

N° d'ordre : 20/2008 – M/SN

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie « Houari Boumediene »

USTHB

Faculté des Sciences Biologiques



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

EN : SCIENCES DE LA NATURE

Spécialité : Microbiologie de l'environnement

Par : ANTRI KENZA

Sujet :

Etude bactériologique et moléculaire des
Staphylococcus aureus
isolés des infections communautaires et nosocomiales et
prévalence du portage en milieu hospitalier

Soutenu le 28 Juin 2008, devant le jury composé de :

Mr – H. Hacène, Professeur, USTHB
Mme – N. Ramdani, Professeur, CHU/Mustapha
Mr – M. Tazir, Professeur, CHU Mustapha
Mme – A. Benslimani, Docent, CNMS
Mme – F. Natéche, Maître de conférence, USTHB

Président
Directeur de thèse
Examinateur
Examinatrice
Examinatrice

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Introduction

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1 Historique	1
2 Taxonomie	1
3 Ecologie	4
4 Bactériologie des <i>Staphylococcus aureus</i>	4
4-1 Caractères morphologiques.....	4
4-2 Caractères cultureux.....	5
4-3 Caractères biochimiques.....	6
4-4 Les « Small colony variants » (SCV).....	6
5 Facteurs de virulence	7
5-1 Les facteurs de virulences liés à la paroi.....	7
5-1-1 La protéine A.....	7
5-1-2 Les polysaccharides de surface	
5-2 Les enzymes.....	7
5-2-1 Coagulase libre.....	7
5-2-2 Coagulase liée ou clumping factor.....	8
5-2-3 Fibrinolysine.....	8
5-2-4 Hyaluronidase.....	8
5-2-5 Nucléase ou thermonucléase.....	8
5-2-6 Autres activités enzymatiques.....	9
5-3 Les toxines.....	9
5-3-1 L'hémolysine α	9
5-3-2 L'hémolysine β	9
5-3-3 L'hémolysine δ	10
5-3-4 L'hémolysine γ	10
5-3-5 Leucocidine de Panton et Valentine.....	10
5-3-6 Exfoliatine.....	11
5-3-7 Les toxines pyrogènes.....	12
5-3-8 Les entérotoxines.....	12
5-3-9 La toxine du syndrome de choc toxique (TSST)	12
5-4 Immunopathologie des toxines staphylococciques.....	13
5-5 Régulation des facteurs de virulences.....	13
6-Physiopathologie	14

6- 1 Facteurs favorisant les infections à <i>S.aureus</i>	14
6-2 Pouvoirs pathogènes.....	15
6-2-1 Les infections suppuratives.....	15
6-2-2 Les infections d’origines toxiques.....	16
6-2-2-1 Le « SSSS » (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome).....	17
6-2-2-2 L’impétigo bulleux.....	17
6-2-2-3 Choc toxique staphylococcique (TSS).....	18
6-2-2-4 Intoxications alimentaires.....	19
6-2-2-5 Entérocolites aiguës.....	19
6-2-3 Pathologie associée à la leucocidine de Panton Valentine (PVL).....	20
6-2-3-1 Le furoncle.....	20
6-2-3-2 La pneumonie nécrosant.....	21
6-2-3-3 Les infections ostéoarticulaires.....	22
7 La résistance à la méticilline	24
7-1 Bases moléculaires de la résistance à la méticilline.....	24
7-1-1 Modes d’action des β -lactamines	24
7-1-2 Mécanisme de résistance.....	24
7-1-2-1 La modification de la cible des antibiotiques	25
7-1-2-2 La production de β -lactamas.....	25
7-1-3 Le gène <i>mec A</i> , déterminant génétique de la PLP 2a et sa régulation.....	25
7-1-4 Gènes accessoires affectant l’expression de la résistance à la méticilline...26	
7-1-5 La résistance hétérogène et homogène des SARM.....	27
7-1-6 Emergence des SARM.....	27
7-1-6-1 Le complexe <i>mec</i>	28
7-1-6-2 Le complexe <i>ccr</i>	28
7-1-7 Polymorphisme génétique du SCC <i>mec</i>	29
8 Traitements des infections à <i>S.aureus</i>	30
9 Epidémiologie des infections à SARM	31
9-1 Définition des infections communautaires et nosocomiales.....	33
9-2 Emergence et mode de transmission des SARM hospitaliers (SARM-H)	33
9-3 Emergence et mode de transmission des SARM communautaires	34
9-4 Les différentes caractéristique qui opposent les SARM-C des SARM-H.....	34
9-5 Diffusion clonale des SARM dans le monde.....	36
9-5-1 Les outils de description des grands clones de SARM.....	37
9-5-2 Les principaux clones mondiaux de SARM	38
9-5-3 Les clones de SARM en Algérie.....	39
10 Le portage nasal et son épidémiologie	40
10-1 Prévalence des différents portages dans le monde.....	42

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1 Matériels	43
1-1 Matériels de laboratoires.....	43
1-2 Matériels biologiques.....	43
1-2-1 Les souches de références utilisées.....	43
1-2-2 Les souches isolées.....	43
1-3 Les milieux de cultures utilisés.....	44
2 Méthodes	44
2-1 Identification de l'origine communautaire ou nosocomiale des souches.....	44
2-2 Identification bactériologique.....	45
2-2-1 Isolement et identification des <i>S.aureus</i>	45
2-2-1-1 La culture.....	45
2-2-1-1-2 La recherches de la coagulase libre.....	45
2-2-1-3 Le test rapide d'identification de <i>S .aureus</i>	46
2-2-1-4 La galerie API.....	47
2-3 Etude de la résistance aux antibiotiques.....	48
2-3-1 L'antibiogramme selon.....	48
2-3-2 La recherche de la résistance des Staphylocoques à l'oxacilline.....	50
2-3-2-1 Le disque d'oxacilline.....	50
2-3-2-2 Le disque de ceftioxime.....	50
2-3-2-3 Le test de screening à l'oxacilline.....	51
2-3-2-4 La mise en évidence de la PLP2a.....	51
2-4 Conservation des souches identifiées.....	52
2-5 Identification moléculaire (toxintypie, gènes régulateurs, gène <i>mec A</i>).....	53
2-5-1 La préparation des souches.....	54
2-5-2 L'extraction de L'ADN.....	54
2-5-2-1 Lyse des souches.....	54
2-5-2-2 L'extraction.....	55
2-5-2-3 Dilution des ADN pour la PCR.....	56
2-5-3 L'amplification.....	57
2-5-3-1 Préparation des mélanges réactionnels.....	57
2-5-3-2 Amplification de l'ADN.....	57
2-5-4 Révélation des fragments amplifiés.....	58
2-5-4-1 Préparation du gel.....	58
2-5-4-2 Dépôt des amplifiats et migration.....	58
2-5-5 Révélation des amplifiats.....	59
2-6 L'étude de portage nasal.....	69
2-6-1 Méthodes de prélèvements.....	69
Chapitre III Résultat et discussion	
1Analyse des souches isolées à partir d'infection à <i>S.aureus</i>	71
1.1 Infections à <i>S .aureus</i> en fonction des services.....	71

