aide d'une pince stérile.
- Incuber les boîtes à 35°C pendant 24 heures.

✓ **Lecture et interprétation:**

Mesurer avec précision les diamètres de chaque zone d'inhibition en mm, et classer la bactérie dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante.

Deux souches de référence (*S. aureus* résistant à la méthicilline ATCC 43300) et (*S. aureus* sensible à la méthicilline ATCC 25923) sont utilisées pour le contrôle de qualité de l'antibiogramme.

10. Détermination des CMI par test de sensibilité en microdilution (système d'inoculation PromptTM D) :

Le système d'inoculation Prompt est utilisé pour déterminer la CMI des antibiotiques et facilite la préparation de l'inoculum en éliminant; la période d'incubation et l'ajustement de la concentration de l'inoculum.

✓ **Principe :**

Le système d'inoculation Prompt est composé d'une pointe calibrée surmontée d'un collier, mécanisme qui permet l'élimination du surplus des colonies et d'un flacon de diluant.

✓ **Technique :**

- **Préparation de l'échantillon :**

Les échantillons doivent être préparés pour obtenir un premier isolement, incubé ensuite pendant 24 heures. Il est nécessaire d'avoir 3 colonies bien isolées, plus larges que l'extrémité de la pointe calibrée pour pouvoir utiliser le système d'inoculation du Prompt.

- **Préparation de la suspension bactérienne:**

- 1- Retenir le nombre nécessaire de flacons Prompt du coffret.
- 2- Retenir une pointe calibrée de la boîte
- 3- Tenir la pointe calibrée perpendiculaire à la surface de la gélose. Piquer 3 colonies aussi larges ou plus larges que l'extrémité de la pointe calibrée. Ne pas pénétrer dans la gélose. Ne pas racler les colonies. (figure N° 09-A)
- 4- Tenir la pointe calibrée d'une main et détacher le collier à l'aide de l'autre main en tirant fermement pour casser la connexion entre le collier et la pointe calibrée. Garder la pointe en direction du sol et à distance. (figure N° 09-B)
- 5- Faire glisser le collier doucement afin de l'enlever de la pointe calibrée et jeter le collier. (figure N° 09-C)
- 6- Prendre une bouteille d'inoculation Prompt.
- 7- Tordre le haut de la bouteille jusqu'à la rupture. (figure N° 09-D)
- 8- Placer la pointe calibrée dans la bouteille et bien l'enfoncer. (figure N° 09-E)
- 9- Mélanger la bouteille vigoureusement 8 à 10 fois pour homogénéiser. Si les bactéries s'homogénéisent mal, attendre 5 minutes et mélanger de nouveau. (figure N° 09-F)
- 10- La suspension doit êtreensemencée dans les 4 heures suivant la préparation. Si l'utilisation n'est pas immédiate, bien mélanger avant de l'utiliser.

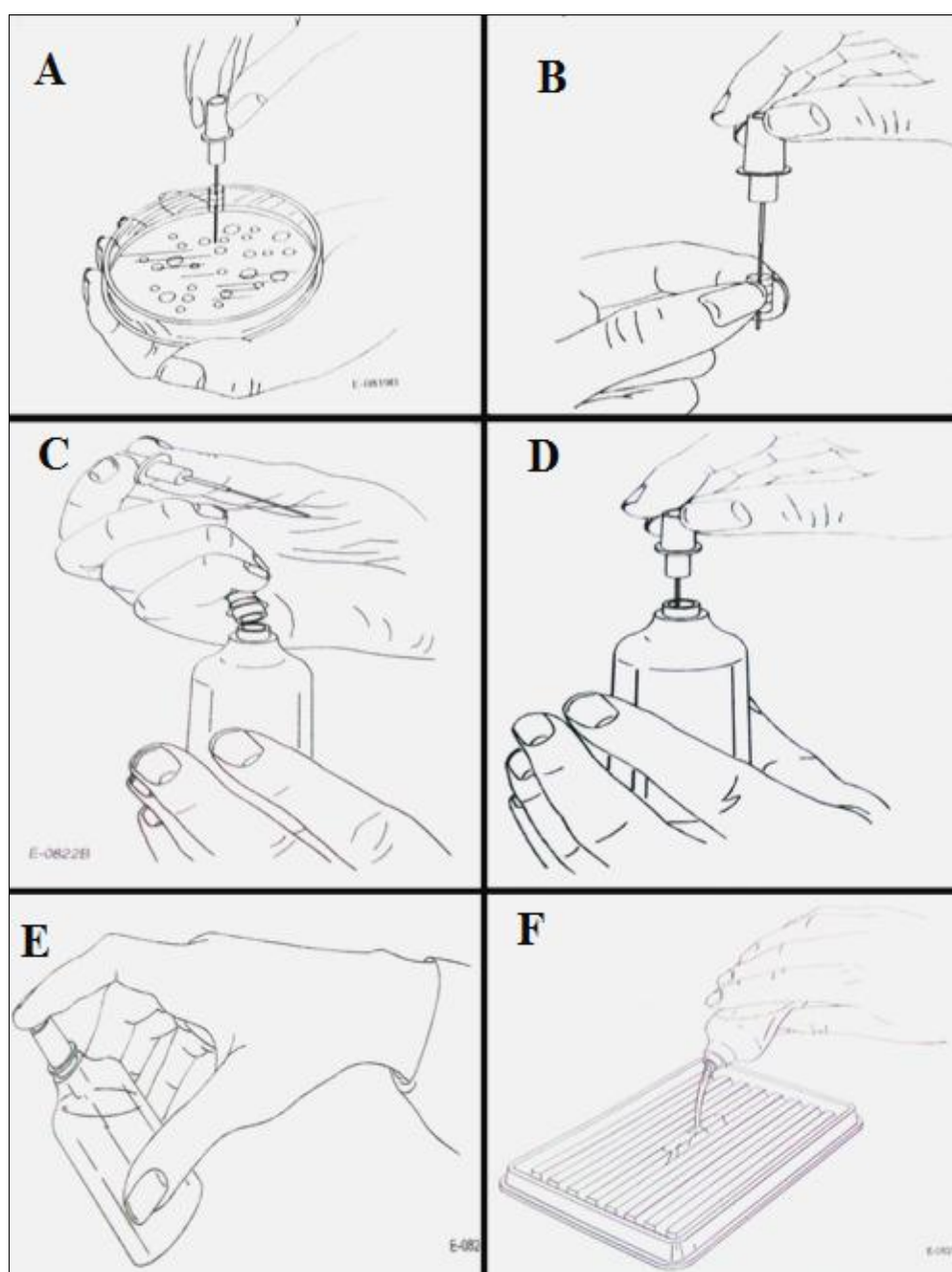


Figure N° 09: les étapes de microdilution CMI

- Inoculation :

Sélectionnez une surface de travail de haut niveau pour effectuer les opérations suivantes :

- Réunir l'unité de RENOK avec le couvercle de transfert ci-joint, puis placez le couvercle de transfert sur une plaque MicroScan (Figure N°10).
- Appuyer sur le bouton central de la libération de l'unité de RENOK pour inoculer la plaque.
- Éliminer le couvercle de transfert utilisé par le positionnement de l'unité RENOK®, avec le couvercle de transfert ci-joint, sur un conteneur pour déchets biologiques dangereux
- Appuyer sur les leviers de pick-up en utilisant le pouce et les doigts pour libérer le couvercle de transfert de l'unité de RENOK
- Incuber les plaques pendant 24 heures à 35 C° dans un incubateur non-CO₂.

✓ **Lecture:**

Les plaques peuvent être lues manuellement ou sur MicroScan instrumentation (autoSCAN)

- Après 24 heures d'incubation, enlever les panneaux de l'incubateur.
- Essuyez la partie inférieure du panneau avec un tissu non pelucheux pour éliminer toute condensation ou des débris qui peuvent être présents.
- Lire les plaques où la croissance est trouble. Ne lisez pas les concentrations si le contrôle est bien trouble, ou s'il n'y a pas de croissance.

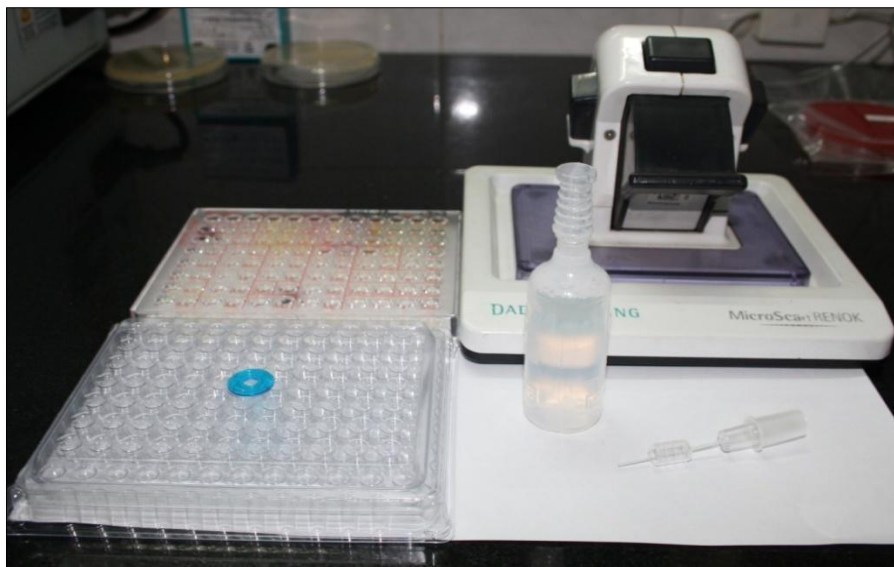


Figure N°10 : Système d'inoculation RENOK microscan

11. Recherche des phénotypes de résistance MLSB:

✓ Principe:

Les phénotypes de résistance MLSb ont été évalués en utilisant le test de la zone D avec les disques d'érythromycine (15 ug) et de la clindamycine (02 ug) dans toutes les souches présentant une résistance à l'érythromycine selon les recommandations de CLSI.

✓ Technique:

- Préparer une suspension bactérienne de 0,5 McFarland
- Ensemencer les boîtes de MH
- Appliquer les disques de clindamycine (2 µg) et d'érythromycine (15 ug) d'environ 15 mm d'intervalle (bord mesurée à bord).
- Incuber pendant 24 heures à 37 ° C.

✓ Interprétation:

L'apparition d'une zone d'inhibition claire en forme de D autour du disque clindamycine est désigné comme le phénotype D qui est étiqueté comme D + (figure N° 11).

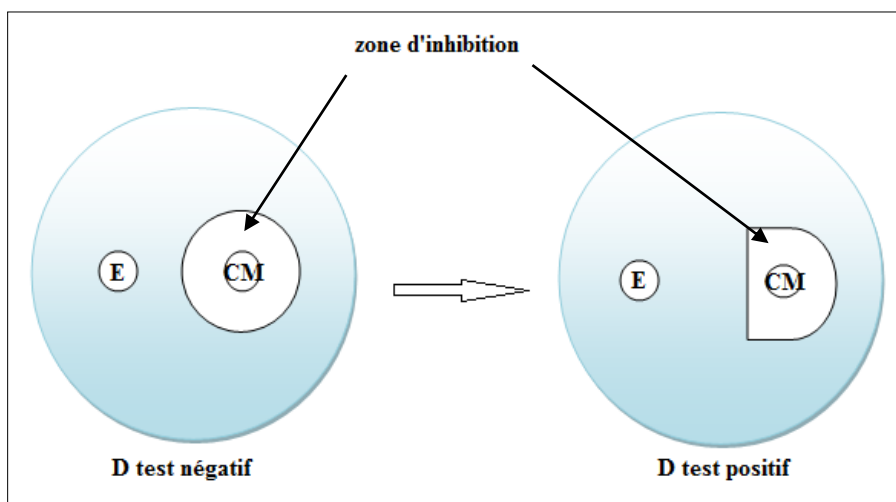


Figure N° 11: Schéma explicatif du D-test

12. Recherche de la résistance de *Staphylococcus aureus* à la vancomycine (Test de Screening)

✓ Principe:

Le test de screening de la résistance à la vancomycine est recommandé par le CLSI, il représente un test de criblage des souches en présence d'une concentration connue de vancomycine égale à 6µg/ml (CLSI 2008; Tenover et al, 2006).

✓ Technique:

- Préparer une solution de vancomycine dans de l'eau distillée stérile à une concentration de 6µg/ml.
- Mettre 2 ml de la solution dans une boîte de pétri et ajouter 18 ml de la gélose Cœur Cerveau (BHIA) en surfusion en mélangeant par des mouvements rotatoires.
- Couler une boîte témoin (20 ml du milieu cœur cerveau sans antibiotique).
- A partir d'une culture pure de 18 h sur milieu solide, repiquer une colonie isolée dans 5 ml de bouillon cœur cerveau.
- Incuber 4 à 6 h à 37° C sous agitation.
- Mesurer et ajuster la densité optique de l'inoculum entre 0.08 et 0.1 équivalente à 0.5 Mac-Farland ou 10⁸ UFC/ml, lue à 625 nm.
- L'ensemencement : Déposer en spots 10 µl de la suspension bactérienne.
- incuber 24 heures à 35° C±2°C.

- deux souches de références ont été testées dans les mêmes conditions :

1- témoin négatif : *S. aureus* ATCC 25923 **sensible**.

2- Témoin positif : *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 **résistante**.

✓ **Interprétation:**

- Absence de colonies: la souche est dite « sensible ».
- Présence de deux colonies ou plus, la souche est dite « résistante ».

13. Détermination de la CMI vis-à-vis de vancomycine par E-test :

✓ **Principe:**

Le principe de la CMI par E-test est basé sur la combinaison des deux concepts, dilution et diffusion. Le système E-test consiste en une bande en plastique, non poreuse, calibrée par un gradient préétabli de concentration d'antibiotiques, couvrant 15 dilutions pour déterminer la CMI en µg/ml d'une souche testée en milieu gélosé. Le gradient couvre une rangée de concentrations allant de 0,016 à 256 µg/ml, ou 0,002 à 32 µg/ml selon l'antibiotique.

✓ **Préparation de l'inoculum:**

L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 24 heures, dans de l'eau physiologique. La suspension a été calibrée à l'échelle 0.5 Mac Farland. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur la gélose.

✓ **Application des bandes:**

- Déposé la bande de E-test sur la gélose sèche à l'aide de l'applicateur en mettant l'échelle de la CMI face à l'ouverture de la boîte;
- Assuré après un bon contact entre la bande et la gélose en appuyant sur la bande en partant de la base.

NB : Il faut éviter de déplacer la bande après application du fait que l'antibiotique diffuse immédiatement après contact dans la gélose.

✓ **Lecture et interprétation :**

Après 24 heures d'incubation, ce qui rend la croissance bactérienne visible. Une ellipse d'inhibition symétrique, axée sur le support, se forme. Les bords de l'ellipse d'inhibition indiquent la valeur de CMI, exprimée en µg/ml.

Dans certains cas, une interprétation a été nécessaire lors de la lecture; en effet: l'observation d'un décrochage ou "dip" dans la zone de lecture a imposé de lire la CMI en extrapolant la courbe de l'ellipse;

- la présence de colonies "squatter" pouvait être analysée de différentes manières:
- En effet il pouvait s'agir d'une résistance hétérogène, de l'émergence de mutants résistants ou de mélanges bactériens.
- la présence d'une croissance bactérienne en ligne le long de la bandelette était certainement due à une gélose insuffisamment séchée avant de déposer la bandelette. Les points d'intersection sur la bandelette pouvaient être asymétriques: la CMI correspondait alors à la concentration la plus haute lue sur la règle.
- Une seconde lecture 48 heures après a permis de confirmer les résultats de la première lecture.

14. Détection de la sensibilité diminuée au glycopeptides (GISA):

La sélection des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides ainsi que la confirmation de cette diminution ont été réalisées selon les recommandations du CA-SFM 2013.

Après une incubation de 24 ou 48 heures en fonction de la composition du milieu, la valeur de la CMI correspond à l'intersection des deux ellipses où l'inhibition de la croissance est complète.

La présence de microcolonies au sein de l'ellipse doit être prise en considération. Ce phénomène est surtout observé avec la résistance hétérogène à la vancomycine.

La souche est dite sensible pour une CMI inférieure ou égale à 4µg /ml, intermédiaire pour $4 < \text{CMI} \leq 8\mu\text{g/ml}$ et résistante pour une CMI supérieure à 8 µg/ml.

15. Analyse de population :

La méthode d'analyse des populations permet de mettre en évidence l'existence de sous-populations capables de croître sur des concentrations croissantes de glycopeptides au sein d'une souche de *Staphylococcus aureus*.

✓ **Principe:**

Cette méthode consiste à déposer un inoculum fort (10^7 à 10^8 UFC/ml) sur des milieux MH contenant des concentrations croissantes de vancomycine. Les souches de *Staphylococcus aureus* homogènes et hétérogènes peuvent ainsi être détectées (Tenover et al, 2007).

✓ **Technique :**

- Préparer des boîtes de gélose nutritive contenant différentes concentrations de la vancomycine (1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 mg/l)
- Faire incuber une culture bactérienne de la souche à étudier dans le bouillon tryptone soja (TSB) pendant 24 heures.
- Préparer une suspension bactérienne d'environ 10^8 UFC/ml (D O = 0.3 à 578 nm ou 2 à 3 dilution de la suspension 0.5 McFarland).
- Préparer une série de 10 dilutions de la suspension bactérienne et disperser 50 μ l de chaque dilution sur une série complète de boîtes contenant l'antibiotique (Figure N° 12)
- Incuber à 37 ° C pendant 48h.

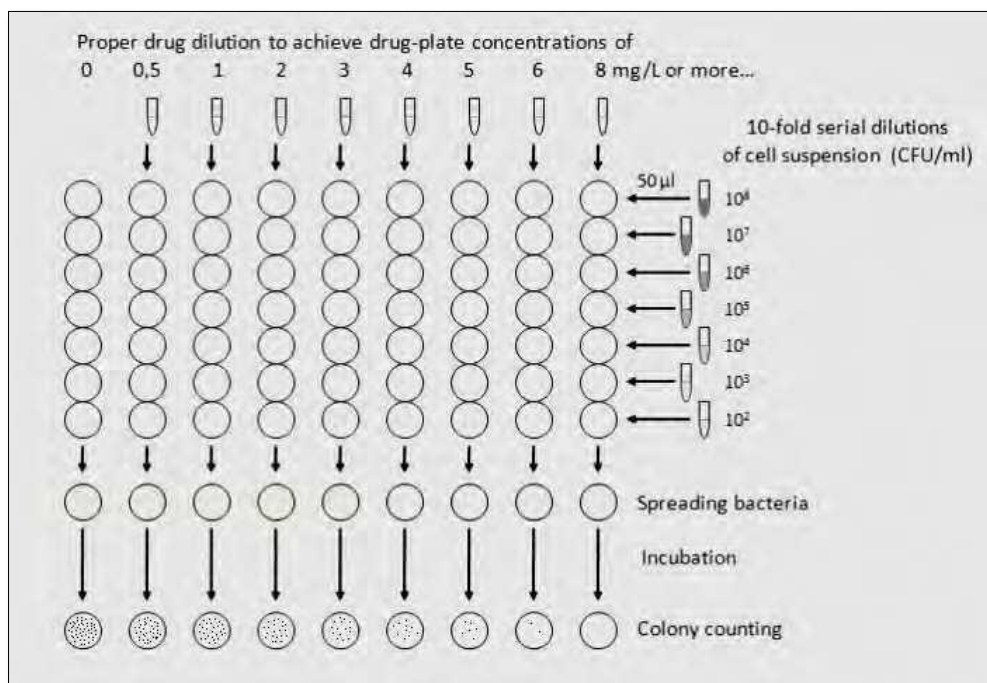


Figure N° 12 : Méthode d'analyse de Population (Meletis, 2012)

✓ **Lecture et interprétation :**

Comptez le nombre de colonies cultivées sur chaque plaque dans le tableau N°03.

Tableau N° 03 : Tableau de comptage des colonies (Meletis, 2012)

		Concentration de l'antibiotique								
		0.5	1	2	3	4	5	6	7	8
UFC/ml	10 ⁸									
	10 ⁷									
	10 ⁶									
	10 ⁵									
	10 ⁴									
	10 ³									
	10 ²									

- mentionne les dénombrements des colonies sur un graphique semi-logarithmique avec le nombre de colonies sur l'axe vertical et la concentration du de l'antibiotique sur l'axe horizontal (figure N° 13).
- Calculer la fréquence de sous-populations résistantes à la concentration de l'antibiotique la plus élevée en divisant le nombre de colonies cultivées sur une gélose contenant un antibiotique par les comptages de colonies à partir d'un même inoculum bactérien ensemencé sur une gélose sans antibiotique.
- Déterminer la CMI des sous-populations résistantes et réévaluer après repiquages quotidiens de série sur le milieu sans antibiotique pendant 7-14 jours afin d'évaluer si la résistance est stable (Meletis, 2012).

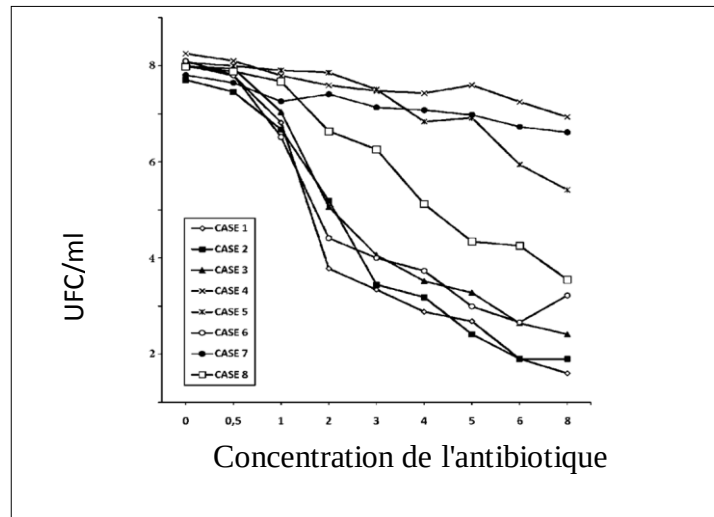


Figure N°13 : Graphe semi logarithmique du comptage des colonies testé pour une hétérorésistance en fonction de la concentration d'antibiotique (Meletis, 2012).

16. Détection des gènes de virulence par PCR:

Les méthodes d'étude de biologie microbienne suivent un schéma commun qui peut être divisé en trois étapes. Chacune doit être la plus performante possible pour assurer le meilleur seuil de détection de la méthode prise dans sa globalité.

Toutes ces méthodes débutent par une extraction de l'ADN. Cette étape est essentielle car la quantité et la qualité de l'ADN microbien récupéré conditionne les deux étapes qui constituent la suite de l'analyse (Vincent, 2006) :

- 1ère étape : Extraction de l'ADN
- 2ème étape : Amplification de l'ADN
- 3ème étape : Différenciation des produits PCR

16.1. Identification par PCR :

Différentes PCR peuvent être réalisées pour la détection spécifique d'espèces et l'identification des espèces et des souches sur des colonies isolées ou lors des traitements des mélanges. Elles ont en commun l'appareillage : thermocycler (Vincent, 2006)

✓ **Principe:**

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN. La réaction PCR nécessite 2 amorces oligonucléotidiques la séquence cible d'ADN devant être répliquée, chacune étant complémentaire à un des deux brins d'ADN. Les amorces sont généralement ajoutées en excès par rapport à la quantité d'ADN à amplifier dans le mélange réactionnel. Ce dernier est également composé de l'ADN polymérase, de dNTPs (désoxyribonucléotides triphosphate), de sels ($MgCl_2$, KCl), d'un tampon et de l'échantillon d'ADN.