1.2 Infection à <i>S. aureus</i> en fonction du sexe et de l'âge.....	73
1.3 Les infections à <i>S. aureus</i> en fonction des pathologies.....	74
1.3.1 Fréquences des pathologies par rapport au sexe.....	77
2 Analyse de la résistance.....	77
2.1 Fréquence des <i>S. aureus</i> résistant à la méticilline (SARM).....	78
2.2 Fréquence des SARM par rapport aux services.....	78
2.3 Fréquence de la résistance aux antibiotiques.....	79
2.4 Les profils de résistance les plus fréquents.....	80
2.4.1 Profils de résistance les plus fréquents des SARM et leur répartition dans les milieux hospitaliers et communautaires.....	80
2.4.2 Profils de résistance les plus fréquentes des SASM et leur répartition dans les milieux hospitaliers et communautaires.....	81
2.5 Evaluation des tests de sensibilité à l'oxacilline.....	82
3 Analyse moléculaire.....	83
3.1 Prévalence du gène <i>mecA</i>	83
3.2 Prévalence des souches productrices de la PVL (PVL+).....	83
3.3 La fréquence de la toxine PVL en milieux communautaire et nosocomiale.....	84
3.4 Prévalence de la toxine PVL en fonction des pathologies.....	85
3.5 Répartition de entérotoxines en fonction des pathologies.....	86
3.6 Répartition des autre toxines en fonction des pathologies.....	87
3.7 Les profils moléculaire retrouvées.....	89
3.7.1 Les profils moléculaire des souches productrice de PVL.....	89
3.7.2 Les profils moléculaire des souches non productrice de PVL.....	90
3.7.3 Profil de résistance de souches PVL+ <i>agr3 mecA+</i> et leur répartition.....	92
4 L'étude de portage nasal.....	94
4.1 Fréquence des porteurs de <i>S. aureus</i>	94
4.2 Fréquence des <i>S. aureus</i> et des SARM parmi les porteurs.....	96
4.3 Fréquence des <i>S. aureus</i> et des SARM dans chaque population porteuses.....	96
4.4 Portage de <i>S. aureus</i> en fonction du sexe et des tranches d'âge.....	97
4.5 Résistance globale des souches de <i>S. aureus</i> isolées.....	97
4.6 Profils de résistance des souches de <i>S. aureus</i> et leur répartition dans les différentes population de portage.....	98
4.7 Les mesures préventives.....	
Conclusion	102
Bibliographie	
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute
CTS : Choc toxique staphylococcique
LVP (PVL) :leucocidine de Panton Valentine
MLST : *Multilocus sequence typing*
MRSA: *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*
MSSA : *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*
NTED : *Neonatal toxic shock like-exanthematous diseases*
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PFGE: *Pulsed field gel electrophoresis*
PVL+ : Souche productrice de PVL
PVL- : Souche non productrice de PVL
S.aureus: *Staphylococcus aureus*
SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SARM-C: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline communautaires
SARM-H :*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline hospitaliers
SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
SCCmec :*Staphylococcus cassette chromosome mec*
SSSS :*Staphylococcus Scalded Skin Syndrome*
ST: Sequence type
TSS-1:Toxic shock syndrome toxin-1

Gènes de *S.aureus* :

agr : accessory gene regulator
ccr : gène des recombinaisons
mecA : gène de la résistance à la méticilline

Gènes des toxines staphylococciques :

edin : inhibiteur de la différenciation des cellules de l'épiderme
eta,etb et etd : exfoliatines A,B et D
hly : hémolysine bêta
lukM : leucocidine lukM
lukSPV-lukFPV : locus de la leucocidine de Panton Valentine
sea-e,seh,sek,sel,sem,seo et sep : entérotoxines A-E,H,K,L,M,O et P
tst : toxine du choc toxique staphylococcique

Introduction

Introduction

Staphylococcus aureus est à la fois un commensal et un pathogène de l'homme, responsable d'une grande variété d'infections superficielles, profondes, systémiques, ainsi que d'infections toxiques.

Aujourd'hui, *Staphylococcus aureus* est classé parmi les germes pathogènes les plus fréquemment responsables d'infections nosocomiales. La place des antibiotiques pour traiter ces infections est exemplaire historiquement, car c'est précisément chez cette espèce bactérienne que les premiers cas de résistance aux anti-infectieux ont été rapportés. Actuellement, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline ou SARM aggravent le pronostic et compliquent de manière sérieuse la prise en charge des infections staphylococciques, ce qui, de ce fait, représente un problème de santé publique majeur car les conséquences d'une infection à SARM sont multiples :

- Nécessité d'utiliser des antibiotiques plus coûteux
- Nécessité d'utiliser des antibiotiques de maniement plus difficile comme les glycopeptides.
- Prolongation de la durée d'hospitalisation avec le risque supplémentaire d'acquérir d'autres infections nosocomiales pendant cette période
- Risque éventuel de voir se développer des souches, staphylocoques en particulier, résistantes aux glycopeptides (Vandenesch 1996).

De plus, il a été montré que ces SARM peuvent être de plus en plus fréquemment d'origine communautaire touchant principalement l'enfant et l'adulte jeune sans facteur de risque (absence de pathologie chroniques, absence d'hospitalisation ou de contact avec le personnel soignant). Ces infections d'origine communautaire sont généralement associées à une toxine dermonécrotique la leucocidine de Pantone Valentine (LPV ou PVL) impliquée dans les

infections cutanées et des tissus mous qui se compliquent parfois en infections profondes telle que la pneumonie nécrosante, qui à un taux de mortalité de 75%.

Par ailleurs, le portage est l'un des principaux facteurs de transmission des infections à *S.aureus*, ce qui lui confère un rôle important dans la survenue de ces infections en communauté et en milieu hospitalier. Le prélèvement recommandé pour le dépistage des SARM est le prélèvement nasal car les fosses nasales antérieures sont un des sites de portage préférentiels de cette bactérie. De plus, la fréquence du portage cutané dépend du portage nasal. De ce fait plusieurs études de portage ont été menées, et ont permis d'objectiver des taux de portage variables dans différentes situations incluant le portage en communauté qui constitue un réservoir important de ces souches, ainsi que le dépistage en milieu hospitalier et ce, dès l'admission à l'hôpital, que ce soit dans des unités de soins intensifs ou dans des services de moyens séjours car il apparaît qu'une stratégie efficace repose sur l'identification de la totalité du réservoir des SARM. Cela implique notamment le dépistage du personnel soignant.

L'Algérie, comme tous les pays du monde doit faire face à ce problème de santé public majeur, surtout depuis que la présence de clone communautaire de *S. aureus* résistant à la méticilline et porteur du gène de la PVL a été montrée de façon endémique en milieu hospitalier dans l'étude de Ramdani en 2006 (Ramdani et al. 2006).

Notre étude s'est focalisée sur les thématiques suivantes :

- Déterminer la fréquence des infections communautaires et nosocomiales à *S.aureus*
- Comparer sur le plan moléculaire les souches communautaires et les souches nosocomiales.
- Déterminer le portage de *S.aureus* et de SARM en milieu hospitalier, dans un service de haute fréquence chez les patients à l'admission et parmi le personnel soignant.

Cette étude a durée 15 mois et a été menée au service de microbiologie du CHU Mustapha Bacha dont Chef de service est le Professeur M. Tazir.

Chapitre I

Revue bibliographique

1. Historique

Ce fut Pasteur, qui en 1879 a observé pour la première fois dans des pus de furoncle d'ostéomyélite « cet organisme unique, formé de petits points sphériques, réunis par couple, rarement par quatre, mais fréquemment associés en petits amas » (Batch et Berche 1988)

Il venait de décrire ce qu' Ogston a appelé plus tard, en 1883, les Staphylocoques pour décrire ces grains (*kokkos*) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisins (*staphylos*).

En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries. Il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées (Avril 2000).

2. Taxonomie

La classification et la nomenclature des Staphylocoques et microcoques ont suscité beaucoup de controverse, leur distinction, à la fin du 19^{ème} siècle était basée sur des critères morphologiques ou biochimiques simples, tels que la pigmentation des colonies ou l'utilisation oxydative et/ou fermentative du glucose.

En 1975, Schleifer et Kloos distinguent les deux genres par la production d'acide à partir du glycérol et les tests de sensibilité à la lysostaphine et au lysozyme, ainsi que par la composition en bases de l'ADN, exprimée par le contenu en guanine et cytosine (GC%). Les staphylocoques ont un GC % de 30 à 39 % et les microcoques un GC % de 68 à 74 %

Les techniques génomiques appliquées depuis 1976 (hybridation ADN/ADN ou ADN/ARN ribosomal puis séquençage de l'ARN ribosomal 16 S) ont permis de situer les espèces et les genres décrites dans un contexte d'évolution phylogénétique. Le genre *Staphylococcus* est proche des genres *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Planococcus* et *Brochothrix* et appartient au groupe *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*, alors que le genre *Micrococcus* est lié au genre *Arthrobacter* du groupe des bactéries corynéformes.

En 1997, Stackebrandt et coll. proposent une modification de la famille des *Micrococcaceae*, constituée jusqu'alors des genres *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus* et

Staphylococcus. Selon l'analyse des séquences d'ADNr/ARNr 16S, cette famille est constituée des genres *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Nesterenkonia*, *Renibacterium*, et *Rothia*.

Les bactéries Gram positif à faible GC % comme les staphylocoques et les bactéries du genre *Planococcus* n'appartiendraient plus à la famille des *Micrococcaceae*.

En 2000, Le genre *Staphylococcus* appartient au Phylum des *Firmicutes*, Classe des *Bacilli*, Ordre des *Bacillales* et Famille des *Staphylococcaceae*.

En 2002, ce genre regroupe 46 espèces et sous espèces (tableau 1) définies selon les critères reconnus par l'ensemble des taxonomistes - pourcentages de réassociation ADN/ADN, stabilité des hybrides et caractères phénotypiques distinctifs.

Les espèces les plus fréquemment isolées chez l'homme (infection ou colonisation) sont *S. aureus* qui constitue l'espèce type du genre et qui est la plus impliquée en pathologie humaine, viennent ensuite, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, et *S. warneri*. Certaines espèces et sous-espèces décrites ces vingt dernières années, sont émergentes telles que : *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* et *S. caprae*.

D'autres espèces sont plus rarement isolées ou d'identification plus difficile telles que *S. auricularis*, *S. capitis* (Bes et Brun 2002).

Tableau 1 : Espèces et sous-espèces du genre *Staphylococcus* d'après Bes et Brun

(Bes et Brun 2002)

Espèces et sous espèces isolées en clinique humaine	Espèces et sous espèces isolées principalement chez l'animal, les produits dérivés, et dans l'environnement
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>
<i>S. auricularis</i>	<i>S. arlettae</i>
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	<i>S. caprae</i>
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	<i>S. condimenti</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. delphini</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	<i>S. felis</i>
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	<i>S. fleurettii</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>S. gallinarum</i>
<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. hyicus</i>
<i>S. pasteurii</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. kloosii</i>
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	<i>S. lentus</i>
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	<i>S. lutrae</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. muscae</i>
<i>S. warneri</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>
<i>S. xylosum</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>
	<i>S. piscifermentans</i>
	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>
	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>
	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>
	<i>S. vitulinus</i>
	<i>S. succinus</i>

3. Ecologie

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries sont fréquemment retrouvées dans la nature. (Sol, eaux, airs....), elles survivent et prolifèrent du fait de leur particulière résistance aux conditions hostiles de l'environnement, telles que la chaleur (ils résistent une heure à 60 °C), la sécheresse (ils survivent plusieurs mois dans les produits pathologiques desséchés) ou la salinité de l'eau. Ces caractères ubiquitaire et saprophyte expliquent que ces germes soient aussi des commensaux occasionnels ou permanents de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (Batch et Berche 1988).

4. Bactériologie des *Staphylococcus aureus*

4-1 Caractères morphologiques

Dans le pus, *S.aureus* se présente sous l'aspect de coques en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes (3 à 5 éléments), mesurant de 0,8 à 1 µm, Gram positif.

Sur les cultures en milieu solide, il se dispose en « grappe de raisin », alors qu'en milieu liquide, il est souvent isolé, en diplocoque.

Il est immobile non sporulé et ne possède pas de capsule visible au microscope optique sauf pour de très rares souches ; d'autres souches formant des colonies mucoides, sont entourées d'une pseudocapsule (Fleurette 1989).

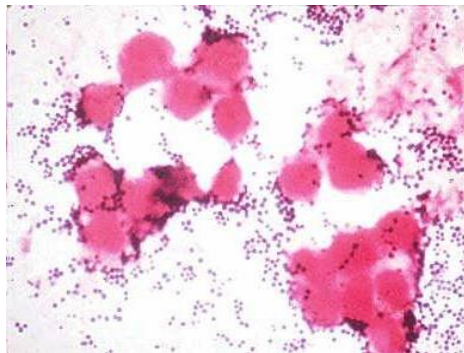


Figure1 : Aspect microscopique de *S.aureus* (Coloration de Gram ; G x 100)

4-2 Caractères cultureux

S.aureus est aérobie, anaérobie facultatif et croît facilement sur milieu ordinaire ; certains facteurs de croissance sont indispensables (vitamine B₁, acide nicotinique) ; il n'exige pas de biotine ni de tryptophane.

Il croît en milieu synthétique contenant des sels, du glucose et 14 acides aminés dont la cystéine et la thiamine.

La température de croissance optimale est de 37 °C (de +10 à 45 °C), son pH optimal est de 7,5 mais de grandes variations sont tolérées.

A plus 4°C, le Staphylocoque conserve sa vitalité pendant 3 mois dans le pus et pendant 1 an sur gélose.

En bouillon ordinaire, la culture est rapide : en quelques heures, un trouble homogène puis un dépôt sont observés ; il n'y a pas de production de pigments en milieu liquide. Sur gélose ordinaire, les colonies sont lisses, rondes, bombées et leur diamètre est de 1 mm ; la plupart des souches produisent un pigment doré ou citrin non diffusible dans le milieu mais certaines donnent des colonies blanches, ce caractère pigmentaire n'est donc pas propre à l'espèce.

Sur milieu sélectif, tel que milieu Chapman (milieu hyper salé 75g NaCl + mannitol + rouge de phénol) les colonies apparaîtront jaunes entourés d'un halo jaune clair (dû à la dégradation du mannitol), alors que sur milieu Braid- Parker (milieu riche, au tellurite-litium , glycine, pyruvate et jaune d'œuf) utilisé en bactériologie alimentaire, les colonies apparaîtront noires entourées d'une zone d'éclaircissement, cette couleur est due à la dégradation de la lécithine par la lécithinase et la réduction du tellurite en tellure noir alors que la zone d'éclaircissement correspond à une protéolyse qui s'opacifiera par une lipase quelques heures plus tard .

D'autres milieux sélectifs contenant des antibiotiques ont été décrits (poly- myxines, acide nalidixique). Cependant les milieux sélectifs ne conviennent pas pour isoler les staphylocoques de l'air (Fleurette 1989).

4-3 Caractères biochimiques

S.aureus possède une catalase mais pas une oxydase. Il est actif sur les hydrates de carbones : le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobie ainsi que le mannitol. De nombreux autres sucres sont utilisés.

D'autres caractères peuvent être recherchés : indole -, acétoïne +, uréase +, réduction de tellurite de potassium, des nitrates en nitrites et production d'ammoniaque à partir d'arginine (Fleurette 1989).

4-4 Les « Small colony variants » (SCV)

Ce sont des microcolonies de *S.aureus* à activité métabolique réduite et à croissance lente, elles ont été décrites il y a plus de 90 ans, et elles présentent plusieurs propriétés :

- In vitro, on observe des colonies non pigmentées, 10 fois plus petites que les colonies de *S.aureus*, elles sont non hémolytiques, lentement coagulase positives, avec une faible production de protéines et toxines.
- Elles sont déficientes en électrons de transport, avec diminution de leur activité métabolique, et notamment une diminution de la biosynthèse d'hème et de ménadione (qui est une quinone, facteurs de croissance de la bactérie).
- Elles ont une génétique complexe, où de multiples régulateurs sont impliqués tels que les gènes régulateurs de la production de toxines et d'enzymes.
- Elles ont une certaine capacité à se dissimuler et à persister, dans les cellules endothéliales de l'hôte
- Elles sont responsables d'infections cliniques persistantes, récurrentes, mais aussi résistantes à plusieurs traitements (Bergogne-Bérézin 2000)

5- Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*

S.aureus possède des facteurs de virulence liés à la paroi bactérienne et produit des exoprotéines telles que les toxines et différents enzymes (Avril 2000).