La PCR est effectuée à l'aide d'une suite de cycles, comportant trois étapes chacun, la dénaturation, l'hybridation et l'extension (figure N° 14).

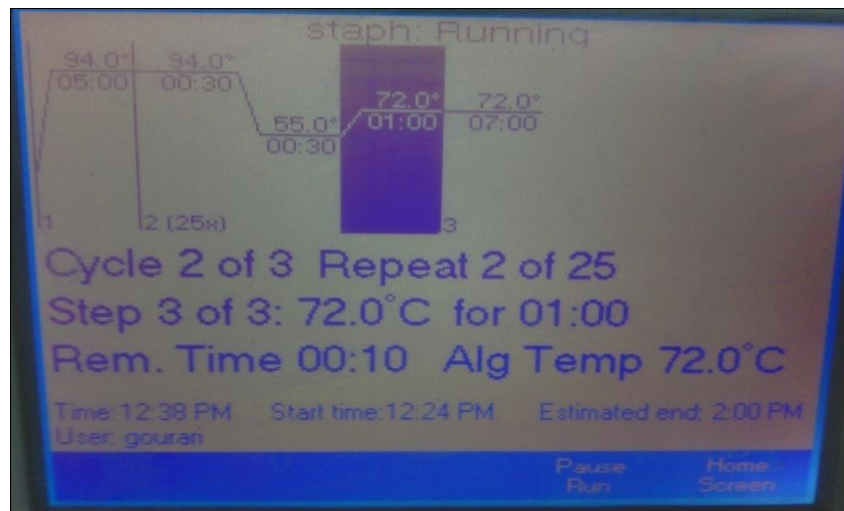


Figure N° 14 : Image représentative du programme de la PCR utilisé

La première étape consiste à dénaturer l'ADN double brin en ADN simple brin à l'aide de la chaleur, 94°C. Lors de la deuxième étape, le mélange réactionnel est refroidi à 45-60°C, chacune des amorces reconnaît et se lie à sa séquence complémentaire. Les amorces sont positionnées de manière à ce que leur extrémité 3' soit face à face afin que la synthèse d'ADN ait lieu dans la région se trouvant entre les deux amorces.

Lors de la dernière étape, l'ADN polymérase se lie à l'extrémité 3' de chaque amorce liée et utilise le dNTPs afin de pouvoir synthétiser un nouveau brin d'ADN dans la direction 5' à 3'.

Lors de cette étape, l'ADN polymérase possède une température optimale pour la réplication d'ADN de 72°C (Reece, 2004).

Après un cycle de la réplication PCR, une nouvelle copie de chaque brin d'ADN produit est synthétisée et le nombre de cycle peut varier entre 20 et 40. Le nombre de brins d'ADN répliqués lors de la PCR peut être estimé théoriquement jusqu'à l'application de 40 cycles, il est égal à 2^n (n = nombre de cycle) (Reece, 2004). Une fois la PCR terminée, les résultats peuvent être interprétés, par exemple par une électrophorèse sur gel d'agarose.

✓ **Technique:**

A- L'extraction de l'ADN

Plusieurs techniques d'extraction d'ADN sont possibles. Certaines permettent une extraction rapide et directe de l'ADN à partir des cellules. D'autres indirectes nécessitent de recourir à un protocole en plusieurs étapes. Le choix de ces méthodes dépend de la nature de l'ADN ciblé et de l'objectif de la manipulation (identification interspécifique ou intraspécifique d'une culture pure, résolution de mélange microbien) (Vincent, 2006).

L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée sur 12 souches bactériennes mises en croissance, dans le milieu gélosé au sang frais.

→ Préparation de l'échantillon

- Préparer une culture bactérienne de 24 h des souches à étudier
- Selon la densité de la culture, prendre 10 colonies de la culture bactérienne et mettre dans 1 ml d'eau ultra pure ;
- Centrifuger pendant 10 minutes à 4°C à vitesse maximale (13000 g).
- Jeter le surnageant et récupérer le culot ;
- Rajouter 300 µl d'eau ultra pure et passer dans un bain marie à 100°C pendant 10 min ;
- Faire un choc thermique en mettant les extraits dans de la glace
- Centrifuger pendant 10 min à vitesse maximale
- Récupérer l'extrait d'ADN dans le surnageant.

B- Amplification des gènes de résistance et des gènes de virulences par PCR duplex :

- PCR Duplexe *gyrA*- *mecA*:

L'amplification du gène *gyrA* a été réalisée afin de confirmer la qualité de l'ADN et de vérifier l'absence d'inhibiteur de PCR. La résistance à la méthicilline a été recherchée par la mise en évidence du gène *mecA* avec les amorces décrites dans le tableau N° 04.

- PCR Duplexe *Luk-PV*- *tst1*

Les 12 souches de SARM isolées ont fait objet de recherche du gène codant la toxine leucocidine de Pantone-Valentine (*Luk-PV*) et du gène codant la toxine du choc toxique staphylococcique (*tst*) en utilisant des amorces spécifiques illustrées dans le tableau N° 04. Ces gènes ont été recherchés pour évaluer la virulence des souches SARM.

Tableau N° 04 : Propriétés des couples d'amorces utilisées

Nom de l'amorce	Séquence	Références
Gène <i>mecA</i>		
<i>mec1</i>	5'GGGATCATAGCGTCATTATTC3'	Sung et al, 2008
<i>mec2</i>	5'AACGATTGTGACACGATAGCC3'	
Gène <i>gyrA</i>		
<i>gyr1</i>	5'- AATGAACAAGGTATGACACC- 3'	Brakstad et al,1992
<i>gyr2</i>	5'-TACGCGCTTCAGTATAACGC- 3'	
Gène <i>Luk-PV</i>		
<i>LukS-PV</i>	5'-GGCCTTTCCAATACAATATTGG-3'	Said-Salim et al, 2005
<i>LukF-PV</i>	5'-CCCAATCAACTTCATAAATTG-3'	
Gène <i>tst</i>		
<i>tst-1F</i>	5'-GAAATTTTTTCATCGTAAGCCCTTTGTTG-3	Schlievert et al, 2007
<i>tst-1R</i>	5'-TTCATCAATATTTATAGGTGGTTTTTCA-3'	

→ Préparation du master mix :

Pour chacun des deux gènes, un master mix est préparé selon le tableau N° 05 puis réparti dans des tubes PCR. Les échantillons d'ADN sont ensuite ajoutés et la PCR

peut avoir lieu. La préparation du master mix a été effectuée selon les instructions du fournisseur.

Tableau N° 05: Préparation du mix en volume pour l'amplification

Réactifs utilisés au cours de l'amplification:	Quantité en µl pour un essai	Quantité en µl pour le mix
Tampo Eurobio sans MgC12	4	64
MgC12 Eurobio 50Mm	4	64
Amorces solution emploi à 2 pico moles/ul	P1:2	32
	P2:2	32
DNTP	4	64
Eau PPI (ampoule Aguetant)	15	240
Taq polymérase Eurobio	0,4	6,4

- A partir du mélange mix, répartir dans chaque tube 35 µl.
- Ajouter 5 µl de chaque extrait génomique dans chacun des tubes.
- Mettre dans l'appareil PCR de type Bio Rad Thermal Cycler
- La taille des fragments amplifiés par les couples: *gyr1 - gyr2* : 280 pb , *mec1-mec2*:533 pb, *LukS-PV- LukF-PV*: 433pb, *tst1F-tst1R*: 180 pb .
- Réaliser 40 cycles PCR.

C- Détection des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose:

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet la séparation de fragments d'ADN de différentes tailles (200-15'000 pb) (Reece ,2004). Le gel d'agarose est un réseau complexe de polymère, composé d'agarose et d'un tampon aqueux. La taille des pores est déterminée par la composition de ce dernier et par la concentration et le type d'agarose utilisé. Plus les pores du gel sont grands, plus la taille des molécules que le gel peut séparer est grande. Les fragments d'ADN sont séparés par migration sur gel d'agarose à l'aide d'un champ électrique constant. L'ADN qui est chargé négativement migre à travers le gel en direction de l'électrode positive. D'une manière générale, les petits fragments ADN migrent plus vite que les grands.

L'ajout de bromure d'éthidium au gel d'agarose permet de voir apparaître les fragments d'ADN sur le gel. En effet, le bromure d'éthidium est capable de s'insérer entre les paires de bases empilées de l'ADN et permet, lors de l'illumination sous lumière UV du gel d'agarose, l'apparition de l'ADN sur le gel comme une bande de fluorescence (Reece ,2004)

→ Préparation du gel à 1,5%

- Peser 2 g d'agarose dans un Erlen de 500 ml.
- Ajouter 100 ml de tampon TAE 1X (1 fois concentré).
- Faire fondre ce mélange au four à micro-ondes, en arrêtant le four de temps en temps pour agiter. Le mélange doit être parfaitement transparent, sans particules d'agarose.
- Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue.
- Ajouter 10 µl de bromure d'éthidium (BET 10 mg / ml), homogénéiser.
- Couler lentement (sans faire de bulles) le gel dans le moule, sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne.
- Laisser refroidir, 10 minutes à température ambiante puis 15 minutes au réfrigérateur.
- Enlever le peigne et les joints. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.

→ Solution de dépôt sur gel d'agarose à 1,5 %

- Placer le support avec le gel dans la cuve d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode (-).
- Déposer 5 µl du marqueur de taille : 100 pb dans le premier puits.
- Densifier les échantillons d'ADN (10µl) en ajoutant 2 µl de la solution de dépôt qui contient trois marqueurs de migration différents.
- Remplir les puits, en changeant l'embout à chaque échantillon;
- Remplir la cuve de tampon TAE 1X de façon à ce que le gel soit immergé sous environ 1mm du tampon.
- Fermer le couvercle de la cuve à électrophorèse, brancher les fils et mettre sous tension.

- Laisser migrer en actionnant le générateur à 1,5 % 20 à 30 minutes entre 110 et 130 Volt.

✓ **Lecture:**

Lorsque la migration est suffisante, arrêter le générateur, ôter le gel de la cuve, et le déposer sur un trans-illuminateur de type Gel Doc XR+ BIO-RAD pour une visualisation. Une photo du gel peut alors être prise.

Les fragments d'ADN sont visualisés grâce au BET qui s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN. Les tailles des bandes et des produits PCR ont été déterminés par l'imageur.

Résultats

1. Les isolats bactériens:

Sur une période de deux ans allant de février 2010 à février 2012, 150 souches de *Staphylococcus aureus* ont été isolés à partir de différents prélèvements bactériologiques à visée diagnostique des infections communautaires de la ville d'Annaba.

La purification a été basée sur les caractères cultureux et les caractères morphologiques. Tout isolat pur donnant des cocci Gram positif a été retenu pour une éventuelle identification biochimique par la galerie API Staph.

1.1. Aspect macroscopiques et microscopique des isolats bactériens :

Les isolats bactériens ont montré divers aspects cultureux, en fonction du milieu de culture utilisé, permettant de suspecter leur appartenance au genre *Staphylococcus*.

- **Sur la gélose Chapman:**

Les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune, arrondies à bords réguliers de 1 à 2 mm de diamètre après 24 heures d'incubation à 37°C.

- **Sur Gélose au sang frais et gélose au sang cuit:**

Les colonies de *S.aureus* sont circulaires, volumineuses, opaques éventuellement pigmentées et de couleur jaune doré et légèrement bombées ou aplaties; elles présentent une surface luisante et humide.

Après coloration de Gram, l'observation microscopique a montré la présence de cocci à Gram positif en diplocoque et en grappes de raisin.

2. Identification biochimique

2.1. Les tests catalase, coagulase et DNase :

Les 150 souches ont été assignées à l'espèce *S.aureus* par la mise en évidence de la catalase qui les différencie des Streptocoques et la coagulase libre ainsi que la DNase qui les distinguent des Staphylocoques à coagulase négative.

2.2. Test d'agglutination Pastorex Staph plus:

Le test d'orientation rapide (Pastorex Staph plus) réalisé, a permis de confirmer les résultats des tests d'identification précédents où toutes nos souches prédéfinies *S.aureus* ont donné une agglutination en moins de 40 secondes (test positif = Identification de *Staphylococcus aureus*) (figure N° 15).

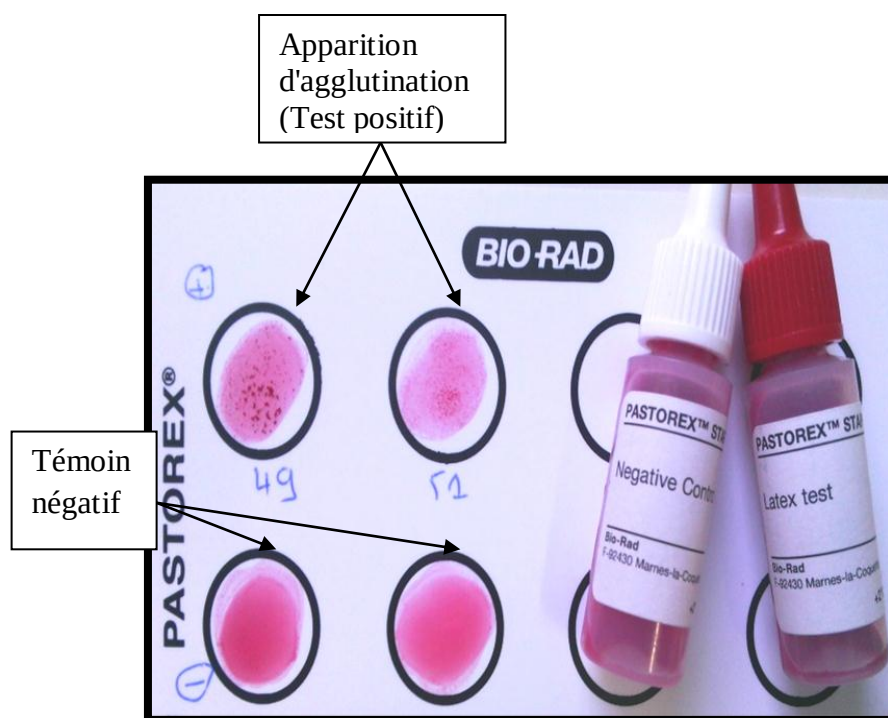


Figure N° 15: Identification de *S.aureus* par test d'agglutination

3. Biotypage des souches de *S.aureus* selon les profils numériques en API Staph

Les galeries API Staph miniaturisées reposant sur des tests enzymatiques (zymogramme) et des tests d'acidification ou d'utilisation des sucres (auxanogramme)

L'identification par ces galeries a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques de *Staphylococcus aureus* et à révéler 05 différents biotypes ce qui a permis leur assignation à l'espèce *Staphylococcus aureus* (tableau N° 06).

Tableau N° 06: Répartition des *S.aureus* selon le biotype

Biotype	% de <i>S.aureus</i> (n=150)
6736153	76 (51%)
6336153	39 (26%)
6736053	21 (14%)
6736113	11 (7%)
6636112	3 (2%)

4. Prévalence des souches SARM :

4.1.Répartition des SARM selon l'origine de prélèvement:

Quarante huit (71,6%) de SARM ont été isolées de pus, 12 souches (17,9%) des urines et 7 souches (10,4%) des prélèvements vaginales.

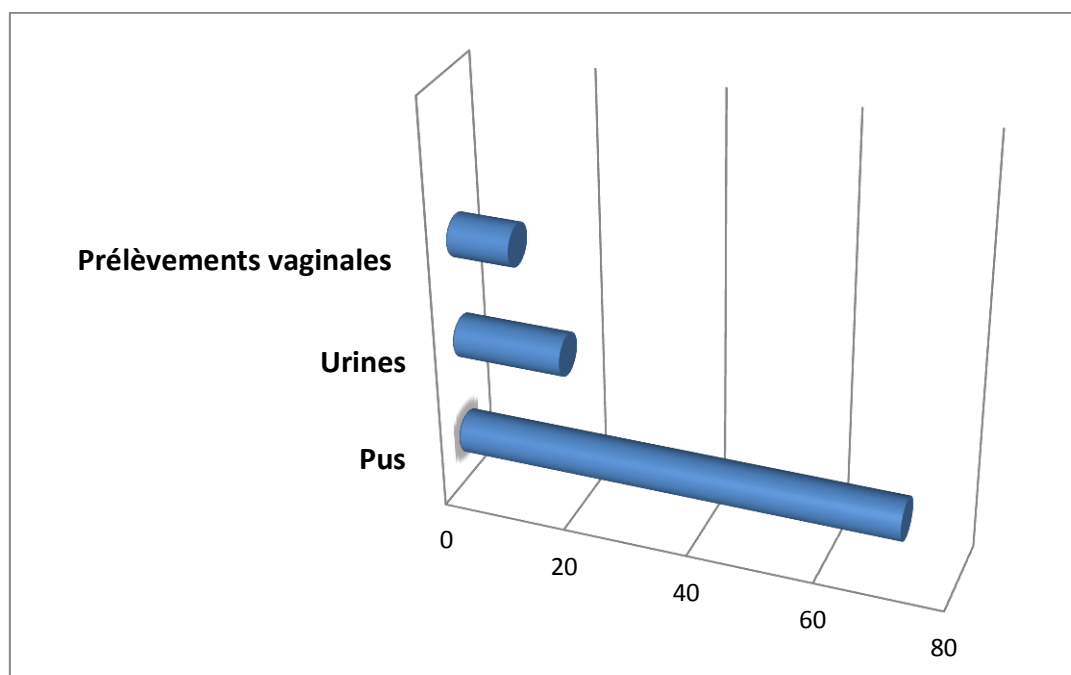


Figure N° 16 : Répartition des SARM selon l'origine de prélèvement

4.2. Répartition des SARM selon l'âge:

Parmi les 67 souches de SARM pour lesquelles l'âge du patient a pu être déterminé 52 (77,6%) ont été isolées chez des patients âgés de 18 ans à plus de 65 ans, 15 (22,3%) chez des enfants âgés de 1ans à 17ans.

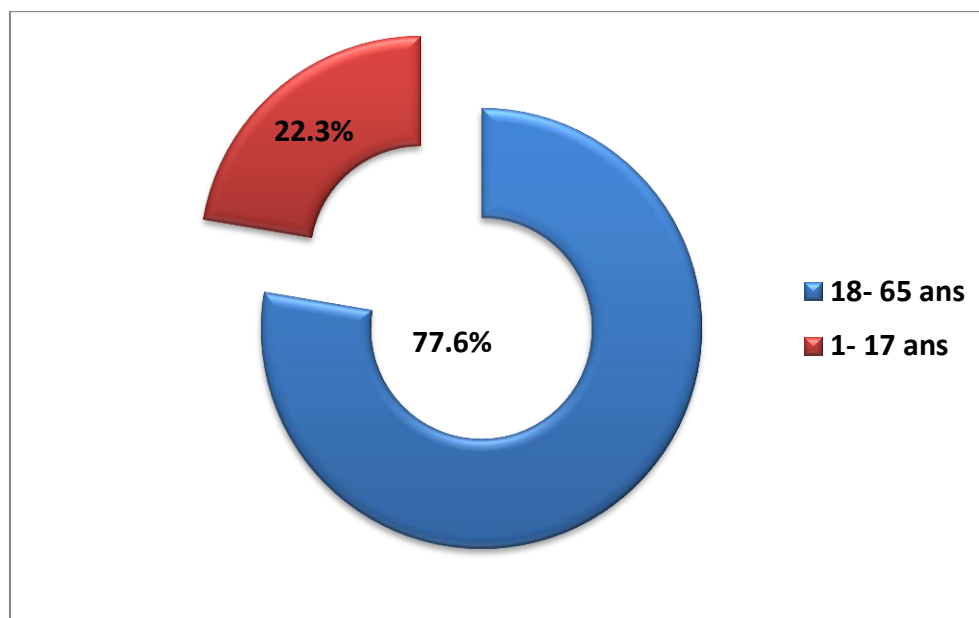


Figure N° 17 : Répartition des SARM selon l'âge

4.3. Répartition des SARM selon le sexe :

La plupart des souches isolées chez des patients du sexe masculin 48 (71,6%).

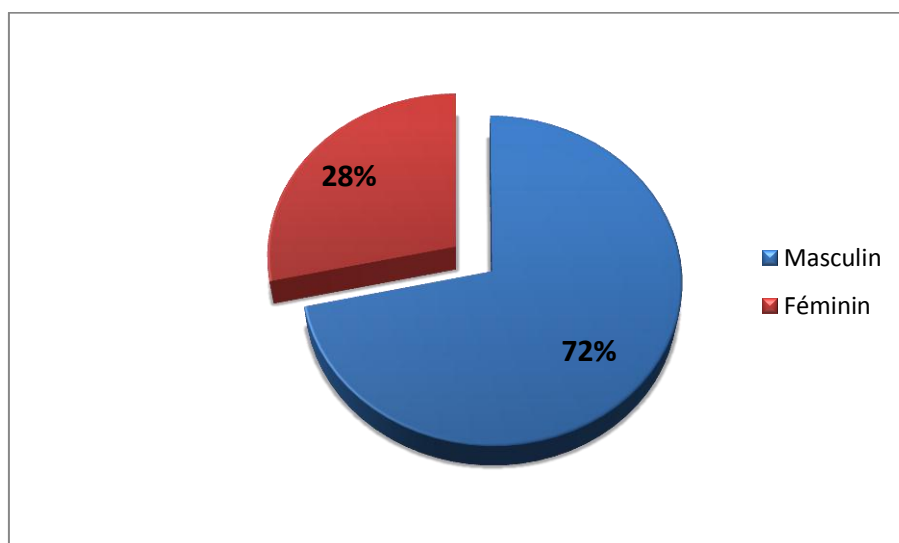


Figure N° 18 : Répartition des SARM selon le sexe

5. Détection de la méthicillino-résistance :

Sur les 150 *S.aureus* identifiées, le test à la céfoxitine et le screening test à l'oxacilline (figure N° 19) nous ont permis de détecter 67 souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, soit un taux de 44.6 % (figure N°20).