5-1 Les facteurs de virulences liés à la paroi

5-1-1 La protéine A

C'est un composant de la paroi bactérienne, elle est antigénique, et a un poids moléculaire de 42 kDa. Elle fixe le fragment Fc des immunoglobulines humaines, interférant ainsi avec la phagocytose et l'opsonisation. (Avril 2000)

5-1-2 Les polysaccharides de surface

Ces antigènes de surface ont été décrits chez des souches capsulées, mais elles sont aussi décelables en moindre quantité sur bon nombre de souches dites non capsulées. Certains de ces polysides empêchent l'activation de la voie du complément et protègent ainsi la bactérie de la phagocytose et de l'action bactéricides du sérum. Une classification de ces polysaccharides en 8 types capsulaires a été proposée et deux types 5 et 8, recouvrent 70-80% des souches responsables de septicémies (Avril 2000).

5-2 Les enzymes

5-2-1 Coagulase libre

S.aureus excrète une enzyme qui est capable de coaguler en quelques heures le plasma humain ou de lapin et appelée « coagulase libre ». Un staphylocoque produisant cette toxine sera identifié comme *S.aureus*. Mais 2 espèces en pratique vétérinaires peuvent produire cette enzyme *S. intermedius* et *S. hyicus*.

La formation du coagulum nécessite la présence d'une globuline voisine de la prothrombine (coagulase-reacting-factor).

Elle est antigénique (7 groupes antigéniques) et entraîne l'apparition d'anticorps inhibant son activité biologique.

Cette enzyme joue un rôle important dans le pouvoir pathogène, en coagulant le plasma autour des coques et en les protégeant ainsi de la phagocytose (Avril 2000).

5-2-2 Coagulase liée ou clumping factor

A côté de cette coagulase « libre », on reconnaît une coagulase insoluble, « liée » à la surface des germes et également appelée clumping factor. Elle diffuse dans le milieu extérieur après autolyse, et réagit directement avec le fibrinogène. Son rôle consiste à favoriser la fixation des bactéries sur les caillots ou sur les tissus recouverts de fibrinogène (Avril 2000).

5-2-3 Fibrinolysine

Cette enzyme est une activatrice du plasminogène en plasmine qui exerce un effet inverse à celui de la coagulase en contribuant à la dissolution du caillot et pourrait jouer un rôle dans la formation d'embols septiques. Elle agit sur le plasma humain et de lapin, elle est thermolabile et antigénique (Avril 2000).

5-2-4 Hyaluronidase

Cette enzyme thermolabile hydrolyse l'acide hyaluronique et fluidifie la substance fondamentale du tissu conjonctif (Avril 2000)

5-2-5 Nucléase ou thermonucléase

La nucléase (DNase) de *S. aureus* est thermostable contrairement à celle des autres espèces bactériennes. L'activité enzymatique est mise en évidence sur milieu à base d'ADN avec du bleu de toluidine (halo rose) (Avril 2000).

5-2-6 Autres activités enzymatiques

Des activités lipasique, estérasique, protéasique peuvent être mise en évidence, de même qu'une activité phosphatasique : ainsi il existe 2 phosphatases , acide et alcaline (Avril 2000).

5-3 Les toxines

5-3-1 L'hémolysine α

C'est une toxine de 33 kDa, thermostable, elle est synthétisée par 80 à 90 % des souches. Elle provoque une contraction du muscle lisse, une libération d'histamine et des troubles circulatoires ; elle induit la sécrétion de prostaglandine et de leucotriène.

L'activité de la toxine purifiée est portée par la forme 3 S non polymérisée et se localiserait au niveau de la région hydrophobe de la membrane cellulaire de l'érythrocyte. A ce niveau, se produirait la polymérisation en toxine 12 S, visible sous forme de structure en anneau, entraînant la formation de canaux intra membranaires créant des troubles osmotiques et une hémolyse (Fleurette 1989).

5-3-2 L'hémolysine β

Elle est codée par le gène *hly*, et est plus souvent fabriquée par les souches animales (94 %) que par les souches humaines (54 %) (Fleurette 1989)

Il s'agit en fait d'une phospholipase de type C, thermolabile, et active sur la sphingomyéline, de masse moléculaire de 26-38 kDa.

L'hémolysine β donne une hémolyse accrue en présence de souches de *Streptococcus agalactiae* : c'est le Camp-test (Avril 2000).

Son activité hémolytique est remarquable par les conditions d'apparition car elle est du type « chaud-froid » : les érythrocytes soumis à son action à 37 °C ne sont pas lysés sauf si on les refroidis à 4°C (Fleurette 1989).

5-3-3 L'hémolysine δ

C'est une protéine de masse moléculaire de 103 kDa, codée par le gène *hlg*, elle est hydrophobe et faiblement antigénique. Son activité biologique n'est pas de nature enzymatique et elle agit comme un détergent sur les membranes cytoplasmiques, sans spécificité mais avec une certaine rapidité elle est active sur les érythrocytes, les macrophages et les granulocytes (Fleurette 1989).

5-3-4 L'hémolysine γ

Elle est produite par 50 à 60 % des souches, et est formée de deux constituant : I (29 kDa) et II (26 kDa). Elle est antigénique et hémolyse les érythrocytes (Fleurette 1989).

5-3-5 La Leucocidine de Panton et Valentine

La leucocidine de Panton-Valentine ou Panton-Valentine Leucocidine (PVL) est sécrétée par seulement 2 % des souches de *Staphylococcus aureus*, elle est codée par les gènes *lukS-PV* et *lukF-PV*, permettant l'assemblage d'une toxine dite « synergohyménotrope » c'est-à-dire composée de deux protéines indépendantes : une protéine de classe S (38kDa) et une protéine de classe F (32kDa) agissant en synergie sur les membranes cellulaires.

A forte concentration (>200nmol/ml), elle possède de puissantes propriétés nécrosantes alors qu'à faible concentration, elle provoque une leucopénie par apoptose des polynucléaires et des macrophages en formant des pores transmembranaires. (Fleurette 1989 ; Gillet 2007).

Alors que la PVL a été décrite en 1932 l'intérêt pour cette toxine a été relancé récemment d'une part suite à la description d'infections très sévères dues à des souches sécrétant la PVL

(pneumonies nécrosantes, infections nécrosantes sévères de la peau et des tissus mous, infections ostéoarticulaires graves...) et d'autre part, suite à l'émergence de clones communautaires de *S. aureus* possédant le gène *mecA* de résistance à la méticilline mais également le gène de la PVL (Gillet 2007).

De plus, les gènes de la PVL sont portés par des phages tels que le Φ sa2mv ou Φ LST. Les souches de *S. aureus* productrices de la PVL sont lysogènes pour ces phages. Ces derniers peuvent déclencher leur cycle et traduisent des souches de *S. aureus* PVL négatives n'appartenant pas à la même lignée génétique (Narita et al. 2001).

5-3-6 Les exfoliatines

Il existe actuellement trois types différents d'exfoliatine dénommée ETA (exfoliatine toxin A), ETB et ETD, chacune étant codée respectivement par les gènes *eta*, *etb*, *etd*.

L'ETA est une protéine de masse comprise entre 26 et 30kDa ; elle est thermostable et est d'origine chromosomique. L'ETB est quant à elle, d'origine plasmidique et est thermolabile (Fleurette 1989), alors que l'ETD de description plus récente est chromosomique (Takayuki 2002).

Malgré une homologie de séquence supérieure à 50 %, entre ETA et ETB les deux exfoliatines possèdent une réactivité antigénique distincte et il n'y a donc pas d'immunité croisée (Gillet et al 2003).

Ces exfoliatines (ETA, B ou D) entraînent un clivage intraépidermique c'est-à-dire une desquamation du ciment intracellulaire, une rupture du désmosome et un élargissement des espaces intracellulaires.

Cliniquement, elles sont responsables des différentes formes de staphylococcies cutanées bulleuses, la plus typique étant le « syndrome de la peau ébouillantée » (Fleurette 1989 ; Takayuki 2002).

5-3-7 Les toxines pyrogènes

Il existe deux toxines pyrogènes, mitogènes, aspécifiques et antigéniques d'un poids moléculaire de 12 kDa réparties en deux sérotypes A et B. Ces toxines sont impliquées dans les fièvres scarlatiniiformes staphylococciques (Avril 2000).

5-3-8 Les entérotoxines

Huit entérotoxines (Staphylococcal enterotoxin = SE) majeures ont été identifiées, ce sont les entérotoxines (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEH, SEG, SEI), elles sont codées respectivement par les gènes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *seg*, *sei*. Leurs poids moléculaires varient entre 27,8 et 34,1 kDa.

Ces toxines sont responsables d'intoxication alimentaires (gastroentérite), elles sont superantigéniques et résistent à la chaleur (certaines sont plus thermostables que d'autres notamment le sérotype B) et aux enzymes protéolytiques telle que la pepsine digestive.

Les sérotypes A, B et C sont les plus fréquents dans les intoxications alimentaires.

La dose minimale d'infection se situe aux environs de 1 µg pour 100 g d'aliments (Avril 2000 ; Dinges 2000).

5-3-9 La toxine du syndrome de choc toxique (TSST)

C'est une toxine de 2kDa (Fleurette 1989), elle est superantigénique et est codée par le gène chromosomique : *tst*, facteurs de virulence majeur dans le syndrome du choc toxique (Durand et al. 2006).

Le syndrome du choc toxique staphylococcique est surtout connu chez l'adulte depuis la démonstration de son association à l'utilisation de tampons vaginaux, mais peut être observé à tout âge, compliquant n'importe quel type d'infection staphylococcique (Tristan 2004 et al.). Au cours de ce syndrome, on observe un rash érythémateux avec ou sans desquamation, suivent une hypotension artérielle, un état de choc ainsi que des atteintes viscérales.

5-4 Immunopathologie des toxines staphylococciques

La grande particularité de ces toxines est d'être superantigénique. Elles sont captées par les cellules présentatrices d'antigènes selon des modalités très différentes des antigènes bactériens classiques, l'interaction se faisant avec les antigènes HLA de classe II. Elles sont ensuite présentées aux lymphocytes T et se fixent sur les portions constantes du feuillet V β du récepteur T quelle que soit la spécificité antigénique. L'interaction avec le feuillet V β entraîne une activation des lymphocytes T non pas sélective, mais massive, polyclonale responsable d'une libération brutale de cytokines qui explique les signes de choc (Jarraud 2002).

Les toxines staphylococciques ayant une activité superantigénique sont la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), les entérotoxines A à E, G, et I à U (Marrack and Kappler 1990), ainsi que les exfoliatines (Gillet et al. 2003)

5-5 Régulation des facteurs de virulence

S.aureus possède des facteurs de virulence liés à la paroi bactérienne (protéine A, coagulase, facteurs d'affinité pour le fibrinogène) et produit des exoprotéines (toxines cytotoxiques, superantigènes, enzymes). Certains de ces facteurs de virulence sont exprimés très précocement pendant la phase de croissance bactérienne ; il en est ainsi des protéines liées à la paroi. En revanche les exoprotéines telle que les toxines et enzymes sécrétées sont synthétisées en phase post exponentielle de croissance bactérienne ; elles ont pour effet d'entraîner l'extension du foyer infectieux en favorisant l'extension locale et générale de l'infection. Cette expression diphasique des exoprotéines de *S.aureus* est sous la dépendance d'un locus régulateur désigné *agr* (accessory gene regulator) (Duffour 2000).

Un polymorphisme du système *agr* impliquant quatre allèles (de 1 à 4) a été décrit chez *S.aureus*, ce polymorphisme serait en relation avec la grande diversité des infections (Jarraud et al. 2002).

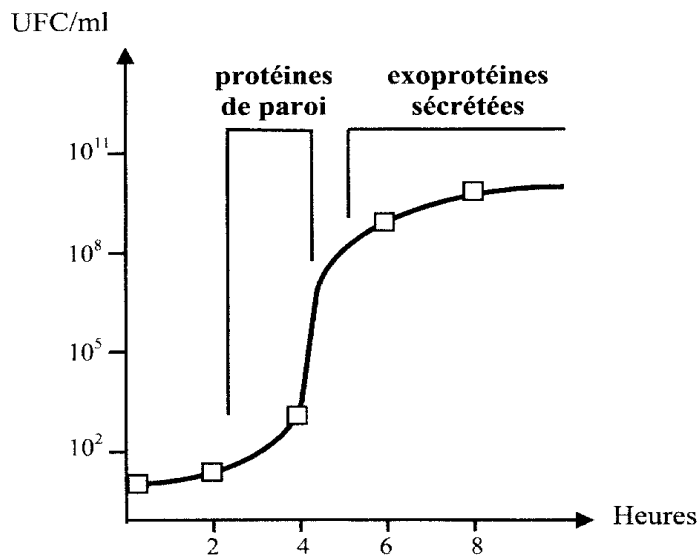


Figure 2 : Courbe de croissance in vitro d'une souche de *staphylococcus aureus* montrant l'expression biphasique des facteurs de virulence. Les protéines de parois sont exprimées en phase exponentielle de croissance. Les exoprotéines sécrétées sont exprimées en phase postexponentielle de croissance (Dufour 2000).

6-Physiopathologie

6-1 Facteurs favorisant les infections à *S.aureus*

La prolifération de *S.aureus* sur la peau ou les muqueuses, et l'envahissement tissulaire qui en résulte, est favorisée par des facteurs locaux ou généraux.

Toute lésion même minime du revêtement cutané-muqueux peut permettre la colonisation des tissus par les staphylocoques dorés de la flore commensale. Ainsi en est il des excoriations, traumatismes, blessures, brûlures, piqûres et incisions chirurgicales.

La présence d'un corps étranger (sonde, cathéter ...) entraîne la pullulation d'un nombre très faible de germes à son contact.

De même, une antibiothérapie à large spectre sélectionne dans la flore commensale des staphylocoques multirésistants et le déséquilibre qui en résulte peut être à l'origine d'une prolifération de ces germes.

Le terrain joue également un rôle important dans la survenue des infections à staphylocoques. Ces infections sont particulièrement importantes et graves chez les sujets aux défenses amoindries, qu'il s'agisse d'une immunodépression acquise (infections virales telles que rougeole ou grippe, drogues anticancéreuses ...), ou encore chez des malades atteints de certaines affections chroniques (diabète, mucoviscidose, cancer, leucémie, alcoolisme, insuffisance rénale chronique....) (Batch et Bersche 1988).

6-2 Pouvoir pathogène

Staphylococcus aureus n'est ni un pathogène strict, ni un opportuniste pur, sa pathogénicité est originale par sa diversité.

On peut classer les infections à staphylocoques en deux groupes principaux, les infections suppuratives superficielles et profondes et les infections non suppuratives dites toxiques (Jarraud 2002).

6-2-1 Les infections suppuratives :

Elles impliquent la prolifération du germe, l'invasion puis la destruction des tissus de l'hôte elles sont soit primitives tel que le furoncle ou secondaires (une porte d'entrée, généralement une effraction cutanée ou une intervention chirurgicale précède l'infection), le staphylocoque est présent dans le site infectieux et on guérit l'infection en l'éliminant (Jarraud 2002). Les plus fréquentes sont les cutanéomuqueuses : furoncle, anthrax (gros furoncles ou abcès sous cutanés), panaris, folliculites, impétigo, cellulite. Mais elles peuvent également atteindre les yeux (conjonctivites), les oreilles (otites), la sphère génitale (endométrite, salpingite) ou les voies respiratoires (pneumonies, pleurésies) et les voies urinaires.

Ces infections se compliquent parfois par extension directe d'une infection superficielle ou par diffusion hématogène de la bactérie (figure 2). *S. aureus* peut alors être principalement responsable d'ostéomyélites, mais aussi de septicémies, d'endocardites, de pneumopathies, d'arthrites, de méningites ou d'abcès du cerveau (Vandenesch 1996).