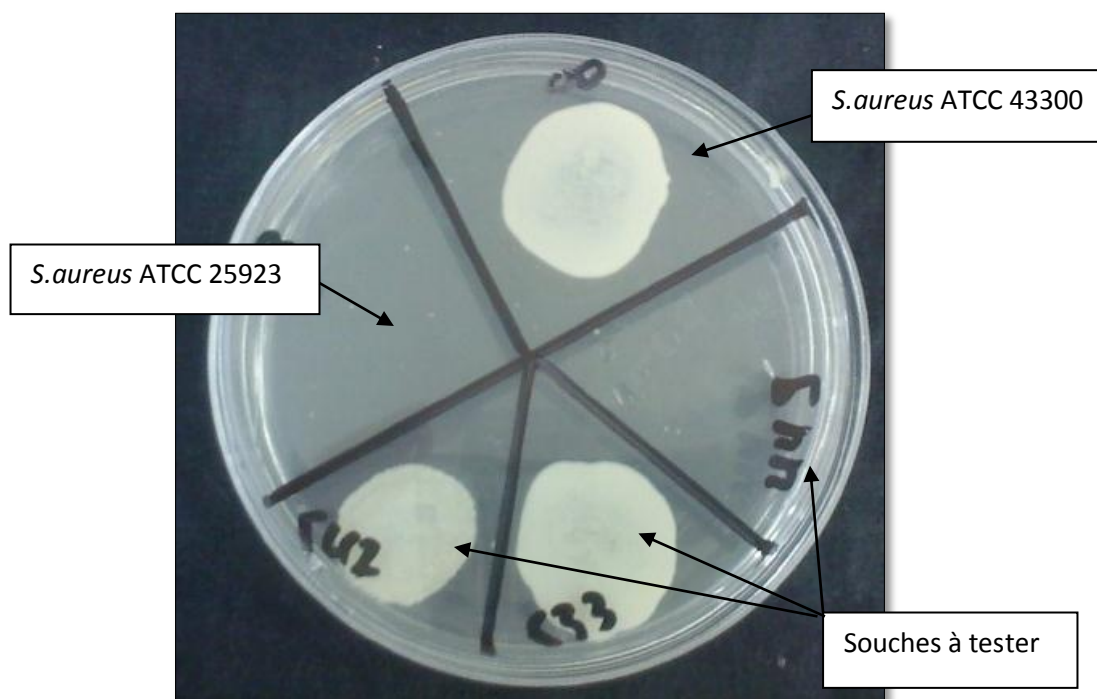


Figure N°19 : Test de screening de *Staphylococcus aureus*

Nous remarquons la présence d'une culture d'une plus de colonie dans les zones des Souches testées et aussi dans le témoin positif qui est la souche de référence *S. aureus* ATCC 43300 résistante à l'oxacilline.

Une absence de culture dans la zone d'une souche à tester et du témoin négatif *S. aureus* ATCC 25923 sensible à l'oxacilline.

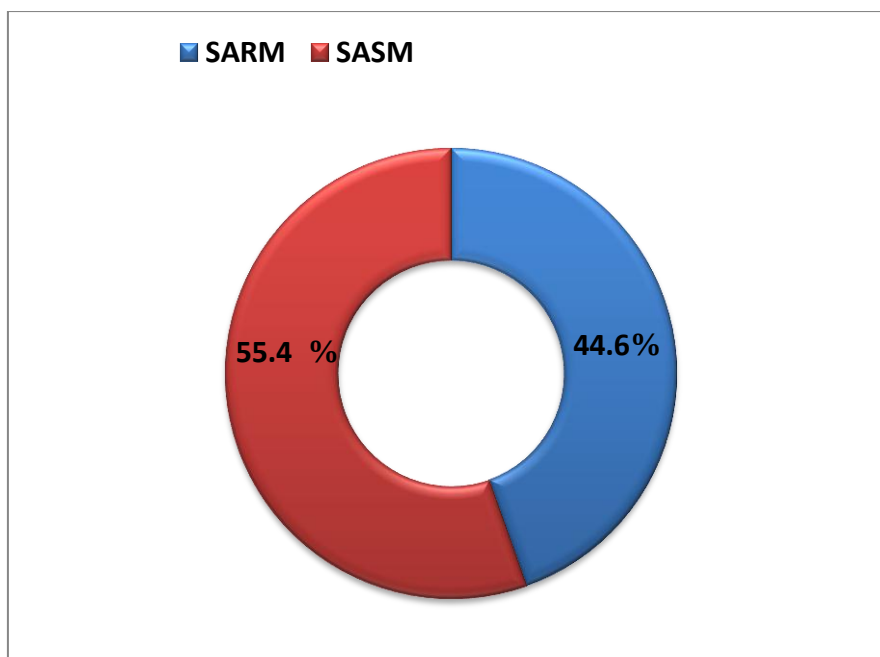


Figure N° 20: Répartition des *S.aureus* selon la résistance à la méthicilline

6. Détection de résistance hétérogène à la l'oxacilline :

Des résistances hétérogènes ont été détectées par le disque de céfoxitine et d'oxacilline à 30C° (figure N° 21).

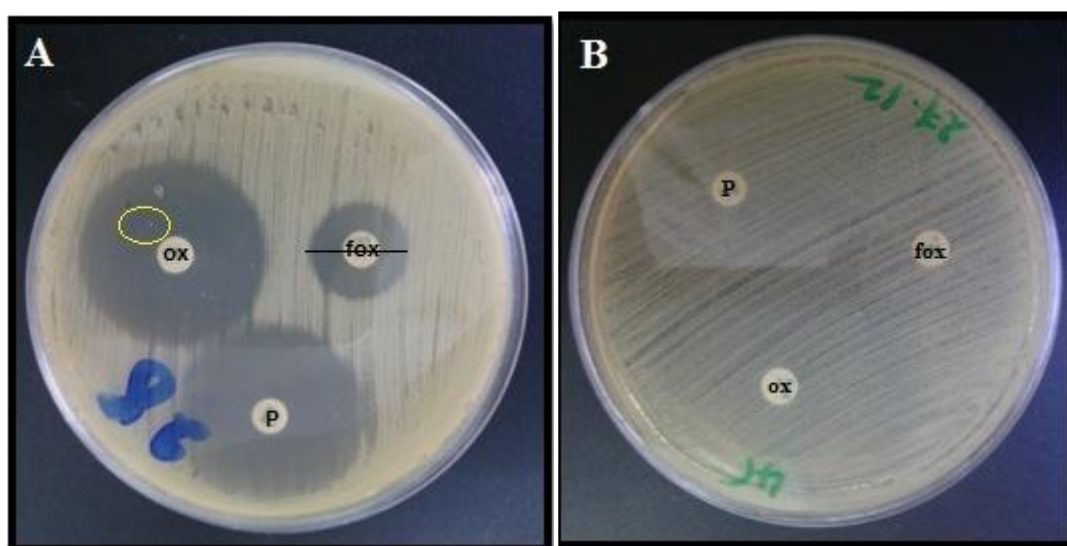


Figure N° 21: Détection de méthicillino-résistance hétérogène (A) et homogène (B) par disques d'oxacilline et céfoxitine

On remarque que la zone de sensibilité à l'oxacilline est importante mais avec présence de colonie dans la zone d'inhibition par contre, la sensibilité est réduite pour la céfoxitine ce qui nous guider à penser à une résistance hétérogène (figure A).

Cette résistance hétérogène a été détecté chez 08 souches de SARM soit un taux de 11,9%. Le reste des souches SARM étaient des SARM homogènes (figure B).

7. Recherche de la PLP2a dans les SARM hétérogènes :

La PLP2a a été détectée chez les souches présentant une résistance hétérogène à l'oxacilline. Ce test était positif pour les 8 souches dites SARM par les méthodes précédentes (disque d'oxacilline et céfoxitine, screening test à l'oxacilline).

8. Test de sensibilité aux antibiotiques:

Les résultats d'antibiogramme en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé et la méthode automatisé (microscan) sont présentés dans l'histogramme (figure N° 22) qui illustre le caractère multi résistant des souches de *S.aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) présentant une résistance croisée aux β -lactamines qui s'étend à d'autres familles d'antibiotiques réduisant ainsi le choix des molécules thérapeutiques.

8.1. Les bêtalactamines:

La totalité des SARM isolées dans ce travail s'est avérée résistante à la pénicilline et la Céfoxitine.

8.2. Les aminosides:

Ces souches ont également échappé à l'action des aminosides traduisant des taux de résistance allant de 60% pour la tobramycine jusqu'à 100% pour la kanamycine. Ce phénomène n'a pas épargné la gentamycine et l'amikacine.

8.3. Les macrolides :

L'érythromycine et la lincomycine ont présenté respectivement des pourcentages de résistance de 46% et de 9%.

8.4. Autres antibiotiques:

D'autres résistances ont été détectées vis-à-vis des autres antibiotiques testés : rifampicine (32,8 %), ofloxacine (68,6 %), acide fusidique (65,6%).

Bien que la vancomycine ait été hautement active sur les souches testées, deux isolats ont pu exprimer une sensibilité diminuée à cette molécule.

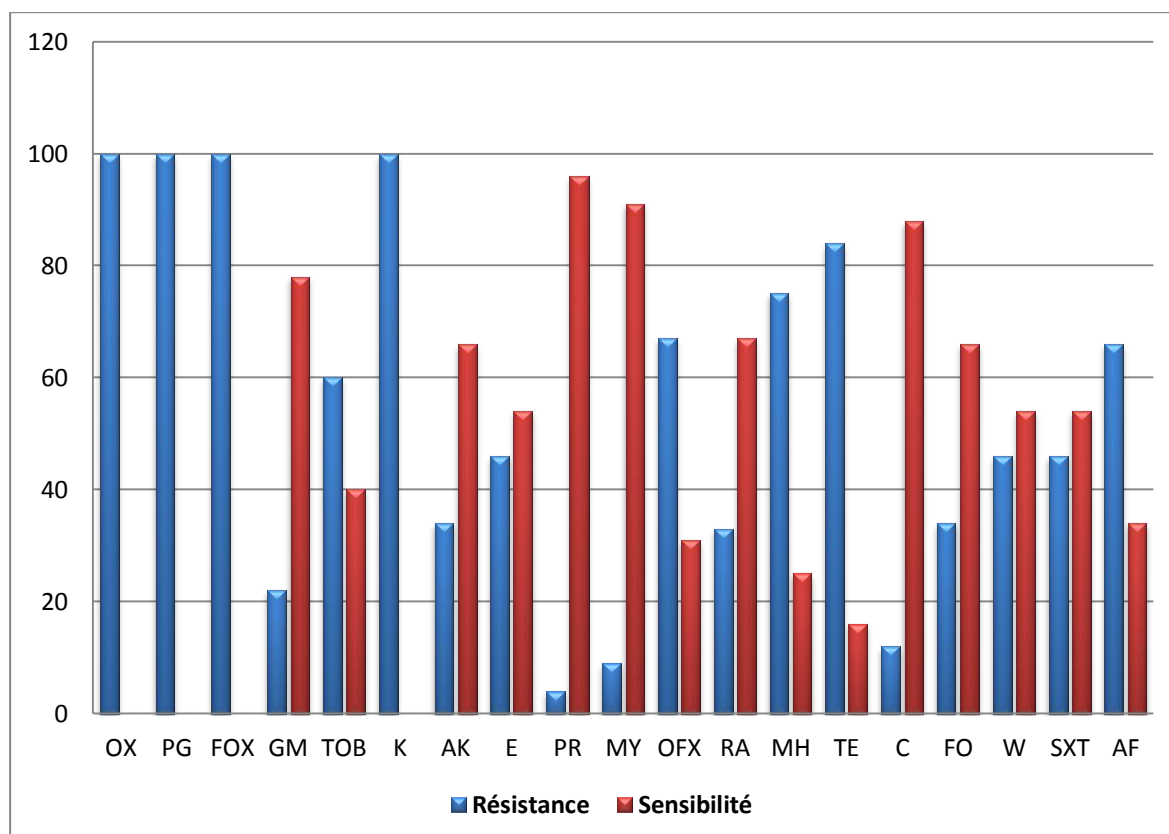


Figure N° 22 : Taux de résistance et de sensibilité des souches SARM aux antibiotiques

OX : oxacilline, PG : PénicillineG, FOX : Céfoxitine, GM : Gentamycine, TOB : Tobramycine, K : Kanamycine, AK: Amikacine, E : Erythromycine, PR: Pristinamycine, MY: Lincomycine, OFX: Ofloxacine, RA : Rifampicine, MH: Minocycline, TE: Tétracycline, C: Chloramphénicol, FO : Fosfomycine, W: Triméthoprim; SXT: Triméthoprim sulfaméthoxazole (Cotrimoxazole), AF: Acide fusidique.

La figure N° 23 représente un exemple de résultat d'antibiogramme d'une souche SARM multirésistante

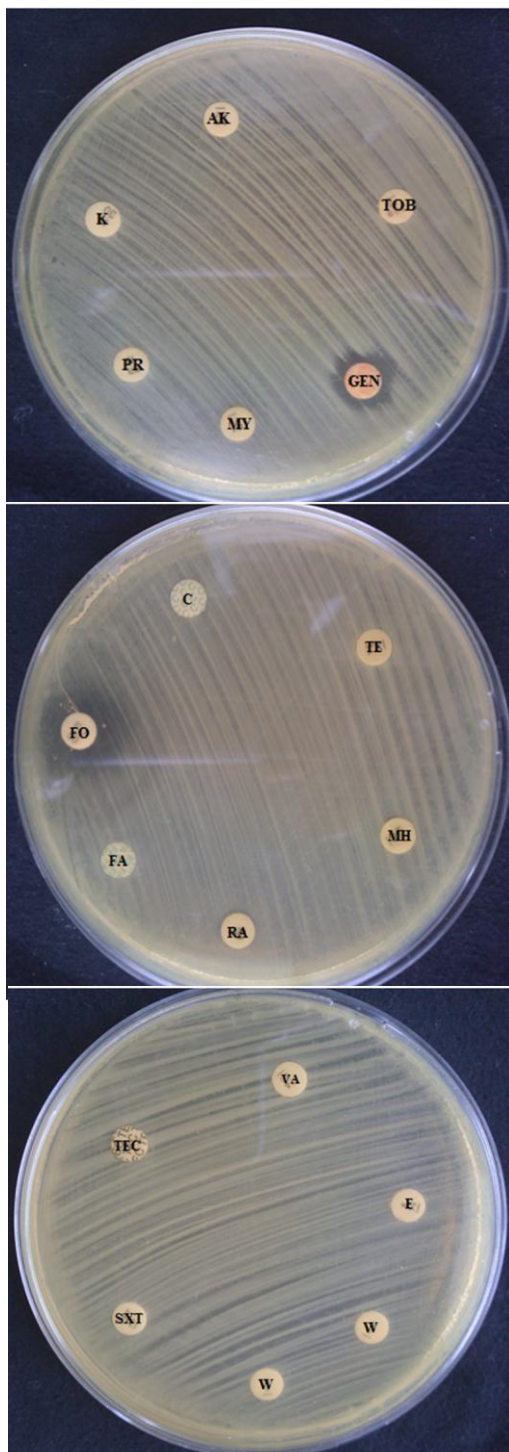


Figure N° 23 : Exemple de résultat d'antibiogramme d'une souche SARM multirésistante.

Afin de mieux caractériser l'ensemble des souches de SARM étudiées, nous avons analysé leur phénotype de résistance vis-à-vis des aminosides et macrolides.

L'étude des phénotypes de résistance de nos SARM aux aminosides montrait trois types, impliquant trois enzymes inactivatrices (tableau N° 07). Toutes les souches SARM étaient résistantes à la kanamycine. 23 (34,3%) souches avaient un phénotype K, dû à la production de l'enzyme Aminosides-phosphotransférases APH (3')-III.

26 (38,8%) souches étaient résistantes à la kanamycine et à la tobramycine, soit le phénotype KT exprimé par la production de l'enzyme Aminosides-nucléotidyltransférases ANT (4') (4''), alors que 18 (26,8%) souches exprimaient le phénotype KTG et étaient résistantes aux trois antibiotiques (kanamycine, tobramycine, gentamicine) due à l'enzyme bifonctionnelle APH (2'')- Aminosides-acétyltransférases AAC (6').

Tableau N° 07: Phénotypes de résistance de SARM aux aminosides

Kanamycine	Tobramycine	Gentamicine	Mécanisme inféré	SARM (%) n=67
S	S	S	Sensible	0
R	S	S	APH(3')-III	23 (34,3)
R	R	S	ANT (4') (4'')	26(38,8)
R	R	R	APH(2'')- AAC (6')	18(26,8)

9. Détection du phénotype MLSb chez les souches SARM résistante à l'érythromycine

Concernant la famille des macrolides (tableau N° 08), on note que 35 souches (52,2%) étaient résistantes à l'érythromycine.

Le phénotype MLSb implique une résistance croisée aux macrolides, lincosamides et aux streptogramines B par méthylation de l'ARN ribosomique 23S.

Le phénotype MLSb est induit par l'érythromycine et dans ce cas un antagonisme entre l'érythromycine et la lincomycine peut être observé ; c'est le cas pour 27 (40,2%) souches de SARM (figure N° 24).

La résistance à l'érythromycine peut aussi s'exprimer constitutivement conférant alors également la résistance à la lincomycine pour 05 souches (07,4%).

Tableau N° 08: Phénotypes de résistance de SARM aux macrolides

Erythromycine	Lincomycine	Pristinamycine	Mécanisme inféré	SARM (%) n=67
S	S	S	Sensible	35 (52,2)
R	S	S	MLSb induct	27 (40,2)
R	R	S	MLSb constut	05 (07,4)

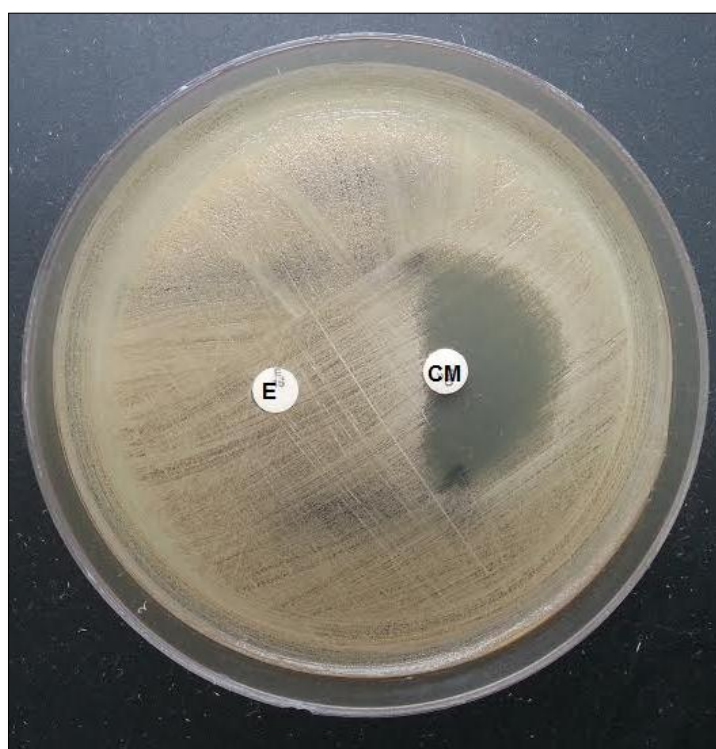


**Figure N° 24 : Détection du phénotype MLSb chez les souches SARM
résistante à l'érythromycine**

10. Détection de sensibilité diminuée aux glycopeptides:

Selon les critères de suspicion de la sensibilité diminuée aux glycopeptides, 11 souches (16,5%) ont été suspectes d'être des GISA dont deux seulement ont été confirmées après détermination de la CMI de la vancomycine. L'analyse des populations a montré que ces deux souches étaient des VISA- hétérogènes. Figure N° 25, N° 26.

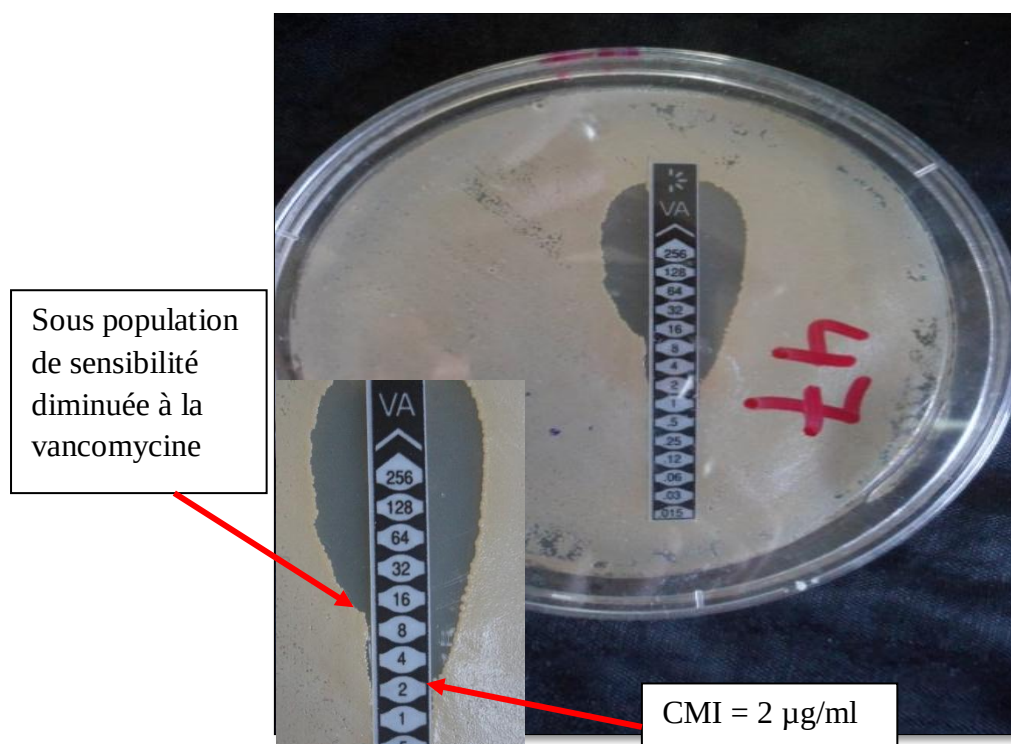


Figure N° 25: Détermination de la CMI par E-test vis-à-vis la vancomycine pour la souche GISA (47)

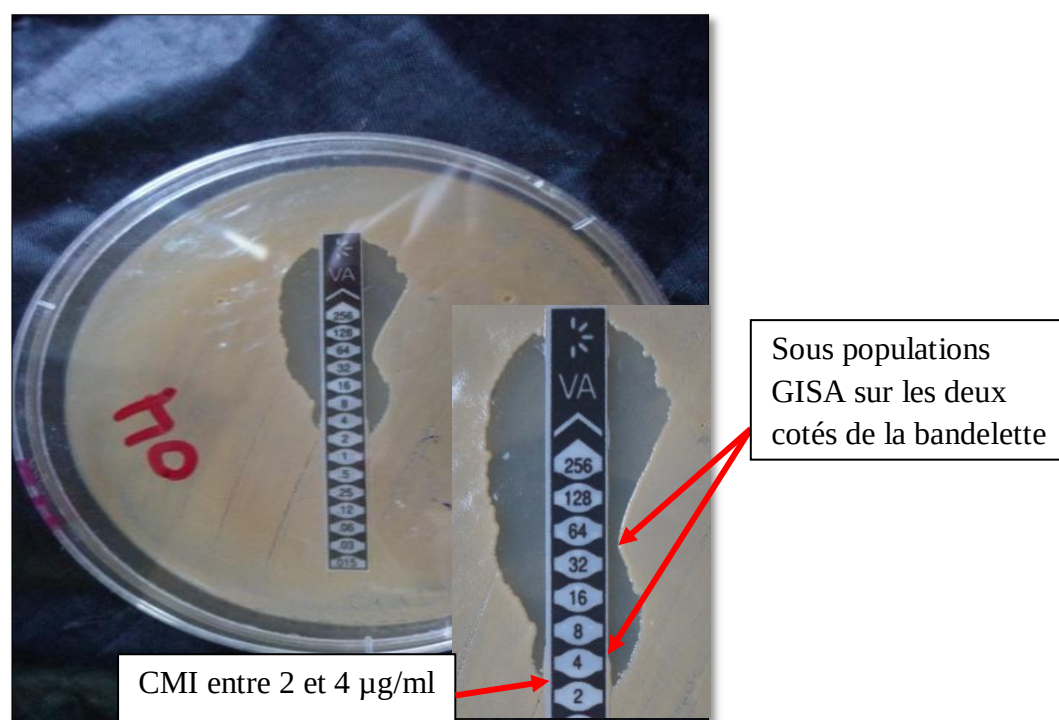


Figure N° 26 : détermination de la CMI vis-à-vis la vancomycine par E-Test pour la souche GISA (04).