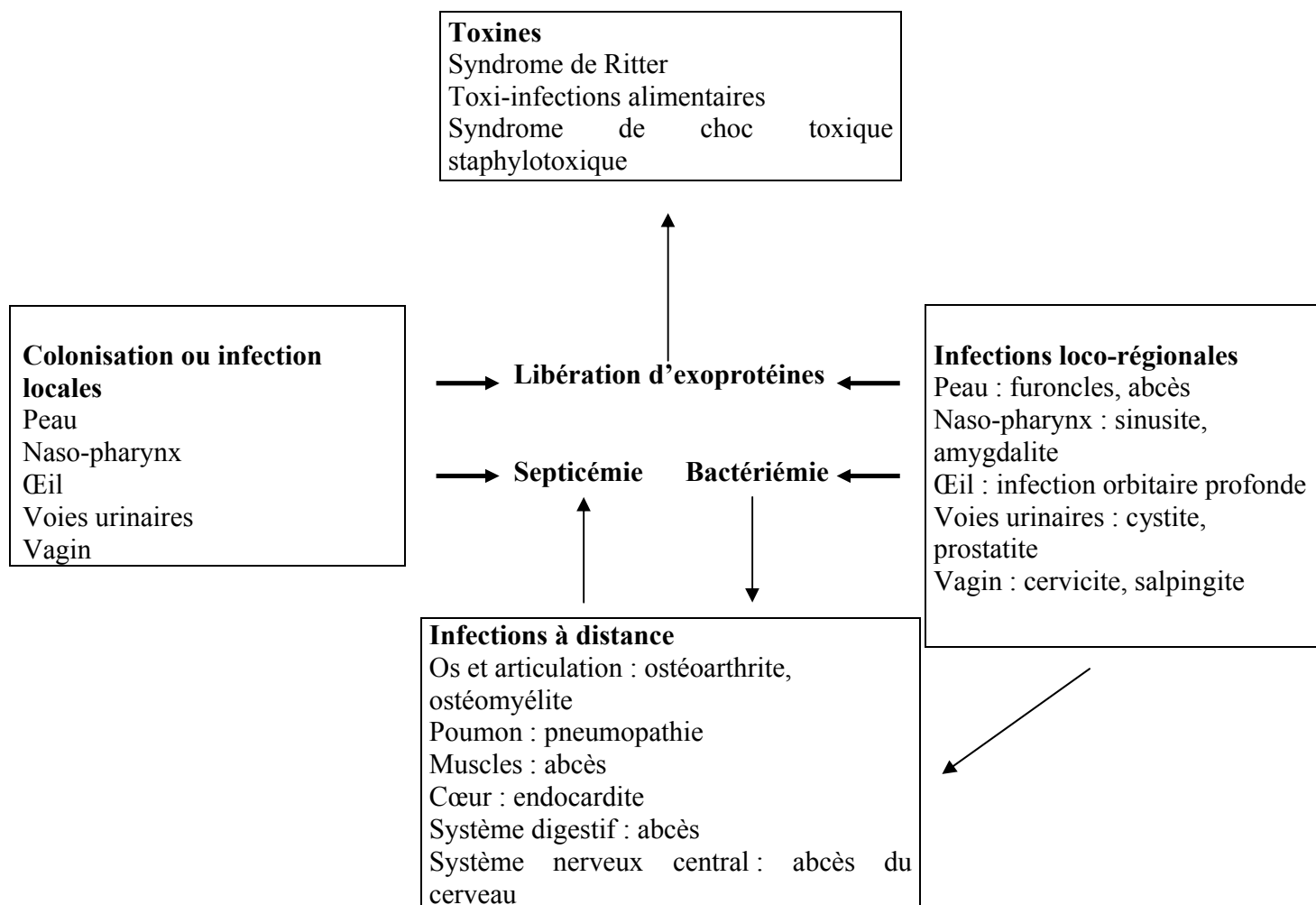


Figure 3 : Les infections à staphylocoques chez l'homme et leur pathogénèse
 (D'après Arbuthnott et al. 1990)

6-2-2 Les infections d'origine toxiniques

C'est la toxine sécrétée par le staphylocoque qui cause les symptômes (Jarraud 2002). Elles peuvent être dues à la diffusion de toxines à partir d'un foyer infectieux ou d'un site de colonisation (exfoliatines, toxine du choc toxique staphylococcique TSST-1) (figure 1). Dans ce cas, la toxine est produite in vivo. Par opposition, les intoxications alimentaires sont dues à l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment contaminé (Avril 2000).

6-2-2-1 Le « SSSS » (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome)

Autrement appelé Syndrome de la peau ébouillantée chez l'enfant ou syndrome de Ritter chez les nouveaux-nés, il est provoqué par la diffusion d'exfoliatine. Le foyer initial peut être ORL, conjonctival ou cutané. Ce syndrome se rencontre dans la grande majorité chez le jeune enfant mais peut aussi se rencontrer chez l'adulte immunodéprimé et les patients atteints d'insuffisance rénale. Le syndrome d'exfoliation généralisée se caractérise par une érythrodermie douloureuse, rapidement suivie d'un décollement bulleux généralisé régressant en 2 à 4 jours. Le staphylocoque n'est pas présent au niveau des bulles. L'évolution bénigne, favorisée par un traitement antibiotique ne doit pas faire oublier le risque d'évolution mortelle estimé à environ 4% en cas de retard de traitement antibiotique (Floret 2000).



Figure 4 : Enfant atteint du syndrome de la peau ébouillantée (CNR des Staphylocoques de Lyon)

6-2-2-2 L'impétigo bulleux

Il est induit par la production d'exfoliatines au sein même des lésions cutanées. Il est constitué d'un nombre variable de bulles prédominantes aux extrémités à contenu trouble contenant le staphylocoque et la toxine (exfoliatine). Les bulles évoluent vers l'ouverture et la formation d'ulcérations puis de croûtes. La cicatrisation se fait en une semaine environ.

C'est la présence d'anticorps qui pourrait expliquer le fait qu'une même toxine, l'exfoliatine puisse être à l'origine soit de lésions très localisées, soit d'une atteinte généralisée,

dans le cas où les anticorps sont présents, la toxine reste in situ, et provoque un impétigo bulleux. Mais en l'absence de ces derniers, la toxine diffuse, entraînant un syndrome de Ritter ou un syndrome d'exfoliation généralisée (Floret 2000).



Figure 5: Enfants atteints d'impétigo bulleux (CNR des Staphylocoques de Lyon)

6-2-2-3 Choc toxique staphylococcique (CTS)

Le syndrome de choc toxique staphylococcique a été décrit pour la première fois en 1978 par Todd et al, il est provoqué par la diffusion dans l'organisme de la toxine (TSST-1) et/ou des entérotoxines. La forme clinique complète de ce syndrome associe une fièvre supérieure à 39°C, une hypotension artérielle, une érythrodermie scarlatiniforme généralisée suivie d'une desquamation au niveau des paumes et des plantes et d'une atteinte multi-viscérale. La mortalité est de l'ordre de 10 %. Cette pathologie a initialement été décrite en pédiatrie comme une complication d'infection suppurative staphylococcique. Depuis, de nombreux cas ont été rapportés, notamment lors de complication d'infections postopératoires ou encore chez des femmes en période menstruelle lors de l'utilisation de tampons vaginaux. Dans ce dernier cas, il n'existait pas de foyer d'infection suppurative à *S. aureus*. C'était la présence de tampon qui favorisait la production de TSST-1 par des souches de *S. aureus* colonisant le vagin (Fleurette 1989 ; Durand et al. 2006).

A côté de cette forme classique, d'autres formes cliniques incomplètes sont décrites :

- La scarlatine staphylococcique caractérisée par une fièvre, un érythème scarlatiniforme avec desquamation dans les 48 heures sans choc ni défaillance multiviscérale.
- Le Neonatal toxic shock syndrome-like Exanthematous disease (NTED) décrit en 2003 au Japon et en France (KiKuchi 2003 ; Van der Mee-Marquet 2003). Ce syndrome est caractérisé par la survenue lors de la période néonatale d'une fièvre, d'une éruption cutanée et d'une thrombocytopénie en l'absence de choc et d'autre signe de défaillance multi-viscérale
- Le syndrome Recalcitrant Erythematous Desquamating Disorder (REDD) décrit chez des patients sidéens, est caractérisé par la survenue d'une fièvre, de lésions scarlatiniformes et d'une défaillance multi-viscérales mais sans état de choc.