11. Profils de résistance des souches GISA:

Les deux souches GISA ont montré une multirésistance vis-à-vis les différentes familles d'antibiotiques. Une sensibilité à la gentamicine est observée chez les deux souches.

La souche GISA 04 montre une résistance contre les macrolides et les synergistine tandis qu'elle est sensible à la lincomycine à l'opposition de la souche GISA 47 qui reste sensible à la totalité des macrolides.

On note aussi une résistance à l'ofloxacine, l'amikacine, la tétracycline, Thriméthoprime, Thriméthoprime-sulfaméthoxazole et l'acide fusidique chez les deux souches (tableau N° 09).

Tableau N° 09: Profils de résistance des souches GISA

Antibiotiques /souches	GISA 04	GISA 47
<i>Bêtalactamines</i>		
Oxacilline	R	R
Pénicilline	R	R
Céfoxitine	R	R
<i>Aminosides</i>		
Gentamicine	S	S
Tobramycine	S	R
Kanamycine	R	S
Amikacine	R	R
<i>Macrolides</i>		
Erythromycine	R	S
Pristinamycine	R	S
Lincomycine	S	S
<i>Autres</i>		
Ofloxacine	R	R
Rifampicine	S	R
Minocycline	R	S
Tétracycline	R	R
Chloramphénicol	R	S
Fosfomycine	S	R
Thriméthoprim	R	R
Thriméthoprim-sulfaméthoxazole	R	R
A. fusidique	R	R

12. Analyse des sous population des souches GISA:

L'analyse de sous population de nos souches GISA a montré l'aspect hétérogène de la résistance intermédiaire vis-à-vis la vancomycine comme le montre le graphe semi logarithmique dans la figure N° 27.

La concentration minimale pour laquelle les deux souches ont pu exprimer une sensibilité diminuée est entre 6 et 8 µg/ ml. A partir de ces concentrations on note une diminution dans le nombre de colonies poussées sur le milieu gélosé jusqu'à l'inhibition complète ce qui est remarqué chez la souche GISA 47. Pour la souche GISA 04 deux colonies ont été apparus sur le milieu contenant 8 µg de vancomycine.

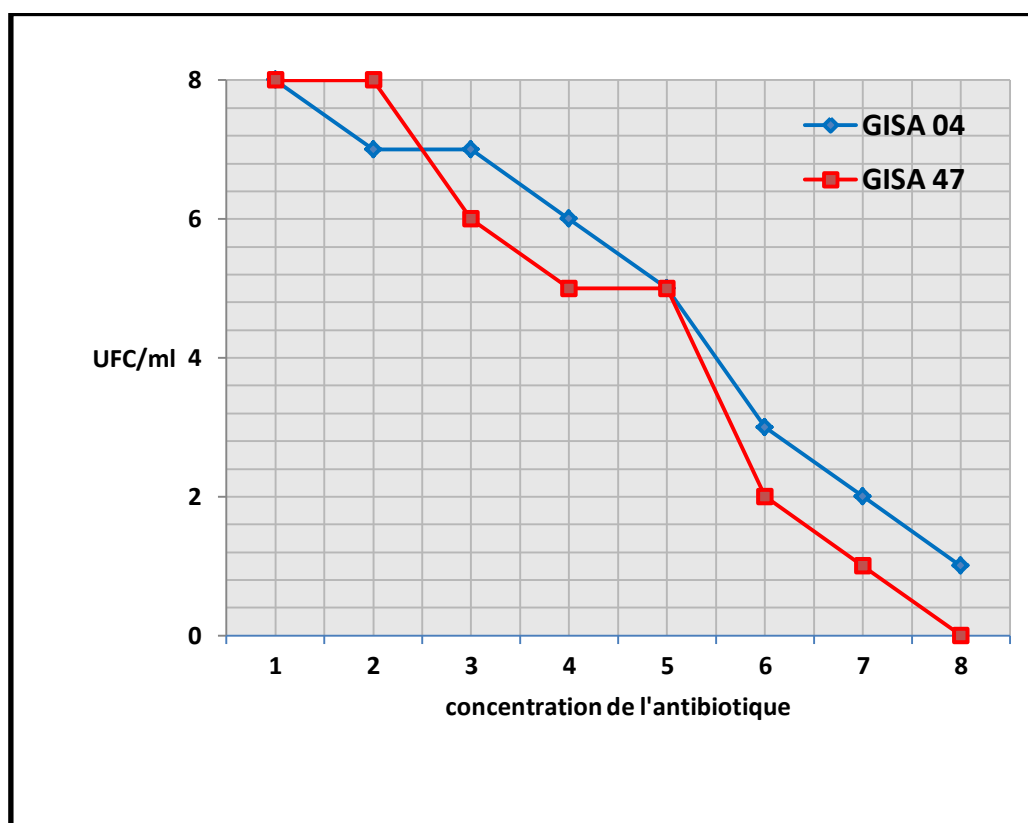


Figure N° 27 : Graphe semi logarithmique du comptage des colonies GISA pour une hétérorésistance en fonction de la concentration de la vancomycine

13. Recherche moléculaire de la résistance et gènes de virulence

Les résultats de la recherche moléculaire de la résistance et des gènes de virulence sont montrés dans le tableau N°10.

Tableau N° 10: Profil moléculaire de la résistance à la méthicilline et gènes de virulence de 12 souches SARM

N°	Référence de la souche	Type de prélèvement	<i>gyrA</i>	<i>mecA</i>	PVL	TSST
1	SARM 04 (GISA)	Pus	<i>gyrA</i>	<i>mecA</i>	PVL	-
2	SARM 28	Pus	<i>gyrA</i>	<i>mecA</i>	PVL	-
3	SARM 39	Pus	<i>gyrA</i>	-	PVL	-
4	SARM 40	Urines	<i>gyrA</i>	<i>mecA</i>	PVL	-
5	SARM 44	Urines	<i>gyrA</i>	<i>mecA</i>	-	-
6	SARM 47 (GISA)	Urines	<i>gyrA</i>	<i>mecA</i>	-	-
7	SARM 51	Prélèvement Vaginal	<i>gyrA</i>	<i>mecA</i>	-	-
8	SARM 56	Prélèvement Vaginal	<i>gyrA</i>	<i>mecA</i>	-	-
9	SARM 58	Pus	<i>gyrA</i>	<i>mecA</i>	-	-
10	SARM 59	Prélèvement Vaginal	<i>gyrA</i>	<i>mecA</i>	-	-
11	SARM 65	Urines	<i>gyrA</i>	<i>mecA</i>	PVL	-
12	SARM 75	Pus	<i>gyrA</i>	-	PVL	-

13-1- Amplification des gènes *mecA* et *gyrA* :

Une méthode simple de la lyse des bactéries a été appliquée dans cette étude. Le jeu d'amorces a déterminé la génération d'un produit PCR d'environ 280 pb pour le gène *gyrA* et d'environ 533 pb pour le gène *mecA* (figure N° 28).

L'amplification par PCR duplex en utilisant les amorces spécifiques des gènes qui codent pour la gyrase spécifique à l'espèce *S.aureus* et la résistance à la méthicilline et la révélation des gènes par l'électrophorèse en gel d'agarose ont montré que toutes les souches ont le gène *gyrA* ce qui confirme leur assignation à l'espèce *S.aureus* ainsi l'absence d'inhibiteurs d'ADN.

En ce qui concerne la résistance à la méthicilline on a trouvé que parmi les 12 souches MRSA testées 10 ont pu exprimer la présence du gène *mecA* indiquant que ce gène est responsable de la méthicillino résistance chez ces souches.

Cependant les deux souches restantes étaient *mecA* négative doit être résistantes à la méthicilline par implication d'autres mécanismes et pouvaient donc être par hyper productions de β -lactamase ce qu'on appelle "borderline oxacillin-resistant *S. aureus*" (BORSA) ou, plus rarement par modifications de la cible PLP2 ou PLP4 ce qu'on appelle "modified *S. aureus* " (MODSA).



Figure N° 28 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification par PCR des gènes *mecA* et *gyrA*

M : marqueur 100pb,

T- : témoin négatif : absence des gènes *mecA* et *gyrA*

T+ : *S.aureus* témoin positif : présence des gènes *mecA* et *gyrA*

1 -12 : *S.aureus*

Pour bien confirmer les résultats de la PCR on peut vérifier l'intensité des bandes d'ADN par un logiciel spécifique.

La figure N°29 représente le type de graphique que l'on obtient lorsque la réaction de PCR est terminée .Ce graphique représente en abscisse le nombre de bandes et en ordonnée la quantité d'ADN amplifié.



Figure N° 29: Graphique de l'intensité des bandes de PCR mecA

13-2- Amplification des gènes codant pour la PVL et TSST1 :

D'après nos résultats, nous notons que 06 souches ont le gène de la PVL (figure N° 30).

Parmi ces 06 qui produisent la PVL, la souche GISA 04 qui possède le gène (*luk-PV*), tandis que la souche GISA 47 est dépourvu de ce gène ce qui est marqué par l'absence de bande spécifique de la PVL.

Nous remarquons aussi qu'aucune souche ne possède le gène (*tst*) codant pour la TSST (figure N° 30).



Figure N° 30 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification par PCR des gènes codant pour PVL et TSST

M : marqueur 100 pb

T- : témoin négatif : absence des gènes codant pour PVL et TSST

T+: *S.aureus* témoin positif : présence des gènes codant pour PVL et TSST

1 -12 : *S.aureus*

Discussion

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur en santé publique qui devient de plus en plus inquiétant notamment avec l'accroissement de la multirésistance des bactéries pathogènes humaines et animales, ainsi que l'émergence rapide de nouvelles résistances à des antibiotiques récents utilisés comme molécules thérapeutiques de premier choix.

L'accroissement de la multirésistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes tel que *Staphylococcus aureus* est souvent lié à "l'arsenal génétique" dont disposent ces bactéries pour acquérir et diffuser les gènes de résistance. Au contact des antibiotiques, *S.aureus* a acquis progressivement des résistances multiples aux antibiotiques, dont celle à la méthicilline qui est codé par le gène *mecA*.

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) s'est disséminé progressivement dans la majorité des établissements de soins à l'échelle mondiale (Sadsad et al, 2013) avec une récente diffusion communautaire (Al- Ruaily et al, 2011, Ben Saida et al, 2005; Mehndiratta et al, 2012).

Les objectifs de cette étude consistaient à évaluer le niveau de résistance aux antibiotiques des souches de *S.aureus* isolées au niveau de la communauté de la ville d'Annaba, de mettre en évidence la prévalence des souches résistante à la méthicilline ainsi que les souches présentant une sensibilité réduite aux glycopeptides notamment la vancomycine, d'identifier le support génétique de la résistance à la méthicilline et les gènes de virulences. Un total de 150 souches de *S.aureus* dont 67 SARM ont été collectées durant une période de deux ans allant de Février 2010 à février 2012, à partir de prélèvements bactériologiques à visée diagnostique des infections communautaires de la ville d'Annaba, l'étude a été faite selon la procédure suivante :

1. Identification des souches:

Les souches ont été identifiées par les tests biochimiques classiques (catalase, coagulase et DNase) et confirmé par le test d'agglutination et API Staph, ces derniers ont prouvé leur efficacité d'identification de l'espèce *S.aureus*.

L'identification par la galerie API Staph a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques de *Staphylococcus aureus* et à révéler 05

différents biotypes avec prédominance du biotype 6736153 chez 51% des souches, suivis du biotype 6336153 chez 26%, le biotype 6736053 chez 14%, le biotype 6736113 chez 7% et le biotype 6636112 chez 2% des souches. Dans une étude réalisée au niveau de CHU de Tlemcen, Rebiahi et al, 2011 ont rapporté une prédominance du biotype 6736153 chez 83% des souches, suivis du biotype 6336153 chez 17% ce qui confirme que ces biotypes sont les impliqués dans les infections humaine à *S.aureus* (Rebiahi et al, 2011).

2. Prévalence des SARM :

Le taux de SARM isolés dans notre étude est de 44,6%, cette prévalence est statistiquement plus élevée que celle de 32,7% obtenue par Aouati et al en 2010 au CHU Ben Badis de Constantine et moins importante que celle de 62,2% rapportée par Alioua et al au CHU de Annaba (Alioua et al, 2014).

En Algérie, le taux de SARM est en augmentation avec 4,5% en 2002 (Kesah et al, 2006) 33,2% en 2004 (Ramdani-Bouguessa et al, 2006), 45% en 2006 (Bekkhoucha et al, 2009) et de 52% en 2009 (Rebiahi et al, 2011).

Dans les hôpitaux algériens, Amazian et al 2006 ont rapporté un taux de conformité aux règles d'hygiène de 18,6%, de ce fait cette importante diffusion de SARM pourrait s'expliquer par l'absence de dispositifs disponibles pour l'hygiène des mains et une connaissance insuffisante de pratique d'hygiène adéquate (Amazian et al 2006).

En Afrique la prévalence des SARM est variable elle était de 36% au Bénin en 2006 avant de diminuer en 2008 avec un taux de 14,5%. (10%) en Tunisie dans une étude réalisée à l'hôpital Charles Nicolle (Saidani et al, 2006) et en Maroc (10%) rapportée par Elazhari et al à Casablanca (Elazhari et al, 2010).

Ce pourcentage bien qu'inférieur à ce qui a été signalé aux USA et Senegal qui ont des taux respectifs de 70% et 72% (Awad et al, 2007; Seydi et al, 2004). En revanche, ce taux de résistance reste au niveau de celui de certains pays de l'Europe : Grèce (44%), Italie (38%), Espagne (38%), Grande Bretagne (44%) et Irlande (42%) (ONERBA 2005).

En France un taux de SARM de (32%) a été observé par «le réseau des microbiologistes Ile de France». Le même constat est fait par le ColBVH «Collège de

Bactériologie Virologie Hygiène des Hôpitaux» (30%), le réseau de Microbiologie CCLIN Paris Nord au cours de l'enquête «bactéries multirésistantes» (33%) et l'ONERBA (35%) (Albertini et al, 2002; Bertrand et al, 2005).

D'autres pays européens gardent une faible prévalence de SARM, comme la Belgique (13%) et l'Allemagne (5%) (C-CLIN Paris-Nord 1998). Et même en dessous de ce seuil pour la Hollande, le Danemark, la Suède et la Finlande (ONERBA 2005). Cette situation s'explique par l'importance de l'engagement des hôpitaux de ces pays dans des programmes conséquents de lutte anti-SARM (ONERBA 2005; C-CLIN Paris-Nord 1998). Ces programmes sont développés et mis en pratique depuis fort longtemps, ils concernent la surveillance des infections nosocomiales et leur prévention, d'où une meilleure gestion du risque de leur survenue et une meilleure maîtrise et utilisation des antibiotiques.

Les Centres for Disease Control and Prevention (CDC) et the national nosocomial infection surveillance system (NNIS), ont constaté également une augmentation progressive de la prévalence des SARM entre 1989 et 2003 où les SARM sont responsables de près de 60% des infections nosocomiales à staphylocoques dans les services de soins intensifs et de réanimation.

Une forte prévalence est retrouvée dans les pays asiatiques. Ainsi, une étude faite à Shanghai en 1999 rapportait 64% de méthicillino-résistance parmi les souches de *S.aureus* testées. Le continent américain est lui aussi marqué par un fort pourcentage de résistance à la méthicilline, compris entre 35 et 40%. Cependant, Wisplinghoff et al (2005), dans une étude rapportent des chiffres beaucoup plus alarmants. Selon ces données, le nombre de SARM isolés dans les hémocultures aux Etats-Unis serait passé de 22% en 1995 à 57% en 2001.

Certains auteurs ont pu suggérer que le problème du SARM à l'état endémique ne nécessitait pas de mesure de prévention particulière (Teare et al, 1999) et d'autres considèrent que la maîtrise de la diffusion des SARM peut poser plus de problèmes qu'en résoudre (Basseti et al, 2005).

De même, les mesures de prévention de la transmission du SARM ayant des conséquences économiques importantes pour les hôpitaux, la nécessité de les maintenir en continu a été remise en question (Rampling et al, 2001). Malgré ces

réticences, la plupart des spécialistes reconnaissent qu'il est nécessaire de mettre en place une politique de lutte contre la diffusion des SARM (Brun et Bes, 2000).

Le risque d'acquisition des SARM dépend de nombreux facteurs dont certains de ces facteurs sont liés au patient (flore cutanée, portage de staphylocoque résistant à la méthicilline (SARM), pathologie sous-jacente, infection préexistante,...), d'autres sont liés à l'environnement direct du patient (bloc opératoire, qualité de l'air et de l'eau, hygiène de l'équipe chirurgicale et des soignants, matériel...). Le polytraumatisé présente un risque particulier d'infection en raison de l'atteinte traumatique multiple, des lésions viscérales, et des gestes invasifs nécessaires à la ressuscitation (Hidron et al, 2005).

2.1.Prévalence des SARM selon l'origine de prélèvement:

Nos souches sont retrouvées essentiellement dans les prélèvements de pus (71,6%) cependant d'autres investigations ont rapporté une prévalence de SARM beaucoup plus importante au niveau des urines (61 – 64%) qu'au niveau des hémocultures et des pus (Mastouri et al, 2005).

2.2.Prévalence des SARM selon l'âge :

Parmi les facteurs liés à l'hôte, l'âge avancé serait un facteur de risque de développer une infection à SARM, comme le confirme l'étude de mortalité de Romeros-Vivas et al (1995).

Le taux de SARM retrouvé dans notre étude est influencé par l'âge des patients, contrairement à ce qui est trouvé par Elhamzaoui et al (2010), où on note une prédominance de la résistance à la méthicilline chez les adultes (77,6%), même résultats obtenus par Garnier et al (2002). Ce résultat ne concorde pas avec la littérature qui souligne que l'âge est un facteur de risque infectieux aux deux extrémités de la vie, avant 1 an et après 75 ans ou ceci peut aisément s'expliquer par l'importance de la morbidité chez le sujet âgé (Cruse et al, 1980).

2.3.Prévalence des SARM selon le sexe :

Parmi les autres facteurs liés au patient, le sexe. La plupart des études ne confirme pas cette observation, en dehors d'une seule qui suggère que le taux de bactériémies à

SARM serait plus élevé chez les hommes que chez les femmes (Morgan et al, 1999). Cependant les données sur la responsabilité du sexe sont insuffisantes dans la littérature puisque la majorité des études cas-témoins réalisent, entre autres critères, un appariement sur le sexe.

Le sexe apparaissait dans notre étude comme un facteur de risque d'infection à SARM, une prédominance des SARM chez le sexe masculin est observée (71,6%), ce résultat concorde bien avec celui de (59%) trouvé dans une étude au CHU Mostapha Bacha à Alger par Antri et al (2010).

Bien que le SARM soit considéré d'abord et avant tout comme une infection nosocomiale, la littérature des dernières années rapporte des infections à SARM acquises dans la communauté chez des patients qui n'ont aucun lien avec les milieux de soins (hospitaliers, cliniques externes ou soins à domicile).

En effet, depuis la fin des années 80, des études ont montré l'existence de SARM chez des sujets appartenant à certaines communautés (indiens d'Amérique du Nord, aborigènes d'Australie) qui n'avaient jamais été hospitalisés. La transmission des SARM en milieu communautaire pourrait intervenir lors des soins à domicile ou au cabinet des médecins de ville (Cookson, 2000).

Une étude a montré que la visite d'une infirmière à domicile était significativement associée au risque d'être porteur de SARM à l'admission à l'hôpital. De plus, la transmission entre les membres d'une même famille a été démontrée, à partir d'une personne hospitalisée récemment ou appartenant au personnel soignant d'un établissement de soins (Troillet et al, 1998).

Une étude récente réalisée parmi une population urbaine défavorisée (sans domicile fixe) de San Francisco a montré une prévalence du portage nasal de SARM de 2.8%, le principal facteur de risque de portage était la toxicomanie intraveineuse, avant l'existence d'une hospitalisation dans les années précédentes (Charlebois et al, 2002).

La longue durée de portage des SARM rend difficile l'identification du lieu de leur acquisition. Il est donc souvent nécessaire de disposer d'informations complémentaires (existence d'hospitalisation récente, soins à domicile, toxicomanie par voie intraveineuse, emploi dans un établissement de soins...) pour pouvoir mieux

différencier entre acquisition nosocomiale et acquisition communautaire. Les données dont nous disposons ne permettent pas de réaliser une telle distinction (Aouati, 2009).

3. Résistance aux antibiotiques :

Les tests d'évaluation de la résistance de toutes nos souches de SARM aux antibiotiques selon la méthode des disques reflètent l'état de multi résistance des souches isolées.

Selon Siegel *et al* (2007), les bactéries multirésistantes se définissent comme des bactéries qui résistent à une ou plusieurs classes d'antibiotiques. D'autres auteurs rapportent qu'il n'existe pas de définition de la multi résistance universellement acceptée, et qualifient un microorganisme de multirésistant, lorsqu'il résiste à au moins trois molécules d'antibiotiques. L'accumulation de plusieurs mécanismes de résistance vis-à-vis de différentes molécules d'antibiotiques pourrait être l'origine de la multirésistance (Schwarz et al, 2010).

3.1. Bêtalactamines :

Nos souches sont totalement résistantes à la pénicilline 100%, à l'oxacilline 100% et à la céfoxitine 100%. Ces résultats corroborent avec ceux trouvés par Rebiahi et al, 2011 et ceux rapportés par Mastouri et al, 2006.

Selon Daurel et Leclercq (2008), la sensibilité des souches de *S.aureus* aux bêtalactamines varie selon la molécule, 80 % à 95 % des souches produisent une pénicillinase qui inactive la pénicilline G et l'ampicilline, rendant leurs indications obsolètes dans le cadre d'une infection à *S. aureus*. Une hyperproduction de pénicillinase peut être responsable de l'hydrolyse des pénicillines M, céphalosporines et des carbapénèmes.

3.2.Aminosides :

L'analyse des résultats de la résistance à la gentamicine des SARM en Algérie montre que son taux est globalement en progression : il était de l'ordre de 7% en 2006 (Ramdani-Bougoussa et al, 2006). Actuellement, il se situe à 34% (Antri et al, 2010).

Dans les pays voisins la tendance est également à la hausse, elle était à 16.4% au Maroc (Ben Jemaa et al, 2004), et a atteint 59% en 2007 (Elouennass et al, 2008), pour revenir à 53.84 % en 2009 (Elhamzaoui et al, 2009).

En Tunisie la résistance des SARM aux aminosides se stabilise autour de 18% (Ben Jemaa et al, 2004 ;Saidani et al 2006).

Au Liban, la résistance des SARM aux aminosides a été représentée par deux pourcentages relativement éloignés ; ainsi paradoxalement à un faible taux (6.25%) vis-à-vis de la gentamicine et de la tobramycine, Hamze et al, en 2003, ont signalé un pourcentage élevé (90%) pour l'amikacine et la kanamycine.

Contrairement à cette évolution, en France la fréquence de sensibilité des souches de SARM aux antibiotiques surveillés (gentamicine, tobramycine, érythromycine et fluoroquinolones) a augmenté depuis 1998. Par exemple, la fréquence de sensibilité à la gentamicine est passée de 61 % en 1998 à près de 90 % en 2002 (Bertrand et al, 2005).

L'augmentation du niveau de sensibilité à la gentamicine chez les SARM isolés en Europe au cours de la période 2000-2007, pourrait être en partie expliquée par l'apparition d'un clone, nommé ST22 qui se distingue par sa sensibilité à la gentamicine.

Bien que notre taux de SARM résistant à la gentamicine et la tobramycine soit nettement supérieur à celui signalé par Ouchenane en 2011 (6.25%) (Ouchenane et al, 2011), il se rapproche du taux enregistré en Tunisie par Saidani et al, en (2006).

La lecture interprétative de l'antibiogramme a permis de détecter trois phénotypes de résistance aux aminosides, avec une prédominance du phénotype KT (38,8%) exprimé par la production de l'enzyme Aminosides-nucléotidyltransférases ANT (4') (Bismuth et Leclercq ,2000). Ce taux demeure plus important que celui signalé par Rebiahi et al (2011).

Cette augmentation pourrait être expliquée par une possible évolution vers la résistance. En deuxième position on note la présence de phénotype K avec un taux de (34,3%) dû à la production de l'enzyme Aminosides-phosphotransférases APH (3')-

III et enfin le phénotype KTG avec (26,8%), ce dernier reste moins important que celui trouvé par Rebiahi et al, 2011 de (45%) et proche de celui signalé par Hamze et al, 2003.

3.3. Macrolides, synergistine et lincosamides :

La résistance aux macrolides dans notre étude est aussi remarquable. Les résultats montrent que la résistance à l'érythromycine a été souvent associée à celle de la lincomycine ce qui nous incite à penser au même mécanisme de résistance (MLSB) qui confère la résistance aux Macrolides, Lincosamides et Streptogramines (Bismuth et Leclercq, 2000).

On note que le taux de résistance à l'érythromycine est de (46,2%), taux comparable à celui observé dans une étude tunisienne (49%) (Mastouri et al, 2005). Mais il reste moins important que celui constaté aux USA (66%) (Pillar et al, 2008). D'autre part, il est à souligner que le faible taux de résistance à la lincomycine (9%) dans notre étude, nettement plus bas que celui rapporté par une étude Tunisienne (21%) (Mastouri et al, 2005). La résistance à cette molécule chez les SARM varie d'un pays à un autre allant de 10% en 2003 au Liban jusqu'à 93.9% aux Etats Unis (Ouchenane et al, 2001; Gus et al, 2009).

La lincomycine n'est pas un antibiotique largement utilisé en Algérie pour le traitement des infections à SARM, ce qui peut expliquer le peu de résistance retrouvée comparativement aux autres pays.

Le phénotype MLSB inductible apparaît dans nos résultats avec un taux de 40.2% alors que le MLSB constitutif avec un taux de 07,40%. Stewart et al ont rapporté que dans souches de SARM, la résistance MLSB inductible était de 38% et une résistance MLSB constitutive était de 30% à Atlanta (Stewart et al, 2005). Dans une étude réalisée au Japon, la résistance MLSBi était de 40% et la résistance MLSBc était de 61% (Otsuka et al, 2007).

Les synergistine constituent une nouvelle arme thérapeutique. Parmi elles, la Pristinamycine ressort avec des avantages bactériologiques et pharmacologiques indéniables. Des résultats montrent une activité totale (100%) de la Pristinamycine sur les souches de *Staphylococcus aureus*, sans distinction du caractère méti-S ou méti-R.

En effet, dans une étude réalisée sur les streptogramines (Pristinamycine) dans un CHU Tunisien portant sur des souches de *Staphylococcus aureus* méti-S et méti-R, ont révélé que seuls 05 souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline étaient résistantes à la Pristinamycine entre 2004 et 2007. Toutes les autres souches étaient sensibles. Ils en ont conclu que la Pristinamycine est active sur la grande majorité des souches de *Staphylococcus aureus* quelque soit leur phénotype de résistance aux autres antibiotiques, en particulier à l'oxacilline (Mezghani et al, 2012).

Nos résultats montrent que 95,5 % de souches de SARM sont sensibles à la Pristinamycine un taux comparable avec celui de 97% trouvé par Leclercq et al. Cette fréquence est aussi retrouvée dans l'étude réalisée par le Collège de Bactériologie, de Virologie et d'Hygiène des Hôpitaux Généraux de France (ColBVH) sur des souches de *S. aureus* isolées d'hémocultures en 1999.

Ce taux de sensibilité a déjà été rapporté en 1991 par le Centre National de Référence des Staphylocoques (CNRS), ce qui suggère l'absence d'évolution vers la résistance à cet antibiotique. Mastouri et al, 2006 ont signalé une sensibilité de 100% des souches SARM vis-à-vis la Pristinamycine. La Pristinamycine demeure donc une bonne alternative pour le traitement des infections à SARM.

3.4. Glycopeptides:

La vancomycine conserve une bonne activité sur nos souches. Dans notre étude 11 souches ont été suspecté d'être des VISA suivant leur résistance ou sensibilité intermédiaire à la vancomycine et la teicoplanine. La confirmation de cette sensibilité diminuée par l'E-Test à la vancomycine a décrit deux souches.

Après l'analyse des sous population, ces deux souches étaient des VISA hétérogènes (hétéro-VISA) où on note une CMI de sous population entre 6 -8 mg/l pour les deux souches.

La résistance aux glycopeptides chez *S. aureus* pourrait être liée à une diversité de mécanismes moléculaires. Ces souches ont une paroi épaissie résultant d'une réorganisation complexe du métabolisme du peptidoglycane liée probablement à des mutations dans de multiples gènes. Ces réorganisations pourraient empêcher l'accès de la vancomycine à sa cible. Une autre hypothèse non exclusive serait

l'hyperproduction de précurseurs du peptidoglycane agissant comme autant de leurres pour les glycopeptides (Joly-Guillou et al, 2004). L'isolement des souches de *S. aureus* résistant à la vancomycine par transfert horizontal d'un opéron *VanA* à partir d'*Enterococcus* a été récemment rapporté. Cette résistance de haut niveau à la vancomycine est aujourd'hui très limitée (Boyle-Vavra et al, 2001).

L'augmentation des SARM dans les hôpitaux algériens a favorisé l'intégration des glycopeptides dans les schémas thérapeutiques permettant l'élimination de ces souches, ces molécules étaient jusqu'à ces dernières années préservées du phénomène de résistance. D'autres auteurs ont déclaré que l'augmentation des SARM a accompagné l'utilisation abusive de la vancomycine (Awad et al, 2007).

3.4.1. Sensibilité intermédiaire aux glycopeptides :

La sensibilité diminuée de *S. aureus* aux glycopeptides pose un problème d'actualité. Différentes études rapportent l'isolement de souches de *S. aureus* de sensibilité intermédiaires ou résistantes à ces antibiotiques (Hiramatsu et al, 1997). La première description d'une souche de SARM de sensibilité diminuée à la vancomycine (VISA) était au Japon en 1997. Ces souches de SARM sont sensibles à la vancomycine (CMI 2-4 mg/L) mais présentent des sous-populations intermédiaires à la vancomycine (CMI 6-8 mg/L). Les sous-populations sont présentes à des fréquences faibles, de l'ordre de 10^5 - 10^7 , et ne peuvent pas être mises en évidence à l'antibiogramme standard (Daurel et Leclercq 2008).

Aujourd'hui la majorité des souches sont des hétéro-GISA et la prévalence estimée aux États-Unis est moins de 2 %, alors qu'au Japon, Hiramatsu rapporte une fréquence de 20 % (Hiramatsu et al, 1997). Une étude récente réalisée aux Pays-Bas montre une prévalence de 7,6 % d'hétéro-GISA (Van Griethuysen et al, 2003)

Il est important d'identifier correctement les souches GISA mais, le meilleur moyen de détection n'est pas encore bien défini.

Mastouri et al (2006), ont isolé deux souches ayant une sensibilité diminuée : la souche M4 (CMI vancomycine = 6 µg/ml, CMI teicoplanine = 32 µg/ml) a été isolée d'hémoculture chez un malade qui est décédé d'une septicémie à SARM après échec thérapeutique suite à un traitement par la teicoplanine. La souche M41 (CMI

vancomycine = 4 µg/ml, CMI teicoplanine = 24µg/ml) a été isolée de cathéter chez un malade ayant évolué favorablement sous traitement à la vancomycine. Contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature, leur CMI de l'oxacilline étaient >256µg/ml. Certains auteurs estiment que le coût biologique d'une résistance est l'un des facteurs qui détermine sa stabilité et sa diffusion, ainsi la dissémination dans le monde des clones de SARM a été associée à leur capacité à compenser le coût biologique nécessaire pour abriter la Cassette mec (*SCCmec*) (Ender et al, 2004).

La délétion du gène *mecA* chez certaines souches de *S. aureus* ayant une résistance intermédiaire à la vancomycine suggère que la résistance simultanée aux β-lactamines et aux glycopeptides est un fardeau pour cette espèce (Patel et al, 2008).

Hiramatsu et al en (1997), ont isolé une souche SARM clinique, désignée Mu3, chez un patient ayant une pneumonie postopératoire qui a été insensible au traitement à la vancomycine. Bien que l'état du patient s'est amélioré au cours des huit premiers jours, la situation s'est dégradée entre le neuvième et le douzième jour ; ce qui a incité les cliniciens à changer le schéma thérapeutique en appliquant avec succès une combinaison composée de l'arbécacine et l'association sulbactam/ampicilline. Malgré que les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine vis-à-vis de cette souche (Mu3) fussent respectivement de l'ordre de 2µg/ml et de 8µg/ml en utilisant la technique de microdilution, l'analyse des sous population a révélé une résistance hétérogène à la vancomycine. Ainsi respectivement 0,01%, 0,003%, et 0,0001% de la population de MU3 a exprimé des CMI de 2 µg/ml ,4 µg/ml et 8µg/ml.

Environ 6 mois plus tard, une autre souche de SARM, désignée MU50, isolée par la même équipe chez un bébé de 4 mois qui a développé une surinfection de plaie postopératoire causée par un SARM qui a résisté au traitement à la vancomycine enregistrant des CMI de 8 µg/ml pour la vancomycine et 16 µg/ml pour la teicoplanine. La souche partage avec MU3 exactement le même profil électrophorétique en champ pulsé (PFGE), mais présente un niveau de résistance nettement supérieur. Ainsi, 100% de la population a pu croître dans 4 µg/ ml de vancomycine, et 0,0001% de la population dans 12 µg / ml de vancomycine.

La sensibilité réduite à la vancomycine a rapidement conquis le monde avec des cas signalés aux Etats Unis, en Europe et en Afrique (Tacconelli et al, 2007). Cette

dissémination a été accompagnée d'une évolution terminologique ; ainsi, les souches qualifiées autrefois de sensibles selon le *National Committee for Clinical Laboratory Standards* se sont retrouvées assignées à la classe des intermédiaires (VISA) selon les nouvelles lignes directrices du CASFM et CLSI.

Ce changement a touché logiquement les autres catégories (intermédiaire, résistante). Cette situation s'est compliquée par l'émergence en parallèle d'une sous population exprimant une résistance hétérogène à la vancomycine responsable d'un certain nombre d'échecs thérapeutiques (Hiramatsu et al, 1997). Dans ce cas, une faible proportion réagit différemment et développe une CMI deux à huit fois plus importante que la cellule parentale. Ce qui constitue une étape préalable à l'acquisition de la résistance homogène à la vancomycine (VISA).

3.5.Fluoroquinolones:

Le taux de résistance marqué dans notre étude vis-à-vis l'ofloxacine est de 68,8%. Ce taux est supérieur à ce qui a été rapporté dans les autres pays africains, notamment la Tunisie (41%), le Maroc (60%) (Soraa et al, 2012), l'Afrique du Sud (18%) (Shittu et al,2006) et moins important que celui rapporté par Alioua et al,2014 qui a signalé un pourcentage significativement élevé (83,7 %).

En France, d'après les différents réseaux d'ONERBA, l'incidence des souches de SARM sensibles aux fluoroquinolones est très faible car elle ne dépassait pas les 12 % en 2010. En moyenne, elle se retrouve aux environs de 11 %. Il faut préciser qu'en 1994 elle n'était que de 4,5 % (réseaux AP-HP).

Les fluoroquinolones sont parmi les classes antimicrobiennes les plus couramment prescrites dans l'hôpital et dans la communauté. Cependant, l'utilisation inappropriée des fluoroquinolones devrait être identifiée et réduite. Plusieurs enquêtes récentes suggèrent que les fluoroquinolones eux-mêmes peuvent effectivement prédisposer les patients à l'infection ou le portage de SARM (Weber et al, 2003).

3.6. Autres antibiotiques:

3.6.1. Chloramphénicol:

Le chloramphénicol est la tête de liste des phénicolés. Le chloramphénicol a été efficace contre les souches de SARM isolées, puisque 12% seulement d'entre elles ont pu résister à cette molécule. En Algérie, son utilisation a été relativement délaissée au profit de nouvelles molécules ; ce qui pourrait expliquer la restauration de son efficacité. Cette molécule qui peut réduire de façon significative le portage nasal, est connue pour son efficacité sur le SARM. Ces données sont un peu plus élevées que ceux signalés par (Ramdani-Bougoussa *et al*, 2006) et (Mastouri *et al*, 2006) qui ont trouvé respectivement des taux de 2.3%, et 3%.

3.6.2. Cyclines :

On constate que les souches ont un niveau de résistance plus élevé vis-à-vis des tétracyclines où seulement 25% des souches sont sensibles. En plus la minocycline montre un taux de résistance important où 84% des souches sont résistantes.

Au Liban, les souches de SARM montrent une résistance de 44.33% de tétracycline et 8.33% de minocycline (Hamez *et al*, 2006). Alors qu'en Tunisie les SARM ont développé une résistance élevée à la tétracycline (66%) (Mastouri *et al*, 2006).

3.6.3. Rifampicine:

Selon nos résultats la résistance à la rifampicine est de l'ordre de 32,8%. Cependant ce taux est plus élevé en comparant avec celui trouvé en France en 2009 où la sensibilité des SARM à la rifampicine était en moyenne de 95,0 %, tandis qu'elle n'était que de 27,3 % en 1993 (réseau AP-HP). En monothérapie, l'émergence de mutants résistants est très rapide. Ces antibiotiques doivent donc toujours être utilisés en association avec d'autres molécules.

3.6.4. Fosfomycine:

L'efficacité de la fosfomycine a été remarquable, puisque cette molécule a été active sur 34% des SARM. A l'étranger, les données sont similaires et convergent souvent vers une stabilité. En effet, en Tunisie le taux de résistance des SARM à la

fosfomycine était de l'ordre de 6.66% en 2005 (Ben Saida et al, 2005), il a atteint 7% en 2009 (Mastouri et al, 2006). Ces taux sont légèrement inférieurs à ce qui a été enregistré par Picot et al en (2009) (9%).

Entre 1993 et 2009, la sensibilité des souches SARM envers la fosfomycine est augmentée en passant de 66,7 à 94,9 % en France (réseau AP-HP).

3.6.5. Trémithoprime:

Nos souches expriment une sensibilité à la trémithoprime avec un taux de 54% et un taux similaire vis-à-vis la cotrimoxazole. Peu d'études cliniques évaluent son efficacité dans les infections à SARM.

Une étude à répartition aléatoire, à double insu, effectuée auprès de 101 patients ayant contracté des infections à *S.aureus* de différents types et publiée en 1992 révèle que le cotrimoxazole aurait un effet moindre que la vancomycine. Le SARM constituait 47 % des isolats. Tous les échecs au cotrimoxazole se sont cependant produits chez des patients ayant une infection à SARM. Ainsi, cette étude laisse entendre que le TMP-SMX pourrait être considéré comme traitement de remplacement possible de la vancomycine dans certains cas d'infection à SARM (Cindy Tremblay, 2008).

En France, la sensibilité au cotrimoxazole des souches SARM est très importante car on dénombre une proportion entre 95 et 98 % de SARM sensibles en 2009 (selon les réseaux ONERBA et AP-HP, 2012).

3.6.6. Acide fusidique:

Nos résultats montrent un taux important de résistance à l'acide fusidique estimé à 66%. En France, en 2008, l'incidence de la résistance à l'acide fusidique est faible parmi les souches de SARM. Leur proportion était de 5,4 % chez l'Homme alors que 8,6 % de souches SARM avaient une sensibilité intermédiaire à l'acide fusidique (réseau REUSSIR de l'ONERBA, 2008).

La résistance à cet antibiotique est la conséquence d'une diminution de l'affinité entre le facteur d'élongation et l'antibiotique (résistance de type chromosomique, mutation du gène *fusA* codant le facteur EF-G) ou un défaut de pénétration dans la bactérie (résistance de type plasmidique, gène *fusB* ou *fusC*).

4. Bases moléculaires de résistance et gènes de virulence :

4.1.Confirmation de l'espèce *S.aureus* par détection du gène *gyrA*:

La recherche du gène *gyrA* était positive par le test direct de la PCR du gène dans les souches de staphylocoques identifiés comme *S. aureus* par les procédés phénotypiques. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par d'autres approches méthodologiques (Brakstad et al, 1992) qui ont suggéré que le gène *gyrA* et ses produits ont des séquences qui, d'une part se trouve dans tous les *S. aureus* et d'autre part, sont propres à la bactérie de cette espèce.

4.2.Recherche du gène *mecA* par PCR :

La détermination de la méthicillino-résistance dans cette étude est basée en premier temps sur la détection de la résistance des souches à la céfoxitine et l'oxacilline puis la confirmation de cette résistance a été faite à l'aide du test de screening à l'oxacilline et test d'agglutination pour la recherche de PLP2a et enfin une détection du gène *mecA* par PCR a été préconisée.

Le dépistage de la résistance à la méthicilline du *S. aureus* requiert une méthode de laboratoire appropriée. A cause de son hétérogénéité, la résistance à la méthicilline peut facilement échapper aux méthodes conventionnelles d'antibiogramme, en particulier pour les souches ayant des concentrations minimales inhibitrices faibles (de 4 à 16 mg/l). Notamment, la méthode de diffusion en gélose utilisant le disque d'oxacilline et les méthodes automatisées n'ont pas toujours réussi à repérer avec fiabilité la résistance. Plusieurs méthodes sont recommandées par le (CLSI 2005) pour le dépistage de la résistance à la méthicilline du *S. aureus*. Une première méthode consiste en un dépistage sur gélose (agar screen) utilisant un milieu Mueller-Hinton additionné de NaCl à 4 % et contenant 6 mg/L d'oxacilline (Monno et al,2003).

En janvier 2005, le CLSI (CLSI 2005) a approuvé l'utilisation d'une nouvelle méthode permettant la détection des souches de staphylocoque porteuses du gène *mecA*. Il s'agit d'une méthode de diffusion en gélose utilisant un disque de céfoxitine de 30 µg sur une gélose Mueller-Hinton.

Dans le cadre d'une étude préliminaire effectuée au Laboratoire de santé publique du Québec sur 60 souches de *S. aureus* de différents profils, cette méthode a montré une sensibilité et une spécificité de 100 % à mettre en évidence les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline due à la présence du gène *mecA* (Comité sur les Infections Nosocomiales du Québec (CINQ, 2006), même résultats trouvés dans notre étude qui montre une spécificité du disque de céfoxitine dans la détection de la résistance à la méthicilline due au gène *mecA*.

Les techniques les plus couramment utilisées pour la détection du gène *mecA* sont les épreuves par agglutination et par réaction de polymérase en chaîne (RPC), technique conventionnelle ou en temps réel.

Une épreuve rapide et simple (environ 15 minutes) de détection de la PLP2a, transcrite à partir du gène *mecA*, par agglutination sur lame chez les colonies isolées de *S. aureus* a été développée à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les PLP2a et fixés à des particules de latex. Ce test a démontré une excellente sensibilité (97-100 %) et spécificité (99-100 %) pour la détection des SARM en comparaison avec la PCR (Monno et al, 2003).

Les épreuves de détection du *mecA* par la technique conventionnelle d'amplification génique par réaction de polymérase en chaîne se sont avérées une technique plus sensible et plus rapide (4-6 heures) que la culture. Toutefois, elle nécessite des protocoles techniques expérimentaux complexes, des facilités et des installations qui sont rarement disponibles dans les laboratoires diagnostiques.

Dans notre étude la recherche du gène *mecA* a été basée sur la PCR conventionnelle et qui a révélé la présence de ce gène chez la majorité des souches SARM et son absence dans quelques souches. Ces résultats concordent avec ceux d'Elhamzaoui et al, 2010 qui ont rapporté une absence du gène *mecA* dans les isolats de SARM au Maroc.

La détection du gène *mecA* dans les isolats de SARM résistants à la céfoxitine et à l'oxacilline s'avère importante car certaines souches de SARM dépourvues du gène *mecA* sont impliquées dans des infections sévères. Ainsi, il importe de bien s'assurer que le gène *mecA* détecté appartient bien à *S.aureus* et non à une autre espèce de staphylocoque.

Les souches de *S. aureus* présentant une résistance limite ou de bas niveau à la méthicilline n'ont pas de gène *mecA*. Ce sont en fait les souches appelées BORSA (pour Borderline Résistant *S. aureus*) qui présentent une résistance à la méthicilline à cause d'une production accrue de β -lactamases, et les souches appelées MODSA (pour Modified Penicillin- Binding Protein) dont la résistance est due soit à une hyperproduction de PLP4 soit à la synthèse d'une PLP2 modifiée. Dans les deux cas on a une diminution de l'affinité pour les β -lactamases, c'est le cas de nos deux souches *mecA* négatif (Jorgensen, 1991).

D'un point de vue épidémiologique, la résistance par acquisition du gène *mecA* est plus grave car ce gène est porté par un élément génétique mobile pouvant non seulement favoriser la dissémination de la résistance à la méthicilline mais aussi transporter d'autres gènes codant pour la résistance à d'autres antibiotiques (Ito et al, 2001).

4.3. Recherche de la production de la PVL:

La détection du gène *Luk-PV* codant pour les deux protéines de classe S et F de la leucocidine de Panton et Valentine a été effectuée par PCR.

Dans notre étude 6 souches parmi 12 SARM ont exprimé la production de la leucocidine de Panton-Valentine par la présence des gènes codant cette toxine.