6-2-2-4 Intoxications alimentaires

Elles sont provoquées par l'ingestion d'aliments contenant des entérotoxines thermostables (Vandenesch 1996). L'incubation est généralement de trois heures, puis apparaissent des vomissements, une diarrhée et, rarement un collapsus. Les produits laitiers et les viandes sont le plus souvent en cause, souillés par un personnel porteur de staphylocoques. L'évolution est généralement favorable en quelques heures, les formes graves avec choc étant l'apanage des terrains particuliers.

Le diagnostic consiste à mettre en évidence la toxine dans l'aliment. L'isolement d'un staphylocoque producteur de toxines dans l'aliment présente un élément de diagnostic présomptif (Floret 2000).

6-2-2-5 Entérocolites aiguës

C'est un syndrome entérique sévère avec fièvre, diarrhées aqueuses a fécales contenant de fausses membranes.

Elles surviennent au décours d'une antibiothérapie et sont dues à la prolifération de *S.aureus* antibiorésistant et producteurs d'entérotoxines (Avril 2000)

6-2-3 Pathologie associée à la leucocidine de Pantone-Valentine (PVL)

6-2-3-1 Le furoncle

Les souches de *S.aureus* productrices de PVL sont classiquement associées à la survenue d'infections cutanées primitives telles que les furoncles, 95% des furunculoses sont dues à des souches PVL + (Gillet 2007).

Le furoncle est une infection aiguë et profonde du follicule pilo-sébacé due à *S. aureus*, présentant une évolution spontanée vers la nécrose en une semaine environ. Ce type d'infection est favorisé par un portage à *S.aureus*. Il débute par une simple folliculite puis on note l'apparition d'une zone indurée douloureuse, rouge et chaude avec au centre une pustule jaunâtre, puis le bourbillon s'élimine en quelques jours en laissant une cicatrice creuse. Il est impératif d'éviter toute manipulation intempestive des furoncles afin d'éviter leur extension et notamment lorsqu'ils sont localisés sur le visage. Le risque est en effet la staphylococcie maligne de la face. Il s'agit d'un tableau infectieux gravissime avec fièvre, frisson et un œdème du visage. Il s'accompagne d'une septicémie et son évolution est spontanément mortelle par thrombophlébite des sinus caverneux et atteinte méningée (cette pathologie n'est pas directement associée à la présence de la PVL).



Figure 6 : Furoncle, abcès et panaris dus à *S.aureus* sécréteur de PVL
(CNR des Staphylocoques de Lyon)

La complication la plus fréquente est le passage à la chronicité (ou furonculose chronique). Il est important dans ce cas de rechercher un portage de *S. aureus* et également un facteur favorisant (diabète, alcoolisme, atopie, immunosuppression, défaut d'hygiène ...)

Les diagnostics différentiels sont : les folliculites superficielles, la maladie de Verneuil (syndrome suppuratif chronique, inflammatoire essentiellement ano-périnéale), la myiase et bien sûr l'acné.

6-2-3-2 La pneumonie nécrosante

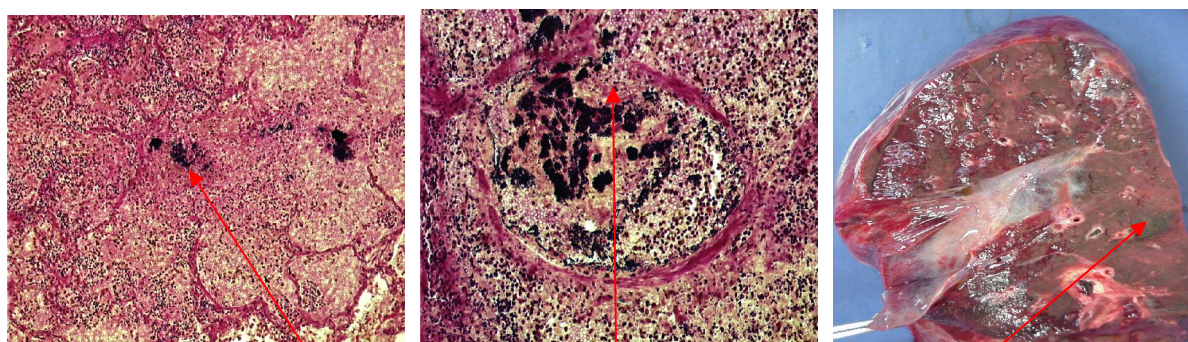
La pneumonie nécrosante PVL + s'oppose nettement aux autres pneumopathies tant sur les spécificités épidémiologiques, cliniques que biologiques. Une étude comparative a montré ainsi que la pneumonie nécrosante PVL + est une maladie de l'enfant, alors que l'âge médian est de 70 ans dans les formes PVL -. Ce sont des enfants bien portants, alors que les PVL - du sujet âgé surviennent sur contexte polyopathologique (diabète, éthylisme, corticothérapie). De plus la pneumonie nécrosante PVL + est toujours précédée d'un syndrome infectieux d'allure virale durant quelques jours. Après ces quelques jours, le tableau clinique s'aggrave très vite, dominé par une détresse respiratoire aiguë avec hémoptysies. Il conduit à une hospitalisation d'emblée en réanimation. Au contraire, les adultes atteints de la forme PVL- ont une expectoration purulente, non hémoptoïque et l'aggravation quand elle existe, est progressive.

Radiologiquement, les pneumonies nécrosantes PVL + se caractérisent par le développement rapide d'épanchement pleuraux et d'infiltrats multinodulaires. Les enfants ayant une souche PVL+ sont précocement leucopéniques (en dessous de $500/\text{mm}^3$) dans la majorité des cas, alors que la polynucléose neutrophile est la règle chez l'adulte.

La gravité des pneumonies nécrosantes PVL+ est attestée par le taux très élevé de mortalité, malgré la réanimation et l'antibiothérapie : 75% de décès après un délai médian de 4 jours. Le taux de décès chez les adultes est moins élevé (47%) et la médiane de durée d'évolution est de 25 jours.

Les données histopathologiques achèvent d'individualiser le syndrome PVL+ et témoignent de sa gravité. L'épithélium du larynx et de la trachée est nécrosé, les septa alvéolaires sont détruits, les staphylocoques sont nombreux mais sans afflux de polynucléaires, les lésions hémorragiques sont massives.

Une infection virale des voies aériennes supérieures, banale en apparence, sert probablement de porte d'entrée respiratoire. Elle met à nu la membrane basale et permet aux staphylocoques d'adhérer au collagène et à la laminine des cellules basales de l'épithélium respiratoire. Les lésions nécrosantes induites par les toxines expliquent le développement des hémoptysies, de la détresse respiratoire et de la leucopénie (Jarraud 2002 ; Garnier 2006)



Lésions nécrotiques et hémorragiques d'une pneumonie nécrosante

Figure 7 : Coupe histologique et partie de poumon d'une patiente décédée de pneumonie nécrosante due à une souche de *S. aureus* sécrétrice de PVL (CNR des Staphylocoques de Lyon).

6-2-3-3 les infections ostéoarticulaires

Les ostéomyélites touchent préférentiellement les enfants et les adolescents avec des atteintes principalement tibiales, fémorales et humérales (Tristan 2006).

Une étude publiée en 2007 par Gillet et al, s'est intéressée à des souches de *S.aureus* responsables d'infection ostéoarticulaire chez des enfants, et a comparé l'infection due à des souches PVL + avec les infections dues à des souches non sécrétrices de PVL.

Il ressort de cette étude que les souches sécrétant la PVL provoquent des manifestations plus sévères et sont associées à plusieurs événements : un début brutal, d'emblée bruyant avec une fièvre élevée, une impotence fonctionnelle marquée, une coexistence ou des antécédents récents d'infections cutanées d'allure primitives ou s'agissant d'une forme familiale et / ou récidivante et une évolution rapide vers un tableau de sepsis sévère voire de choc septique avec des lésions osseuses radiologiques.