La PVL n'est pas recherchée de manière systématique mais plusieurs études de caractérisation génotypique des staphylocoques dorés ont été menées en Algérie. La recherche des gènes *lukS-PV* et *lukF-PV* est souvent réalisée à cette occasion et permet donc d'avoir une estimation de la prévalence de ces gènes sur les souches de *S. aureus* isolées au laboratoire.

De 2000 à 2008, des études de prévalence de SARM ayant un profil de résistance antibiotique particulier ont été réalisées en France par l'ONERBA. Un de leurs objectifs était de suivre l'évolution des caractères génétiques des souches de *S. aureus* en France notamment l'émergence de clones de SARM communautaires PVL+ pouvant infecter des sujets sains sans les facteurs de risque habituels. Trois grandes études ont été menées par cet observatoire, la première de 2000 à 2003 (rétrospective)

(Robert et al, 2005), les deux autres en 2004 et en 2008 (prospectives) (Robert et al, 2011).

Ces études montrent que la présence des gènes encodant pour la PVL est associée à sa production effective In Vitro et très probablement In Vivo. La biologie moléculaire est donc un outil suffisant pour la caractérisation des souches de *S. aureus* productrices de leucocidine de PantonValentine.

La répartition des souches PVL+ est mondiale, aux Etats-Unis les souches sont surtout méthicillino-résistantes alors qu'en Europe et plus particulièrement au Royaume-Uni, elles sont majoritairement méthicillino-sensibles.

Il est difficile d'estimer la prévalence de la PVL ; elle est très variable selon les études et selon les pays mais est estimée à moins de 5% des souches de *S.aureus* (Vandenesch et al, 2009).

En Europe, on remarque un gradient d'incidence croissante du Nord vers le Sud de l'Europe; en Angleterre, la prévalence de la PVL est de 1,6% parmi les souches de *S.aureus* (Holmes et al,2005); en France, la PVL est retrouvée dans environ 2% des souches de *S.aureus* et moins de 3% des souches de SARM (données HCSP); en Grèce, 45% des SARM (communautaires et hospitaliers) sont PVL+ (Chini et al,2006) ; en Algérie, 45% des souches de *S.aureus* sont PVL+ (Antri et al,2010); en Afrique de l'Ouest 30% des souches de *S.aureus* sont PVL+ (Baba Moussa et al, 1999).

On note une tendance générale à l'augmentation de la prévalence de la PVL malgré l'hétérogénéité des études.

4.4.Recherche de la production TSST 1:

La toxine du syndrome du choc toxique n'est pas produite par nos souches ce qui le traduit l'absence des bandes spécifique du gène codant cette toxine dans les résultats de la PCR.

Même résultats trouvé en Tunisie par Ben Nejma et al, 2008 dans une étude effectuée sur une population de 64 souches de SARM.

Cette protéine antigénique entraîne la formation d'anticorps protecteurs présents chez 85 % des sujets adultes. Cette toxine, comme les entérotoxines, a un effet pyrogène et est un superantigène qui entraîne l'activation simultanée de plusieurs sous-populations lymphocytaires, ce qui entraîne la libération de plusieurs médiateurs (interleukine, interféron gamma...) responsables de la symptomatologie du choc staphylococcique.

Cette protéine (TSST-1) est produite par 90% à 100% des souches de *S. aureus* isolée de prélèvements vaginales (El Ghodban et al, 2006; Fueyo et al, 2005).

Il peut également être synthétisé par des souches de *S. aureus* isolées de personnes en bonne santé. Le syndrome de choc toxique (TSS) est une maladie systémique causée par *S. aureus* qui a été initialement rapporté par Todd et al (Todd et al, 1984).

Conclusion

Staphylococcus aureus est une bactérie qui a une grande importance en médecine humaine vue sa bonne illustration de l'évolution adaptative des bactéries dans l'ère des antibiotiques, comme il a démontré une capacité unique à répondre rapidement à chaque nouvel antibiotique avec le développement d'un mécanisme de résistance, à commencer par la pénicilline et à la méthicilline, jusqu'au traitement de référence, la vancomycine et la teicoplanine.

Notre étude a porté sur l'identification de 150 souches de *S.aureus* isolées à partir de différentes origines pathologiques. L'évaluation des niveaux de résistance aux antibiotiques a permis de mettre en évidence 67 souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. Par la suite une caractérisation moléculaire du gène responsable de la méthicillino résistance et une recherche des gènes de virulence ont été réalisées par PCR.

Nos résultats ont montré une prévalence importante de SARM (44.6%) au niveau de la communauté d'Annaba. Pour cela une surveillance régulière de l'état de sensibilité du *S.aureus* par les autorités sanitaires est recommandée afin de limiter la diffusion des souches résistantes au sein des établissements hospitaliers et dans la communauté.

L'identification des souches de SARM par différentes méthodes et la mise en évidence de leur résistance aux antibiotiques ont révélé l'importance de la fréquence des souches multirésistantes à divers antibiotiques spécifiquement aux bêtalactamines, aux aminosides, aux macrolides et aux fluoroquinolones. Cet usage exerce une pression de sélection qui induit l'apparition des résistances multiples additionnelles.

L'analyse des extraits d'ADN de ces souches par amplification révèle la présence du gène *mecA* qui pourrait être le déterminant génétique de cette résistance à la méthicilline.

La virulence des souches SARM peut s'exprimer en plus de leurs multirésistance aux antibiotiques par la production de certains facteurs tels que les toxines notamment la leucocidine de Panton Valentine qui détruit les leucocytes et provoque des infections nécrosantes sévères plus la toxine du syndrome du choc toxique qui à son tour provoque des chocs toxiques.

L'émergence et la diffusion de souches de SARM de sensibilité diminuée aux glycopeptides sont un phénomène à surveiller, car la transmission des SARM n'est pas maîtrisée et la consommation des glycopeptides élevée.

Dans la présente étude deux souches étaient de sensibilité diminuée à la vancomycine. Après une analyse des populations on a constaté que cette sensibilité est de type hétérogène. Ainsi après la mise en évidence de la caractérisation moléculaire des souches SARM il a été démontré que la souche GISA 04 est (*mecA*+, PVL+) tandis que la souche GISA 47 est (*mecA*+, PVL -).

La recherche sur les bactéries ayant de multiples résistances aux antibiotiques tel le SARM est nécessaire à une meilleure compréhension du phénomène de la résistance aux antibiotiques. Une meilleure connaissance des facteurs de virulence et du phénomène de colonisation et de propagation du SARM et de leurs résistances aux antibiotiques permettra de mettre en place de meilleure mesure de gestion du SARM dans les hôpitaux et dans la communauté. La prévention et le contrôle de la transmission du SARM dans les hôpitaux ainsi la communauté est une activité essentielle pour assurer la qualité et la sécurité des soins. Peu d'études sont actuellement disponibles sur la transmission d'infections, dont le SARM, dans la communauté et sur les mesures requises pour en réduire la survenue.

L'information et la formation de l'ensemble des professionnels de l'établissement en matière d'hygiène hospitalière doivent être assurées par un programme de lutte contre les infections nosocomiales, et enfin optimiser la surveillance de l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans le temps afin de mieux appréhender le problème de la multirésistance pour pouvoir arrêter son émergence.

Notre étude ouvre de nombreuses perspectives:

- Etudier une population plus importante pendant une période plus longue pour décrire le taux des infections à SARM.
- Evaluation des méthodes plus pratiques et rapides pour la détection de la résistance diminuée aux glycopeptides.

- Il est primordial de conduire des études d'épidémiologie moléculaire afin de comprendre et de contrôler la diffusion et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et pour savoir la clonalité des souches impliquées dans les infections à SARM en Algérie.
- il est nécessaire aussi d'évaluer dans un cadre clinique des méthodes de détection plus modernes, y compris moléculaire car les méthodes classiques de détection sont lentes, souvent prendre jusqu'à 72 heures pour confirmer la présence de SARM d'un écouvillon de dépistage ou d'un échantillon clinique.
- Des études sont nécessaires également sur la transmission du SARM et sur l'efficacité des interventions de lutte contre l'infection, et les résultats des stratégies d'éducation et de lutte contre l'infection pour prévenir et réduire le SARM.

*Références
bibliographiques*

A

Al Ruaily Meshref Awad and Omer Mohamed Khalil (2011). Detection of (*mec A*) gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at prince A/Rhman , sidery Hospital, AL-Jouf, Saudi Arabia. *J Med genitics and genomics*. 3:41-45.

Albertini MT, Benoit C, Berardi L, Berrouane Y, Boisivon A, Cahen P, and al (2002). Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended sepctrum betalactamase (ESBLE) in Northern France: a five-year multicentre incidence study. *J Hosp Infect*.52 (2): 107-113.

Alioua MA , Labid A, Amoura K, Bertine M, Gacemi-Kirane D, Dekhil M (2014) Emergence of the European ST80 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of healthcare-associated infections in Eastern Algeria. *Med Mal Infect* .44(4):180-3.

Amazian K, Abdelmoumene T, Sekkat S, Terzaki S, Njah M, Dhidah L et al (2006). Multicentre study on hand hygiene facilities and practice in the Mediterranean area: results from the Noso Med Network. *J Hosp Infect*. 62:311-318.

Antri K, Rouzic N, Boubekri I, Dauwalder O, Beloufa A, Ziane H, Djennane F, Neggazi M, Benhabyles B, Bes M, Tazir M, Etienne J, Ramdani-Bougouessa N (2010). High prevalence of community and hospital acquired infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin gene in Algiers. *Pathol Biol*. 58:15–20.

Aouati H, Arafa N, Benlabed K, Boulahrouf A, Bousseboua H (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at university hospital center Ben Badis of Constantine Algeria. *Rev Tunis Infect*. 4: 129-133.

Aouati H (2009). Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Thèse de magister. Université Mentouri. Constantine Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie Département De Biochimie et De Microbiologie.

Appelbaum PC (2006).MRSA the tip of the iceberg. *Clin Microbiol Infect*. 12: 3-10.

Arvidson S, Tegmark K (2001). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 291(2):159-70

Awad S, Elhabash S, Lee L, and al (2007). Increasing incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections: reconsideration of empiric antimicrobial therapy. *Am J Surg*. 194: 606-610.

B

Baba Moussa L, Sanni, A, Dagnra A.Y, Anagonou S, Prince-David M, Edoh V, Befort J.J, Prévost G, Monteil H (1999). Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la production de leucotoxines par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées en Afrique de l'Ouest. *Med Mal Infect*. **29**:689-96.

Baggett HC, Hennessy TW, Rudolph K, et al (2004). Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Panton- Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Infect Dis.* 189:1565-1573.

Bassetti S, Bischoff WE, Walter M et al (2005). Dispersal of *Staphylococcus aureus* into the air associated with a rhinovirus infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 26: 196-203.

Batard É, El Kouri D, Potel G (2007). Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. *EMC - Maladies infectieuses* .1-8

Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C (2003). Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol.* 41(4):1434-1439.

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

Ben Jemaa Z, Mahdjoubi F, Ben Hadj H'mida Y, Hammami N, Ben Ayed M, Hammami A (2004). (1993-1998) Profil bactériologique des bactériémies et sensibilité aux antibiotiques des bactéries en cause dans la région de Sfax. *Path Biol.* 52 :82-88.

Ben Nejma M, Mastouri M, Frih S, Sakly N, Ben Salem Y, Nour M (2006). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Tunisia. *Diag Microbiol Infect Dis.* 55:21-26.

Ben Nejma M., Mastouri M., Bel Hadj Jrad B., Nour M. (2013) Characterization of ST80 Panton-Valentine leukocidin positive community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone in Tunisia. *Diag. Microbiol. Infect Dis.* 77(1):20-4. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.010. Epub 2008 Apr 3.

Ben Saida N, Ben Abdallah H, Hannachi N, Boukadida J (2005). Multiclinality of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital. *Med Mal Infect.* 35: 363-366.

Benouda A et Elhamzaoui S (2009). *Staphylococcus aureus* : épidémiologie et prévalence des souches résistantes à la Méthicilline (SARM) au Maroc. *Rev Tun Infectiol.* 3(1): 15-20.

Berger-Bachi B (1994). Expression of resistance to methicillin. *Trends Microbiol.* 2: 389-393.

Berger-Bachi B (1995). Factors affecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 6: 21-23.

Bertrand X, Costa Y, Pina P (2005). Surveillance of antimicrobial resistance of bacteria isolated from bloodstream infections: data of the French National Observatory for Epidemiology of Bacterial Resistance to Antibiotics (ONERBA), 1998-2003. *Med Mal Infect.* 35: 329-334.

Bismuth R, Leclercq R (2000). *Staphylococcus aureus* et antibiotiques, in Précis de Bactériologie clinique. Ed ESKA. 611-616.

Blanc DS, Banuls AL, Hauser PM et al (2000). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: phylogenetic relatedness between European epidemic clones and Swiss sporadic strains. *Microb Drug Resist.* 6:231-238.

Boyle-Vavra S, Labinschiski H, Ebert CC, Ehlert K, Daum R (2001). A spectrum of change occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(1):280-287.

Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J. Clin. Microbiol.* 30:1654-1660

Bronner S, Monteil H, Prévost G (2004). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* .28(2):183-200.

Brun Y, Bes M (2000). *Staphylococcus*. In : Précis de Bactériologie Clinique, Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. eds. ESKA, Paris. 783-790.

Buckingham SC, McDougal LK, Cathey LD, et al (2004). Emergence of community associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. *Pediatr Infect Dis J.* 23:619-624.

C

CA-SFM. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommendations 2013.

Chambers HF (1988). Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev.*1:173-186.

Charlebois ED, Bangsberg DR, Moss NJ, Moore MR, Moss AR, Chambers HF, Perdreau-Remington F (2002). Population-based community prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the urban poor of San Francisco. *Clin Infect Dis.* 34(4):425-33.

Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I (2006). Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Pantón-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 12(1):29-34

Chongtrakoo P, Ito T, Xue Ma X, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chavalit T, Song JH and Hiramatsu K (2006). Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*(SCC*mec*) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus*

aureus Strains Isolated in 11 Asian Countries: a Proposal for a New Nomenclature for SCCmec Elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1001-1012

ColBVH, *S.aureus*-1999-data-type 3 blood cultures - Antibiotic Resistance, Available from:URL: <http://www.onerba.org>.

Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'inter-région Nord (CCLIN Paris-Nord). www.cclinparisnord.org

Contreras-Martel C, Job V, Di Guilmi AM, Vernet T, Dideberg O and A Coordination Centre against nosocomial infections interregion Paris-North, Central CLIN and inter CLIN Geriatric Assistance Public-Hospitals Paris (2006). Command of the spread of multiresistant bacteria to antibiotics. Sheets recommendations. Paris. C-CLIN Paris North.

Couture B (1990). Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris. 15-32.

Cox RA, Conquest C, Mallaghan C et al (1995). A major outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* caused by a new phage type (EMRSA-16). *J Hosp Infect.* 29:87-106.

Cruse P, Foord R(1980). The epidemiology of wound infection. A10 year prospective study of 62939 wound .*Surg.clin.North Amer.* 60:27-40.

D

Dali-Yahia R, Boubekri I and Boumendil K (2010). Résistance des bactéries aux antibiotiques: rappels et situation à l'EHUO (rapport présenté au CLIN). Service de bactériologie de l'EHUO.

Data from the National Observatory of Bacterial Resistance Epidemiology (ONERBA) (2005). Bacterial resistance to antibiotics. *Med Mal Infect* .35: 155-169.

Daurel C et Leclercq R (2010). Faut-il abandonner la vancomycine? *Arch. Ped.* 17: 121-128.

Daurel C, Leclercq R (2008). L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires*. 407 : 81-90.

David B (2010). Etude de la prise en charge ambulatoire des infections cutanées communautaires à staphylocoque doré .These de doctorat. Université Denis Diderot (Paris VII). Faculté de médecine. Paris 7

De Jonge BLM and Tomasz A (1993). Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin : functional role for penicillin binding protein 2a in a cell wall synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* . 37 : 342-346.

Decousser JW, Pina P, Delalande C, et al (2003). Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections: a French prospective national survey. *J Antimicrob Chemother* . 51 : 1213-1222.

Denis F, Cécile P, Martin C, Bingen E, Quentin R (2007). Bactériologie Médicale technique usuelles. Masson.254-260.

Deurenberg RH and Stobberingh EE (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*. 8:747-763

Deurenberg RH, Kalenic S, Friedrich AW, Tiel van FH and Stobberingh EE (2007). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. A. Méndez-Vilas (Ed.)

Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, Etienne J, Richet H (2002). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis*. 35(7):819-24.

Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schkeufer KH , Stackebrandt E (2006). The Prokaryotes: Bacteria:Firmicutes, Cyanobacteria.3^{eme} éd.Springer,New-York,.Vol 4

E

Ehlert K, Schroder W, Labischinsky H (1997). Specificities of *FemA* and *FemB* for different glycine residues: *Fem B* cannot substitute for *FemA* in staphylococcal peptidoglycan pentaglycin side chain formation. *J. Bacteriol*. 179: 7573-7576.

Elazhari M, Zerouali K, Elhabchi D, Cohen N, Elmalki A, Dersi N, Hassar M, Timinouni M, Salie R (2010). Antibiotic susceptibility of strains of *Staphylococcus aureus* community in Casablanca (Morocco). *Rev Tunis Infect*. 4:134-140.

Elhamzaoui S, Benouda A, Allali F, Abouqual R, Elouennass M (2009). Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated in two university hospitals in Rabat, Morocco. *Med Mal Infect*. 39:891-895.

El-Ghodban A, Ghenghesh KS, Márialigeti K, Esahli H, Tawil A (2006). PCR Detection of Toxic Shock Syndrome Toxin of *Staphylococcus aureus* from Tripoli, Libya. *J Med Microbiol* .55: 179-182.

Elouennass M, Sahnoun I, Zrara A, Bajjou T, Elhamzaoui S(2008). Epidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémoculture dans un service de réanimation (2002–2005). *Méd Mal Inf* . 38 : 18–24.

Ender M, Mc Callum N, Adhikari R, Berger-Bächi B (2004). Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 48(6):2295-2297.

Eyque MA, Alouf J and Montagnier L (1998). Traité de Microbiologie Clinique «Staphylocoques» Nevine EL SOLH. PICCIN NUOVA, Italie. 567-591.

F

Fauchere JL and Avril JL (2002). Bactériologie générale et médicale. ellipses, Paris. 213-217 .

Fisher JF, Meroueh SO and Mobashery S (2005). Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. Chem. Rev.105: 395-424.

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

Frénay H, Schouls, Van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls JE, Verhoef J, and Mooi FR (1996). Molecular Typing of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* on the Basis of Protein A Gene Polymorphism. Euro J. Clin Microb & Infect Dis. 15:60-64

Fueyo J, Mendoza MC, Rodicio MR, Muniz J, Alvarez M, Martín MC (2005). Cytotoxin and Pyrogenic Toxin Superantigen Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Associated with Subclinical Mastitis in Dairy Cows and Relationships with Macrorestriction Genomic Profiles. Journal of clinical microbiology .43: 1278-1284

G

Garnier F, Mariani-Kurkdjian P, Nordmann P, Ferroni A, Vu-Thien H, Philippe JC, and al (2002). Antibiotic susceptibility of strains of staphylococci and enterococci isolated in pediatric. Med Mal Infect. 32: 432-438.

Garrity GM, Johnson KL, Bell J and Searles DB (2002). Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, second ed. Springer-verlag, New York. 60.

Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzéby J and Tindall BJ (2007). Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7 March 6," Part 9- the Bacteria: Phylum "Firmicutes": Class "Bacilli"

Gemmell CG (2004). Glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: is it a real threat? J. Infect. Chemother. 10: 69-75.

Gilmore KS, Gilmore MS and Sahm DF (2008). Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* .291-312. In R. G. Wax, K. Lewis, A. A. Salyers, and H. Taber (ed.), Bacterial Resistance to Antimicrobials, Second ed. CRC Press, Boca Raton.

Gras D (2006). Etude des interactions entre les cellules épithéliales respiratoires humaines normales et mucoviscidiques et *Staphylococcus aureus* thèse de doctorat : Université de REIMS Champagne Ardenne U.F.R. de médecine. 185.

Greene C, Mc Devitt D, Francois P, Vaudaux P, Lew DP and Foster TJ (1995). Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. Mol. Microbiol. 17:1143–1152.

Grohs P (2009). Evolution de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques : la méticilline est-elle encore un marqueur de multirésistance ? Pathol Biol. 57 : 1–8.

Grundmann H, Aires de Sousa M, Boyce J, Tiemersma E (2006). Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. Lancet. 368: 874–885.

Guignard BJ, Entenza M and Moreillon P (2005). Beta-lactams against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Curr. Opin. Pharmacol. 5:479-489.

Gus W, Krucke M, Deanna E, Grimes PH, Richard M, Thai D, Dang MD (2009). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*—containing cutaneous abscesses of patients with HIV. American Journal of Emergency Medicine. 27: 344–347.

H

Halem M, Trent J, Green J, Kerdel F (2006). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections. Semin Cutan Med Surg. 25: 68-71.

Hamdad F, Donda F, Laurans G, Canarelli B, Rousseau F, Biendo M, Thomas D, Eb F (2006). Performance of different methods of oxacillin resistance detection in atypical strains of *Staphylococcus aureus*. Pathol Biol. 54: 447–452.

Hamze M, Dabboussi F, Daher W, Izard D (2003). Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* at north Lebanon: place of the methicillin resistance and comparison of detection methods. Pathol Biol. 51: 21-26.

Hidron AI, Kourbatova EV, Halvosa JS et al (2005). Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage. Clin Infect Dis. 41: 159-66.

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M et al. (2001). The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 9:486-493.

Hiramatsu K, Hanki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC (1997). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother.40:135–136.

Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM (2005). *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. J Clin Microbiol. 43(5):2384-90.

Honeyman A, Friedman H, Bendinelli M (2002). *Staphylococcus Aureus* Infection and Disease. Springer Science.

Hübscher J, Jansen A, Otte O, Schofer J, Majcherzck PA, Harris LG, Bierbaum G, Heinemann M et Berger-Bachi B (2007). Living with an imperfect cell wall: compensation of *femAB* inactivation in *Staphylococcus aureus*. BMC Genomics. 8: 307.

I

Iandolo JJ, Worrell VK, Groicher H et al(2002). Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. Gene. 289:109-118.

Institut de veille sanitaire (InVS) et Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. Bilan des données de surveillance, 18 novembre 2014. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire ; 2014. 10 p. Disponible à partir de l'URL : <http://www.invs.sante.fr>

Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother.45:1323–36.

(IWG-SCC), I. W. G. o. t. C. o. S. C. C. E. (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. Antimicrob Agents Chemother .53:4961-4967.

J

Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect Immun. 70(2):631-641.

Jacoby GA (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. Clin. Inf. Dis.41: 120-126.

Joffin JN, Leyral G (2001). Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques, 3ème Edition, Bordeaux : CRDP d'Aquitaine. 320.

Joly-Guillou M.L (2004). *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in ICU. Réanimation. 13:185–189.

K

Kesah C, Ben Redjeb S, Odugbemi TO, Boye CS, Dosso M, Ndinya Achola JO, Koulla-Shiro S, Benbachir M, Rahal K, Borg M (2003). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. Clin Microbiol Infect. 9(2):153-156.

Klebens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R; National Nosocomial Infections Surveillance System (2006). Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. Clin Infect Dis. 42(3):389-391.

Khanna T, Friendship R. Dewey C and Weese JS (2008). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Vet Microbiol. 128:298-303.

Kloos WE and Lambe DW (1981). *Staphylococcus*. In manual of clinical microbiology, 4th ed Am. Soc. For Microbiology. 222-235

Kluytmans J, van Belkum A and H. Verbrugh (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. 10:505-520.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et al (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 357:1225–1240.

L

Le Loir Y et Gantier M. (2010). *Staphylococcus aureus*. Lavoisier. 1-3.

Minor L et Veron M. (1990). Bactériologie Médicale «*Staphylococcus* et *Micrococcus*» J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794.

Leclercq R (2002). Résistance des Staphylocoques aux antibiotiques. Ann Fr Anesth Réanim. 21: 375-383

Lee CK and Glenn DJ (1995). Cefotaxime and ceftriaxone use evaluation in pediatrics. Consideration of cost-effectiveness. Diagn Microbiol Infect Dis. 22:231-233.

Levine DP (2006). Vancomycin: a history. Clin. Infect. Dis. 42: 5-12.

Lindsay JA, Holden MT (2004). *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? Trends Microbiol. 12: 378-385.

Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA (2000) A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. Infect Immun. 6: 6398-6401.

Loulergue P, Tourret S (2003). Le staphylocoque doré résistant à la méticilline d'origine communautaire. Lyon. Mémoire de DES.

Lowy FD (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest. 111: 1265-1273.

M

Mainardi JL, Goldstein FW, Gutmann L (1996). Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris). Maladies infectieuses. 10 : 8 .

Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, Kosowska-Shick, Appelbaum PC and Hryniewicz W (2005). Comparison of multiple-locus variable-number tandem -repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol. 43:309-314.

Maltezou HC, Giamarellou H (2006). Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections. International Journal of Antimicrobial Agents. 27: 87-96

Mastouri M, Nour M, Ben Nejma M, Bouallegue O, Hammami M et Khedher M (2006). Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline: détection des premières souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Path. Biol. 54: 33-36.

Meddeb I, Zaraa M, Zribi S, Trojjet D, El Euch A, Mebazaa R, Cheikhrouhou M, Mokni C, Fendri A, Ben Osman (2009). Les infections cutanées staphylococciques: à propos d'une série hospitalière. La Tunisie Médicale. 87(11): 778-781.

Mehndiratta PL, Bhalla P (2012). Typing of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A technical review. Indian J Med Microbiol; 30(1): 16-23.

Meletis G (2012). Heteroresistance. Infection Control - Updates, Dr. Christopher Sudhakar, Available from: http://www.intechopen.com/books/infection_controlupdates/heteroresistance.163-180.

- Merlet A (2010). Implication de la leucocidine de Panton et Valentine dans les infections sévères à *Staphylococcus aureus* en Nouvelle-Calédonie thèse de doctorat : Université Bordeaux 2 des sciences médicales.117.
- Messadi A, Thabet L, Bouselmi K, Ben Rjedjeb S (2006). Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées au service de réanimation des brûlures. *Tunis Med.* 84: 74-77.
- Mezghani Maalej S, Malbruny B, Leclercq R, Hammami A (2012) .Emergence of *Staphylococcus aureus* strains resistant to pristinamycin in Sfax (Tunisia). *Pathol Biol.* 60(6): 71-74.
- Monno R, De Vito D, Ceci G, Costi A, Coscia F, de Nicolo T, Rizzo G (2003). Comparative evaluation of test assays for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* Jun. 9(6):574-575.
- Moore PC, Lindsay JA (2002). Molecular characterisation of the dominant UK methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains, EMRSA-15 and EMRSA-16. *J Med Microbiol.* 51: 516-521.
- Morgan M, Salmont R, Keppie N, Evans-William D, Hosein I, Looker DN(1999). All Wales surveillance on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): The first year's results. *J Hosp Infect.*41:173–179.
- Moser SA, Box MJ, Patel M, Amaya M, Schelonka R, and Waites KB (2009). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* discriminates within USA pulsed-field gel electrophoresis types. *J Hosp Infect.* 71:333-339.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA and Tenover FC (2003). *Manual of Clinical Microbiology* (8th ed.). Herdon, VA, United States of America : American Society for Microbiology.

N

- Ng ST, Lim CY, Tan CS, Abd Karim A, Haron A, Ahmad N and Murugaiyah V (2011). Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA). *Web med Central Inf. Dis.* 2: 2787.
- NOUWEN JL, VAN BELKUM A, VERBRUGH HA (2001). Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *The Netherlands J. Med.* 59, 126-33.

O

- Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H (2001.) The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist.* 7: 349-361.

Otter JA and French GL (2010). Molecular epidemiology of community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet Infect Dis. 10: 227-239

Owona D , Woestyn S , Olive N , Gigi J , Delmée M (2002). Évaluation de méthodes phénotypiques de détection de la résistance hétérogène de *Staphylococcus aureus* à la méthicilline. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée. 17(2): 113–117

Ouchenane Z, Smati F, Rolain J M, Raoult D (2011). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Algeria. Pathol. Biol. 59: 129-132.

P

Patel M, Waites KB, Hoesley CJ, Stamm AM, Canupp KC, Moser SA (2008). Emergence of USA300 MRSA in a tertiary medical centre: implications for epidemiological studies. J Hosp Infect. 68:208–213.

Picot S, Rakotomalala R.S, Farny K, Simac C, Michault A (2010) . Evolution de la résistance aux antibiotiques de 1997 à 2005 à la Réunion. Méd Mal Infect. 40 : 617-624.

Pillar CM, Draghi DC, Sheehan DJ, Sahm DF (2008). Prevalence of multi drug resistant, methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: findings of the stratified analysis of the 2004 to 2005 LEADER Surveillance Programs. Diag Microbiol Infect Dis. 60 : 221-224.

Poole K (2004). Uninhibited antibiotic target discovery via chemical genetics. Nat Biotechnol. 22(12):1528-1529.

Prescott LM, Harley JP, Klein D (2010). Microbiologie. 2ème Edition Française. De Boeck Université.

Prescott JF, Boggot JD and Walker RD (2000). Antimicrobial Therapy, Third ed. Iowa State University Press / Ames, Danvers.

Otsuka T, Zaraket H, Takano T, Saito K, Dohmae S, Higuchi W, et al (2007). Macrolide lincosamide-streptogramin B Resistance phenotypes and genotypes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan. Clin Microbiol Infect Dis. 13:325–7.

Q

Quincampoix JC and Mainardi JL (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. Réanimation 10:267-275.

R

Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, et al (2006). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to

multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrob Agents Chemother.*50:1083-1085.

Rampling A, Wiseman S, Davis I et al (2001). Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect.* 49: 109-16.

Rasheed MU, Ahmed Z (2010). Phenotypic methods of greater accuracy to detect the *mecA* gene product for the recognition of MRSA in resource constraint settings. *Asian Paci J Tropic Med.* 741-744.

Rebiahi S A (2011).Caracterisation de souches de *Staphylococcus aureus* et etude de leurs antibirésistance au niveau du centre hospitalo universitaire de Tlemcen. Thèse de doctorat : Uiversité de Tlemcen, Option Microbiologie.168.

Rebiahi SA, Abdelouahid DE, Rahmounb M, Abdelali S, Azzaoui H (2011). Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria). *Med Mal Infect.*41:646-651

Reece RJ (2004). *Analysis of Genes and Genomes*, John Wiley & Sons, Ltd, England.153-182.

Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin), (2013).Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai- juin 2012 (Résultats). Institut de Veille Sanitaire. 181.

Reipert A, Ehlert K, Kast T et Bierbaum G (2003). Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 568-576.

Robert J, Tristan A, Cavalié L, et al (2011). PantonValentine Leukocidin-Positive and Toxic Shock Syndrome Toxin 1-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a French Multicenter Prospective Study in 2008. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 1734–1739.

Robert J, Etienne J, Bertrand X, ONERBA (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton–Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000–2003. *Clin Microbiol Infect.* 11: 585–587.

Romero-Vivas J, Rubio M, Fernandez C, Picazo J(1995). Mortality Associated with Nosocomial bacteremia due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.*21:1417–1423.

S

Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W. Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, Travis J and Potempa J (2003). New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol.*41:1801-1804.

- Sadsad R, Sintchenko V, McDonnell GD, Gilbert GL (2013). Effectiveness of Hospital-Wide Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infection Control Policies Differs by Ward Specialty. PLoS ONE 8(12): e83099. doi: 10.1371/journal.pone.0083099
- Saidani M, Boutiba I, Ghazzi R, Kammoun A, Ben Redjeb (2006). Profil bactériologique des bactériémies à germs multirésistants à l'hôpital Charles-Nicolle de Tunis. Med Mal Inf. 36:163-166.
- Said-Salim B, Mathema B, Braughton K, Davis S, Sinsimer D, Eisner W et al (2005). Differential distribution and expression of Panton-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 43:3373-3379.
- Salyers AA and Whitt DD (2002). Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach, Second Edition ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Schlievert PM, Case LC (2007). Molecular analysis of staphylococcal superantigens. Methods Mol Biol. 391:113-26.
- Schouls LM, Spalburg EC, van Luit M, Huijsdens XW, Pluister GN, Schwarz-Linek U, Höök M, and Potts JR (2009). The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. Molecular Microbio. 52(3):631–641.
- Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP and Gastra W (2010). Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. J Antimicrob Chemother. 65: 601–604.
- Seydi M, Sow AI, Soumaré M, Diallo et al (2004). *Staphylococcus aureus* bacteremia in the Dakar Fann university hospital. Med Mal. 34:210-215.
- Shittu AO and Lin J (2006). Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. BMC Infect Dis. 6:125-129.
- Shrestha NK, Tuohy MJ, Padmanabhan RA, Hall GS, Procop GW (2005). Evaluation of the Light Cycler *Staphylococcus* M GRADE kits on positive blood cultures that contained gram-positive cocci in clusters. J Clin Microbiol. 43(12):6144-6.
- Siegel J, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L (2007). Management of multidrug resistant organisms in health care settings. Am J Infect Control. 35:165-193.
- Soraa N, Tali A, Addebous A, Zahlane K, Bouskraoui M, Chabaa L (2012). Epidémiologie et résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* dans un hôpital pédiatrique au CHU de Marrakech. J Biol Médicale. 39–43
- Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale en médecine humaine et vétérinaire, 3ème édition 2005.

Sung JML, Lloyd DH, Lindsay JA (2008). *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. Microbiology 154:1949-1959.

T

Taconelli E1 and Cataldo MA (2007). Antimicrobial therapy of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. Expert Opin Pharmacother. 8(15):2505-2518.

Tchougoune ML (2007). Prévalence des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline au CHU du Point G. Thèse de doctorat : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odontostomatologie. 89.

Teare EL, Cookson B, French GL, et al (1999). Hand washing initiative. J Hosp Infect. 43: 1- 3.

Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR et al (1995). Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. J Clin Microbiol .33:2400-2404.

Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA et al (2006). Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol.36: 1020-1027.

Tiemersma EW1, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H; European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. Emerg Infect Dis. 10(9):1627-34.

Tiwari B (2009). Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* may occur faster than expected. Int. J. Life Sci. 3: 6-13.

Todd JK, Franco-Buff A, Lawellin DW, Vasil ML (1984). Phenotypic Distinctiveness of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Toxic Shock Syndrome. Infection and immunity .45: 339- 344.

Touaitia Rahima, Boutefnouchet Nafissa and Djahoudi Abdelghani (2015). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and/or intermediate susceptibility to vancomycin isolated from private laboratories in Annaba "Algeria". J Chemi and Pharm Research. 7(5):780-786.

Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, et al (2007). Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis.13:594–600.

Tremblay C (2008) .Mise à jour du traitement des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. Pharmactuel. 41 (5):284-295

Troillet N, Carmeli Y, Samore MH, Dakos J, Eichelberger K, DeGirolami PC, Karchmer AW(1998). Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission. Infect Control Hosp Epidemiol. 19(3):181-185.

Trouillet S (2011) Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Mémoire : Minister de l'enseignement supérieur et de la recherche école pratique des hautes études .102

U

Utsui Y and Yokota T (1985). Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem- resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 28: 397-403.

V

Van Griethuysen A, Van't Veen A, Buiting A, Walsh T, Kluytmans J (2003). High percentage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to glycopeptides in the Netherland. J Clin Microb.41:2487–2491.

Vandenesch F, Lina G, Gillet Y, Etienne J, Cremieux AC (2009). The end of the controversy: Panton Valentine is the culprit. Med Sci (Paris). 25(11):984-6.

Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, and Butaye P (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. Epidemiol Infect .138:606-625.

Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G(2005). Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 55(3):379-382.

Vincent R (2006). Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres relation avec la qualité du vin .Thèse de Docteur de l'institut national polytechnique .Toulouse.109-114.

Vlieghe E1, Phoba MF, Tamfun JJ, Jacobs J (2009). Antibiotic resistance among bacterial pathogens in Central Africa: a review of the published literature between 1955 and 2008. Int J Antimicrob Agents. 34(4):295-303.

W

Weber SG, Gold HS, Hooper DC, Karchmer AW, Carmeli Y (2003). Fluoroquinolones and the Risk for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitalized Patients1. Emerg Infect Dis. 9:1415-1422.

Wisplinghoff H, Ewertz B, Wisplinghoff S, Stefanik D, Plum G, Perdreau F, and Seifert H (2005). Molecular Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Metropolitan Area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998. J Clin Microbiol. 43(11):5445–5451.

Witte W (2004). International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial

Path gens. Infect Genet Evol. 4:187-191.

Wu SW, de Lencastre H and Tomasz A (2001). Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 183:2417-2424.

Z

Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, and Conly JM (2005). Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 43:5026-5033.

Zribi M, Snoussi Y, El Euch D, Masmoudi A, Ben Osman A, Fendri C (2006). Prévalence des Staphylococcies cutanées et facteurs favorisants. Essaydali.100: 29-34.

Staphylococcus aureus est un pathogène à fort potentiel épidémique fréquemment impliqué dans des infections hospitalières et communautaires. Dans notre étude, 150 souches communautaires de *S.aureus* ont été collectées pendant une période de deux ans, dont 67 souches sont résistantes à la méthicilline.

L'isolement et l'identification des souches de *S. aureus* ont été fondés sur les méthodes conventionnelles. La résistance à la méthicilline de ces souches a été détectée par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton accompagné d'un dépistage à l'oxacilline (6µg/ml). Nous avons également étudié la résistance de ces souches à diverses familles d'antibiotiques. La sensibilité diminuée aux glycopeptides des souches suspectées a été confirmée après détermination de la CMI à la vancomycine par E-Test. La détection de la résistance à la méthicilline a été complétée par recherche du gène *mecA* par PCR. Une autre duplexe PCR a été faite pour la recherche des gènes de virulence codant pour la PVL et la toxine du choc toxique TSST1.

L'analyse globale de la sensibilité aux antibiotiques a confirmé le caractère multirésistant des SARM. L'étude de la sensibilité aux glycopeptides a permis de détecter deux souches (04 et 47) de sensibilité diminuée. L'amplification du gène *mecA* chez 12 souches a été positive pour 10 et négative pour 2 souches alors que la PVL était positive pour 06 souches et aucune souche était positive pour le gène *tst* codant pour la TSST1.

La multirésistance des souches SARM est non négligeable, d'où la nécessité d'une surveillance régulière. Le phénomène « GISA » est aujourd'hui un phénomène en observation qu'il conviendrait de mieux cerner en termes de détection et de prévalence.

Mots clés : antibiotique, GISA, SARM, *mecA*, PVL

Staphylococcus aureus is a pathogen with high epidemic potential commonly implicated in hospital and community infections. In our study, 150 community strains of *S.aureus* were collected for a period of two years, of which 67 strains were resistant to methicillin.

The aim of this study is to determine the frequency of MRSA strains and GISA as well as resistance profile to different families of antibiotics. 150 strains of *S.aureus* are isolated from different pathological origins. The isolation and the identification of *S.aureus* strains were based on conventional methods. The resistance to methicillin of these strains was detected by the method of disk diffusion in Mueller-Hinton and a screening by oxacillin (6 µg/ml). Furthermore, a study of the resistance of these strains to different families of antibiotics is done. Decreased sensitivity to glycopeptides of suspected strains was confirmed after determination of the MIC to vancomycin by E-test. The detection of methicillin resistance was supplemented by research of the *mecA* gene by PCR. Another duplex PCR was made to search for virulence genes encoding PVL toxin and toxic shock TSST1.

The MRSA strains expressed resistance to different antibiotic families. We identified two MRSA strains (04 and 47) showing reduced glycopeptides susceptibility. Amplification of *mecA* gene in 12 strains was positive for 10 and negative for 2 strains while the PVL was positive for 06 strains and no strain was positive for *tst* gene encoding TSST1.

Since the multi-drug resistant MRSA strains are not negligible, a regular supervision is necessary. The "GISA" is an observation phenomenon that should better be defined in terms of detection and prevalence.

Keywords: antibiotic, MRSA, *mecA*, GISA, PVL.

تعد بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية عامل ممرض ذو احتمالية عالية عادة في عدوى المستشفيات والمجتمع. في دراستنا، تم جمع 150 سلالات من *S.aureus* لمدة عامين، من بينها كانت 67 سلالة مقاومة للميثيسيلين.

تم عزل 150 من سلالات البكتيريا من أصول مرضية مختلفة. وقد استند العزل والتعرف على سلالات من بكتيريا المكورة العنقودية الذهبية على الطرق التقليدية. تم الكشف عن المقاومة للميثيسيلين عند هذه السلالات من خلال طريقة نشر القرص على أجار مولر هينتون يرافقه فحص لأوكساسيلين (6مكروغرام / مل). كما قمنا بدراسة مقاومة هذه السلالات لمختلف عائلات المضادات الحيوية. قمنا بالكشف عن الحساسية المتناقصة لـ glycopeptides بعد تحديد الحد الأدنى للتركيزات المثبطة للفانكومايسين بواسطة E-Test. واستكمل الكشف عن المقاومة للميثيسيلين بالبحث عن الجينات *mecA* بواسطة PCR. وقمنا بالبحث عن الجينات السمية لتشفير السم PVL و TSST1 بواسطة تقنية PCR مزدوجة.

وقد أكد تحليل شامل للحساسية للمضادات الحيوية طبيعة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لـ MRSA. كشف دراسة حساسية لـ glycopeptides سلالتين (04 و 47) من انخفاض حساسية. كان البحث عن الجين *mecA* عند 12 سلالة إيجابيا في 10 وسلبيا في سلالتين بينما كان PVL إيجابيا لـ 6 سلالات ولم يكن ترميز TSST1 إيجابيا لأي سلالة.

تظهر النتائج أن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لسلالات MRSA كانت مرتفعة، وبالتالي الحاجة إلى مراقبة منتظمة. وتعد ظاهرة "GISA" حاليا ظاهرة ينبغي أن تعرف تقدما نحو الأفضل فيما يخص طرق الكشف والانتشار.

الكلمات المفتاحية: مضاد حيوي، MRSA، GISA، *mecA*، PVL

Annexe



Research Article

ISSN : 0975-7384
CODEN(USA) : JCPRC5

Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and/or intermediate susceptibility to vancomycin isolated from private laboratories in Annaba "Algeria"

Touaitia Rahima¹, Boutefnouchet Nafissa¹ and Djahoudi Abdelghani²

¹Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences, Department of Biochemistry, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria

²Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Medicine, University of Badji Mokhtar, Annaba, Annaba, Algeria

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) represents the severe causal agent in nosocomial infections that are becoming increasingly difficult to cure due to their emerging resistance to all current antibiotic classes. The aim of this study is to determine the frequency of MRSA strains and GISA as well as resistance profile to different families of antibiotics. 67 strains of MRSA are isolated from different pathological origins. The isolation and the identification of *S. aureus* strains were based on conventional methods. The resistance to methicillin of these strains was detected by the method of disk diffusion in Mueller-Hinton and a screening by oxacillin (6 µg/ml). Furthermore, a study of the resistance of these strains to different families of antibiotics is done. Decreased sensitivity to glycopeptides of suspected strains was confirmed after determination of the MIC to vancomycin by E-test. The study has shown that 67 strains resistant to methicillin were identified among the 150 strains isolated (44,6%). The MRSA were isolated from pus (71, 6%), urine (17, 9%) and vaginal samples (10,4%). These MRSA strains expressed resistance to different antibiotic families. We identified two MRSA strains (M04 and M47) showing reduced glycopeptides susceptibility. Since the multi-drug resistant MRSA strains are not negligible, a regular supervision is necessary. The "GISA" is an observation phenomenon that should better be defined in terms of detection and prevalence.

Keywords: MRSA, Glycopeptides, GISA, multi-drug resistance, resistance profile

INTRODUCTION

Since the first infected cases with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) reported in 1961 in England, MRSA have been described successively, first in mainland Europe, America and then in the worldwide [1]. In the early eighties, the proportion of MRSA strains on all the strains of *S. aureus* was less than 3%. Ten years later, MRSA strains were a major problem in many hospitals in the United States and Europe, where the proportion of MRSA strains was 40% [2]. MRSA is one of the main pathogens that are associated with serious nosocomial infections because these strains generally show a multi antibiotic resistance which limits the possibility of treatment [3,4]. MRSA has also been spread outside of the hospital environment and it now appears in the community without any identifiable risk factors [5]. Methicillin resistance in *S. aureus* is due to the acquisition of the *mecA* gene, which encodes the low affinity of penicillin-binding protein 2a [6]. This methicillin resistance also causes resistance to all other penicillins and cephalosporins (2). Since 1980, gentamicin resistant strains have appeared and spread rapidly around the world [7]. Then in the 1990s, the frequency of isolation of strains susceptible to gentamicin rose again to become a great majority today (84% according to the data CCLIN Paris-Nord 1998) [7].

Finally, since the late of 90s, strains with intermediate susceptibility to glycopeptides (GISA) appeared and became emerging [8]. This study aims to determine both the frequency of MRSA and GISA strains isolated and characterize their phenotypes of resistance to other antibiotics.

EXPERIMENTAL SECTION

Bacterial strains :

A total of 150 *S. aureus* were collected from different pathological origins (pus, urine, vaginal sample) of community infections in Annaba which were isolated between 2010 and 2012. Each strain was cultured on agar Chapman and incubated at 36 ° C for 18 to 24 hours.

Identification of the species *S. aureus*:

The identification of the species *S. aureus* was based on the following microbiological tests: microscopic observation in the fresh state and after Gram staining, the catalase, fermentation of mannitol, coagulation of rabbit plasma test and the API Staph system.

Antibiotic susceptibility test:

Antibiotic resistance was determined by the disk diffusion method (Bio-Rad, France) in Mueller-Hinton agar (Bio-Rad) according to the recommendations outlined by the CA-SFM 2013 (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie).

The tested antibiotics were: Penicillin G (PG-6µg), Oxacillin (Ox-5µg), Cefoxitin (FOX-30 µg), Gentamicin (GM-15µg), Tobramycin (TOB-6 µg), Amikacin (AK-30 µg) Kanamycin (K-30UI), Tetracycline (TE-30µg), Lincomycin (MY-15 µg), Erythromycin (E-15µg), Pristinamycin (PR-15 µg) Chloramphenicol (C-30µg), Ofloxacin (OFX-5µg), Fusidic acid (FA-10 µg), Vancomycin (VA-30µg), Teicoplanin (TEC-30 µg), Rifampicin (RA-50µg), Minocycline (MH-30UI), Fosfomycin (FO-50 µg), Trimethoprim (W-5µg) and Trimethoprim-sulfamethoxazole (cotrimoxazole) (SXT-1.25 / 23.75 µg).

Phenotypic detection of methicillin resistance:

Method of oxacillin disk diffusion:

An oxacillin disk (1µg) was applied on a MH agar supplemented with 2% NaCl for the detection of MRSA according to the directives of CLSI 2012[9]. After incubation at 36 ° C for 24 hours, strains were considered resistant if the inhibition diameter was ≤10 mm, intermediate if the diameter was 11-12 mm and sensitive for diameters ≥13 mm[10,11].

Method of Cefoxitin disk diffusion:

This method was performed by the use of cefoxitin disk (30µg) on MH agar. An inhibition zone ≤ 21mm reads Methicillin resistance and a diameter ≥ 22mm indicates sensitivity[11].

Oxacillin screening Test:

A 10 µl of bacterial suspension prepared at 0.5 McFarland was inoculated by spot onto Muller-Hinton agar containing 4% NaCl and 6µg/ml oxacillin and incubated at 36 ° C for 24 hours. The growth of more than a colony is sufficient to determine methicillin resistance [12,13,14].

Two reference strains (*S. aureus* resistant to methicillin ATCC 43300) and (*S. aureus* sensitive to methicillin ATCC 25923) were used to control quality of susceptibility testing.

Detection of MLSB resistance:

To identify the MLSB phenotype, the D-test was performed. A lawn culture of the isolate which was adjusted to 0.5 McFarland's concentration was made on a Mueller Hinton agar plate and discs of clindamycin (2µg) and erythromycin (15µg) were placed at a distance of 15mm (edge to edge) as per the CLSI recommendations 2009, along with routine antibiotic susceptibility testing.

D Positive (iMLSB Phenotype): Inducible resistance to clindamycin was manifested by flattening or blunting of the clindamycin zone adjacent to the Erythromycin disc, giving a D shape

Determination of vancomycin MIC by E-test:

The selection of strains with reduced susceptibility to glycopeptides and confirmation of this reduction were performed according to the recommendations of CA-SFM 2013. After incubation for 24 or 48 hours depending on the composition of the medium, the MIC value corresponded to the intersection of the two ellipses where the

inhibition of growth was completed. The presence of microcolonies within the ellipse must be considered. This phenomenon is mostly observed with heterogeneous resistance to vancomycin. A strain *S. aureus* ATCC 25923, susceptible to glycopeptides was used as a negative control and a laboratory strain of *Enterococcus gallinarum* resistant to glycopeptides was used as a positive control [15,16].

The strain was categorized as sensitive if MIC value was less than or equal to 4 µg/ml, intermediate for MIC values ranging $4 < \text{MIC} \leq 8$ µg/ml and resistant for MIC values greater than 8 µg/ml

RESULTS AND DISCUSSION

Among 150 strains of *S. aureus*; 67 strains (44, 6%) were MRSA, forty-eight (71.6%) MRSA were isolated from pus, 12 strains (17.9%) from urine and 7 strains (10, 4%) from vaginal specimens.

Among 67 strains of MRSA which were obtained from patients of determined age: 52 (77.6%) were isolated from patients aged between 18 and 65 years, 15 (22.3%) from children aged between 1 year old to 17 years. Most strains were isolated from males patients 48 (71, 6%).

The percentage of antibiotic resistance of the 67 MRSA tested are reported in Table 1. (The strains with intermediate susceptibility were considered resistant to antibiotics in the expression of results: I = R).

Table 1: Percentage of antibiotic resistance

ATB	Resistant MRSA %	sensitive MRSA %
Oxacillin	100	0
Penicillin	100	0
Cefoxitin	100	0
Gentamicin	22,3	77,6
Tobramycin	59,7	40,2
Kanamycin	100	0
Amikacin	34,3	56,6
Erythromycin	46,2	53,7
Pristinamycin	4,4	95,5
Lincomycin	09	92
Ofloxacin	68,6	31,3
Rifampicin	32,8	67,1
Minocycline	74,6	25,3
Tetracycline	83,5	16,4
Chloramphenicol	12	88
Fosfomycin	34,3	65,6
Trimethoprim	46,2	53,7
Trimethoprim-sulfamethoxazole	46,2	53,7
Fusidic acid	65,6	34,3

To characterize more precisely the set of MRSA strains studied, we analyzed their phenotype of resistance to aminoglycosides and macrolides.

The study of resistance phenotypes of our MRSA to aminoglycosides showed three types; involving three inactivating enzymes (Table 2). All MRSA strains were resistant to kanamycin. 23 strains (34.3%) had a phenotype K, due to the production of the enzyme-Aminoglycoside phosphotransferase APH (3')-III. 26 (38.8%) were resistant to kanamycin and tobramycin, KT is the phenotype expressed by the production of the enzyme-Aminoglycosides nucleotidyltransferases ANT (4') (4''), while 16 strains (23.8%) expressed the KTG phenotype and were resistant to the three antibiotics (kanamycin, tobramycin, gentamicin) due to the bifunctional enzyme APH (2'') - Aminoglycosides acetyltransferases AAC (6') [17].

Table 2: Phenotypes of MRSA resistance to aminoglycosides

Kanamycin	Tobramycin	Gentamicin	Mechanism Inferred	MRSA (%) n=67
S	S	S	Sensitive	0
R	S	S	APH(3')-III	23 (34,3)
R	R	S	ANT (4') (4'')	26(38,8)
R	R	R	APH(2'')- AAC (6')	16(23,8)

About macrolides (Table 3), it is noted that 31 strains (46.2%) were resistant to erythromycin. The MLSb phenotype involves cross-resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin B by methylation of 23S ribosomal RNA. The phenotype MLSb can be induced by erythromycin in which case an antagonism between erythromycin and

clindamycin can be observed; it is the case of 27 (40.2%) MRSA strains. Resistance to erythromycin can also be expressed constitutively while also conferring resistance to clindamycin 05 strains (07.4%).

Table 3: Phenotypes of MRSA resistance to macrolides

Erythromycin	Clindamycin	Pristinamycin	mechanism Inferred	MRSA (%) n=67
S	S	S	Sensitive	34 (50,7)
R	S	S	MLSB induct	27 (40,2)
R	R	S	MLSB constut	05 (07,4)

Analysis of the results showed that the most active antibiotic was pristinamycin (4.4%resistance) followed by lincomycin (9%) and chloramphenicol (12%).

According to the criteria of suspicion of reduced sensitivity to glycopeptides which are routinely determined by the agar diffusion method when:

- The diameter of the inhibition zone is <17 mm around the disc of one of the two glycopeptide,
- The diameter of the zone of inhibition around a disc of teicoplanin is lower by at least 3 mm for that of vancomycin
- Some colonies are present in the Zone of inhibition of one of the two glycopeptide

11 strains (16.5%) were suspicious beings GISA only two were confirmed after determination of the MIC of vancomycin. The population analysis showed that these two strains were heterogeneous-VISA (Figure 1).



Figure1: Determination of vancomycin MIC by E-test

MRSA represents one of the most disturbing and the most consistent aspects in human infections. MRSA is, everywhere in the world, a major cause of nosocomial infections [18]with a recent community outreach [6,19,20].Treatment of these infections is becoming more difficult due to the emergence of multidrug-resistant strains [16,21]

The rate of MRSA isolated in our study was 44.6%; the prevalence was statistically higher than that of 32.7% obtained by Aouati et al [17] in university hospital Ben Badis Constantine and even higher than in another study at Charles Nicolle hospital in Tunisia (10%) [22]and that reported by Elazhari et al [5]in Casablanca (Morocco) (10%). In Africa the prevalence of MRSA is variable. It was 36% in Benin in 2006 before declining in 2008 with a rate of 14, 5%while in Algeria, the rate of MRSA is increasing with 4.5% in 2002 [23]33, 2% in 2004 [24], 45% in 2006 (25) and 52% in 2009 [26].

In France the rate of MRSA (32%) was observed by «le réseau des microbiolo-gistes Ile de France».The same observation is made by ColBVH «Collège de Bactériologie Virologie Hygiène des Hôpitaux» (30%), the network of Microbiology CCLIN Paris North during the investigation "multi-resistant bacteria" (33%) and ONERBA (35%) [27,28].

In the Algerian hospitals, Amazian et al [29] reported 18.6% a rate of compliance to hygiene rules lack of available devices for hand hygiene and insufficient knowledge of adequate hygiene practices, which could account for the important diffusion of MRSA

As a result, we can say that the eastern area of Algeria is at a level of some European countries such as: Greece (44%), Italy (38%), Spain (38%), Great Britain (44%) and Ireland (42%) [30].However, the rate of resistance

remains lower than that in countries with high prevalence of MRSA such as USA and Senegal which have respective rates of 70% and 72% [31,32].

Other European countries maintain a low prevalence of MRSA, such as Belgium (13%) and Germany (5%) [33], and even below the threshold for Holland, Denmark, Sweden and Finland [30]. This situation is explained by the importance of the commitment of hospitals in substantial programs of anti-MRSA [30,33]. These programs are developed and practiced for a long time; they concern the surveillance of nosocomial infections and their prevention, as better risk management of their occurrence and best control and use of antibiotics.

The rate of MRSA found in our study is influenced by the age of patients, where there is a prevalence of methicillin resistance among adults (77.6%), same results obtained by Garnier et al [34].

A predominance of MRSA in males was observed (71, 6%), this result agrees well with that (59%) found in a study in university hospital Mustapha Bacha in Algiers by Antri et al [35].

Our strains are essentially found in samples of pus (71.6%), however, other investigations have reported that a prevalence of MRSA in urine (61-64%) was much more important than that in blood cultures and pus [15].

The study of antibiotic susceptibility of 67 strains of MRSA determined that the rate of resistance to oxacillin, cefoxitin and penicillin G is of 100%, this rate is the same as that found by Rebiahi and al [26]. Several mechanisms of resistance of *Staphylococcus aureus* to antibiotics are known, but the resistance, the resistance by change in the molecular target of the β -lactam is the most common. The genetic cause is the production of a penicillin binding protein (PBP) additional, 2a PLP PLP or 2', characterized by a low affinity for the β -lactams, in contrast to the four PLP (1 to 4) that are naturally involved in the biosynthesis of peptidoglycan. The gene encoding the PLP 2a is the *mecA* gene, DNA additional fragment integrated in chromosome of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [3,16].

Other mechanisms of resistance much rarer have also been described, including:

- The hyperproduction of penicillinase: the strains called BORSA (borderline SA) do not have *mecA* gene. Inhibitors of penicillinases restore *in vitro* the activity of β -lactam antibiotics on these strains;
- Resistance by decreasing the synthesis and / or affinity of a PLP, the strains are referred to MODSA (Modified SA). A modification of the affinity of PLP1 and PLP2 raises the level of MIC, which are not changed in the presence of β -lactamase inhibitor;
- The resistance by production of methicillinase or oxacillinase which favored as substrate methicillin and oxacillin [3,36,37].

Other resistances were detected: rifampicin (32.8%), ofloxacin (68.6%), fusidic acid (65.6%).

According to Siegel et al [38], the multidrug-resistant bacteria are defined as micro-organisms resistant to one or more classes of antibiotics. The analysis of resistance profile confirms the multiresistant nature of MRSA to different families of antibiotics [39]. This multidrug resistance is due to the fact that MRSA strains are often resistant to aminoglycosides and macrolides. For aminoglycosides, the rate of MRSA resistant to gentamicin (KTG phenotype) found in our study was 22.3%. This resistance is higher, compared to the situation in Tunisia (18%) and France (10%) [15,28]. This rate is less important compared to results of a study in Abidjan (77.6%) (1). The resistance to kanamycin and tobramycin is respectively 100% and 59.7%. These rates are higher than those found in Tunisia, where the resistance is respectively 78% and 21% [15].

We note that the rate of resistance to erythromycin is (46.2%), comparable to that observed in a Tunisian study rate (49%) [15]. But it is still lower than that found in the USA (66%) [40]. Furthermore, it should be noted that the low level of resistance to lincomycin (9%) in our study, is significantly lower than that reported by a Tunisian study (21%) [15].

The results show that 95.5% of MRSA strains are sensitive to pristinamycin, a rate comparable with that of 97% found by Leclercq et al [41]. This frequency is also found in a study achieved by (ColBVH) «Collège de Bactériologie Virologie Hygiène des Hôpitaux» of France on strains of *S. aureus* isolated from blood cultures in 1999. This rate sensitivity has been reported in 1991 by the National Reference Center for Staphylococci (CNRS) [42], suggesting the absence of progression to resistance to this antibiotic. Pristinamycin remains therefore a good alternative for the treatment of MRSA infections.

The decreased susceptibility of *S. aureus* to glycopeptides is a topical problem. Various studies have reported the isolation of strains of *S. aureus* intermediate or resistant to these antibiotics [8,43]. The first description of a strain of MRSA with reduced susceptibility to vancomycin (VISA) was in Japan in 1997 [8]. These MRSA strains are susceptible to vancomycin (MIC 2-4 mg / L) but showed intermediate vancomycin subpopulations (MIC 6-8 mg / L). Subpopulations are present at low frequencies in the range of $10^5 - 10^7$, and can't be identified with standard susceptibility testing [44].

The glycopeptide resistance in *S. aureus* could be linked to a variety of molecular mechanisms.[45;46,47] These strains have a thickened wall resulting from complex reorganization of peptidoglycan metabolism probably linked to mutations in multiple genes. This reorganization could prevent access of vancomycin to its target [48]. Another hypothesis non-exclusive is the hyperproduction of peptidoglycan precursors acting as decoys for glycopeptides [43,44]. Isolation of strains of *S. aureus* resistant to vancomycin by horizontal transfer of *VanA* operon from *Enterococcus* was recently reported. This high-level resistance to vancomycin is now very limited [44,45]. Now the great majority of strains are hetero-GISA and the estimated prevalence in the United States is less than 2 %, however in Japan, Hiramatsu reported a frequency of 20% [49]. A recent study in the Netherlands showed a prevalence of 7.6% of hetero-GISA [44,50].

In our study 11 strains were suspected to be VISA according to their resistance or susceptibility intermediate to vancomycin and teicoplanin. The confirmation of this reduced susceptibility by E-test vancomycin described two strains. After analyzing the subpopulation, these two strains were heterogeneous VISA (hetero-VISA) where there is a MIC subpopulation between 6 -8 mg / l for the two strains. A similar result was described in a Tunisian study but with homogeneous GISA [15].

CONCLUSION

This study showed that MRSA is a real health problem in our country. The prevalence observed is about 44.6%. We have also the problem of multidrug resistance, where a significant number of our strains showed resistance for aminoglycosides, macrolides and other antibiotics. Regarding the glycopeptides, the study shows that two strains were hetero-VISA. Careful monitoring may be useful to minimize the dissemination of strains with reduced susceptibility to glycopeptides.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Algerian Ministry of High Education and scientific research.

REFERENCES

- [1] C Akoua-Koffi; N Guessenn; V Gbonon, H Faye-Ketté; M Dosso, *Med. Mal. Infect.*, **2004**, 34, 132–136.
- [2] M Hamze; F Dabboussi; W Daher; D Izard, *Pathol. Biol.*, **2003**, 51, 21-26.
- [3] M Nour; M Mastouri; M Ben Nejma, *Pathol. Biol.*, **2005**, 53, 334-340.
- [4] P Grohs . *Pathol Biol.*, **2009**, 57 , 1–8.
- [5] M Elazhari ; K Zerouali ; D Elhabchi ; N Cohen ; A Elmalki ; N Dersi ; M Hassar ; M Timinouni ; R Salie, *Rev. Tunis. Infect.*, **2010**, 4, 134-140.
- [6] MA Al- Rubaily and OM Khalil, *J. Med. Genet. Genomics.*, **2011**, 3, 41-45.
- [7] H Aubry-Damon, P Legrand, C Brun-Buisson, A Astier, CJ Soussy, R Leclercq, *Clin. Infect. Dis.*, **1997**, 25, 647–653.
- [8] K Hiramatsu; H Hanki; T Ino; K Yabuta; T Oguri; FC Tenover, *J. Antimicrob. Chemother.*, **1997**, 40, 135–136.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 9th edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, **2012** (CLSI publication M7-A9).
- [10] MU Rasheed; Z Ahmed, *Asian. Paci. J. Tropic. Med.*, **2010**, 741-744.
- [11] S Elhamzaoui; A Benouda; F Allali; R Abouqual; M Elouennass, *Med. Mal. Infect.*, **2009**, 39, 891-895.
- [12] KB Anand; P Agrawal; S Kumar; K Kapila, *Indian. J Med. Microbiol.*, **2009**, 27(1), 27-29.
- [13] DF Brown; DI Edwards; PM Hawkey; D Morisson; GL Ridgway; KJ Towner et al, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2005**, 56, 1000-1018.
- [14] D Nizami ; O Burcin; GD Gulay; O Yusuf; D Cemil, *Indian. J. Med. Res.*, **2012**, 135, 389-396.
- [15] M Mastouri; M Nour; M Ben Nejma; O Bouallague; M Hammami; M Khedher, *Pathol. Biol.*, **2006**, 54, 33-36.
- [16] F Hamdad; F Donda; G Laurans; B Canarelli; F Rousseau; M Biendo; D Thomas; F Eb, *Pathol. Biol.*, **2006**, 54, 447–452.
- [17] H Aouati, N Arafa, K Benlabed, A Boulahrouf, S Bousseboua, *Rev. Tunis. Infect.*, **2010**, 4, 129-133.
- [18] R Sadsad; V Sintchenko; GD McDonnell; GL Gilbert, *PLoS One.*, **2013**.

- [19] N Ben Saida, H Ben Abdallah, N Hannachi, J Boukadida, *Med. Mal. Infect.*, **2005**, 35, 363-366.
- [20] PL Mehndiratta; P Bhalla, *Indian. J. Med. Microbiol.*, **2012**, 30(1), 16-23.
- [21] M Ben Nejma, M Mastouri, S Frih, N Sakly, Y Ben Salem, M Nour, *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, **2006**, 55, 21-26.
- [22] M Saidani; I Boutiba; R Ghazzi; A Kammoun; S Ben Redjeb, *Med. Mal. Infect.*, **2006**, 36, 163-166.
- [23] C Kesah; S Ben Redjeb; TO Odugbemi; CS Boye; M Dosso; JO Ndinya Achola; S Koulla-Shiro; M Benbachir; K Rahal; M Borg, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2003**, 9(2), 153-156.
- [24] N Ramdani-Bouguessa; M Bes; H Meugnier; F Forey; ME Reverdy; G Lina; et al, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **2006**, 50, 1083-1085.
- [25] SN Bekkhoucha, A Cady, P Gautier, F Itim, PY Donnio, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.*, **2009**, 28, 553-555.
- [26] SA Rebiahi; DE Abdelouahid; M Rahmounb; S Abdelali; H Azzaoui, *Med. Mal. Infect.*, **2011**, 41(12), 646-651.
- [27] MT Albertini; C Benoit, L Berardi, Y Berrouane, A Boisivon, P Cahen, et al. *J Hosp Infect.*, **2002**, 52(2), 107-113.
- [28] X Bertrand, Y Costa, P Pina, *Med. Mal. Infect.*, **2005**, 35, 329-334.
- [29] K Amazian, T Abdelmoumene, S Sekkat, S Terzaki, M Njah, L Dhidah, et al, *J. Hosp Infect.*, **2006**, 62, 311-318.
- [30] Data from the National Observatory of Bacterial Resistance Epidemiology (ONERBA). Bacterial resistance to antibiotics, *Med. Mal. Infect.*, **2005**, 35, 155-169.
- [31] S Awad, S Elhabash, L Lee, et al, *Am. J. Surg.*, **2007**, 194, 606-610.
- [32] M Seydi; AI Sow; M Soumaré; Diallo et al, *Med. Mal. Infect.*, **2004**, 34, 210-215.
- [33] Coordination Centre against nosocomial infections interregion Paris-North, Central CLIN and inter CLIN Geriatric Assistance Public-Hospitals Paris. Command of the spread of multiresistant bacteria to antibiotics. Sheets recommendations. Paris. C-CLIN Paris North **1998**.
- [34] F Garnier; P Mariani- Kurkdjian; P Nordmann; A Ferroni; H Vu-Thien; JC Philippe; et al, *Med. Mal. Infect.*, **2002**, 32, 432-438.
- [35] K Antri, N Rouzic, I Boubekri, O Dauwalder, A Beloufa, H Ziane, F Djennane, M Neggazi, B Benhabyles, M Bes, M Tazir, J Etienne, N Ramdani-Bouguessa, *Pathol. Biol.*, **2010**, 58, 15-20.
- [36] T Guedet; C Lemblé, *Pathol. Biol.*, **2004**, 52, 617-621.
- [37] M.F Prère; O Baron; S Cohen Bacrie; O Fayet, *Pathol. Biol.*, **2006**, 54, 502-505.
- [38] J Siegel; E Rhinehart; M Jackson; L Chiarello, *Am. J. Infect. Control.*, **2007**, 35, 165-193.
- [39] R Leclercq, *Ann. Fr. Anesth. Réa.*, **2002**, 21, 375-783.
- [40] CM Pillar; DC Draghi; DJ Sheehan; DF Sahm, *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, **2008**, 60, 221-224.
- [41] R Leclercq, Soussy C.J Weber Ph, N Moniot-Ville, C Dib, the group of multicentric study, *Pathol. Biol.*, **2003**, 51, 400-404.
- [42] ME Reverdy; M Bes; Y Brun; J Fleurette, *Path. Biol.*, **1993**, 41, 897-904.
- [43] FW Goldstein; A Coutrot; A Sieffer; JF Acar, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **1990**, 34, 899-900.
- [44] C Daurela; R Leclercq, *Rev. Fr. Labo.*, **2008**, 407, 81.
- [45] M.L Joly-Guillou, *Réanimation.*, **2004**, 13, 185-189.
- [46] S Boyle-Vavra; H Labinschiski; CC Ebert; K Ehlert; R Daum, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **2001**, 45(1), 280-287.
- [47] Z Xia, H Qiwen, Y Wenchang, S Weilong, C Hang, Y Jizhen, Z Junmin, H Zhen, L Shu, C Wei, H Xiaomei, R Xiancai, *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, **2013**, 77, 64-68.
- [48] S Boyle-Vavra; SK Berke; JC Lee; R Daum, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **2000**, 44, 272-277.
- [49] SK Fridkin, *Clin. Infect. Dis.*, **2001**, 32, 108-115.
- [50] A Van Griethuysen; A Van't Veen; A Buiting; T Walsh; J Kluytmans, *J. Clin. Microb.*, **2003**, 41, 2487-2491.