Cependant, c'est surtout l'évolution sous traitement qui constitue la principale différence entre les souches PVL+, et les souches non sécrétrices de PVL.

En effet, alors que la grande majorité des infections osseuses de l'enfant s'améliorent en quelques jours sous traitement, les infections PVL + non seulement ne s'améliorent guère mais ont tendance à évoluer vers l'aggravation et l'extension des lésions et ce indépendamment de l'efficacité supposée du traitement antibiotique et de la sensibilité du germe in vitro. Ce type d'évolution conduit généralement à la constatation de lésions de nécroses osseuses, de collections intra osseuses ou sous périostées ainsi que d'un aspect d'inflammation intense des parties molles et des muscles adjacents. En l'absence de drainage chirurgical souvent répété, cette évolutivité conduit à la constitution, au niveau des os long, de tableaux de pandiaphysites parfois impressionnants. Enfin des localisations viscérales secondaires sous forme d'abcès, principalement au niveau pulmonaire mais également au niveau du foie et des reins ont été observées chez 50% des cas (Gillet 2007).

7 La résistance à la méticilline

Initialement sensibles à l'ensemble des β lactamines, les Staphylocoques constituent un exemple caractéristique de l'adaptation des microorganismes à l'introduction successive de nouveaux antibiotiques. Ainsi, les années 1950, dix ans après le développement de la pénicilline G, virent l'extension rapide de la résistance des Staphylocoques par une pénicillinase plasmidique (Berger-Bächi 1997). Dans les années 1960, la fixation de groupement chimique volumineux sur le noyau β -lactame permis le développement de la pénicilline M, initialement représentée par la méticilline puis par l'oxacilline et la cloxacilline, plus stables. Mais dès sa commercialisation, les premières souches de *S.aureus* résistant à la méticilline (SARM) apparurent (Barber 1961).

7-1 Bases moléculaires de la résistance à la méticilline

7-1-1 Modes d'action des β -lactamines

Le peptidoglycane est une structure vitale de la bactérie. Il est à la fois l'exosquelette ,qui lui confère sa rigidité et la protège de l'explosion dans le milieu ambiant habituellement hypotonique, et le point d'encrage de multiples molécules de surface entre la bactérie et son environnement. Il n'est donc pas étonnant que l'interférence avec l'assemblage du peptidoglycane soit le mode d'action des β lactamines (Moreillon 1996 ; Nour 2005).

La cible des β -lactamines est un ensemble d'enzymes de la membrane cytoplasmique nécessaire à la formation du peptidoglycane de la paroi. Les β -lactamines se fixent d'une manière irréversible à l'une ou à l'autre de ces protéines appelées, pour cette raison, « protéine liant la pénicilline » (PLP), il existe quatre PLP de hautes affinités pour les β lactamines chez *S.aureus*. Le substrat normal de ces PLP est l'acétyl-D-alanyl- D-alanine. La pénicilline et les autres β -lactamines agissent comme des analogues de ce substrat empêchant la synthèse de la paroi cellulaire .Ainsi, en présence d'une β -lactamine, les bactéries sensibles ont de ce fait une paroi fragilisée et sont incapables de résister aux chocs osmotiques (Moreillon 1996 ; Stapleton and Taylor 2002).

7-1-2 Mécanisme de résistance

Deux mécanismes sont impliqués dans la résistance acquise de *S. aureus* aux β -lactamines :

7-1-2-1 La modification de la cible des antibiotiques

Appelée aussi résistance de haut niveau, c'est une résistance intrinsèque dont le principal mécanisme est dû à la production d'une cinquième et nouvelle PLP appelée PLP 2a ou PLP 2' présentant peu d'affinité pour la méticilline et toutes les autres β -lactamines. Cette PLP additionnelle est capable de catalyser à elle seule l'assemblage du peptidoglycane alors que les PLP normales sont saturées par les β -lactamines, ainsi, en présence de concentrations croissantes de méticilline, une inhibition progressive des PLP normales est observée ; à partir de 5 mg/ml de méticilline, la synthèse du peptidoglycane ne dépend plus que de cette PLP2a (Vandenesch 1996 ; Moreillon 1996 ; Nour 2005)

7-1-2-2 La production de β -lactamase

Appelée également résistance de bas niveau, il s'agit en fait d'une résistance extrinsèque, elle est beaucoup plus rare et concerne les souches phénotypiquement résistantes à la méticilline mais ne possédant pas le gène résistance. Elle est liée à d'autres mécanismes que la présence d'une PLP supplémentaire, ce sont les souches appelées BORSA (pour Borderline Résistant *S. aureus*) qui présentent une résistance à la méticilline à cause d'une production accrue de β -lactamase, 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 il y a une diminution de l'affinité pour les β -lactamines. (Barbier Frebourg 2001)

7-1-3 Le gène *mec A*, déterminant génétique de la PLP 2a et sa régulation

La PLP 2a est codée par un fragment d'ADN de 2,1 kb désigné *mecA* (Ito and Hiramatsu 1998). Les souches de *S.aureus* possédant le gène *mec A* sont résistantes à toutes la famille des β -lactamines (Vandenesch 1996).

L'expression du gène *mecA* et donc la quantité de PLP 2a produite dépendent d'au moins deux systèmes régulateurs agissant au niveau transcriptionnel :

- le système de gènes *mecI* et *mecRI* situés en amont du gène *mecA* au niveau du chromosome

- le système *blaI* et *blaRI* situés en amont du gène *blaZ* (gène de production de β lactamase) au niveau du plasmide.

Les gènes *mecI* et *mecRI* constituent un opéron avec le gène *mecA* où *mecI* agirait comme répresseur, alors que le gène *mecRI* serait l'antirépresseur, de la façon suivante :

Le gène *mecRI* code pour une protéine MecRI qui agirait comme transducteur de signal : MecRI détecte la présence de β -lactamine grâce à son domaine extracellulaire. Une fois l'antibiotique lié, il y a activation du domaine intracellulaire. Celui-ci subirait une activation par protéolyse limitée lui conférant une activité protéasique. Cette dernière conduit à la dégradation du MecI (répresseur de la transcription codé par *mecI*) qui est fixé au niveau de l'opérateur d'où libération de ce dernier et expression du *mecA*.

Le système *mecI-mecRI* exerce une répression transcriptionnelle sur *mecA* plus importante que celle exercée par le système *blaI-blaRI*. Mais il semble que la majorité des SARM aient un système *mecI-mecRI* non fonctionnel soit par délétion de ces gènes soit par mutation ponctuelle. Le système *blaI-blaRI* prend alors le contrôle du gène *mecA* et la transcription de ce gène devient inductible.

Le gène *blaI* code pour une protéine inhibant la transcription de *blaZ* (co- répresseur) alors que le gène *blaRI* a une fonction antirépresseur. Le gène *blaRI* code en effet pour une protéine membranaire, laquelle permet en présence d'une β -lactamine (l'inducteur) de lever la répression exercée par le produit de *blaI* sur *blaZ*. Ce système *blaI-blaRI* contrôle non seulement l'expression de *blaZ* mais aussi l'expression de *mecA* (Vandenesch 1996 ; Stapleton and Taylor 2002 ; Nour 2005).

7-1-4-Gènes accessoires affectant l'expression de la résistance à la méticilline

Au moins quatre gènes nécessaires à l'expression de la résistance à haut niveau ont été mis en évidence. Ce sont les gènes *femA*, *femB*, *femX* (fem pour facteur essentiel à la résistance). Ces gènes sont situés à distance de *mecA* et sont tous impliqués d'une certaine façon

dans une des étapes de la synthèse du peptidoglycane, plus précisément dans la construction des ponts croisés pentaglycine qui lient les chaînes glycanes ensemble (Le peptidoglycane étant un biopolymère complexe, constitué de longues chaînes glycanes connectées entre elles par des ponts peptidiques), or ces ponts sont un des principaux substrats-cibles des enzymes autolytiques (Vandenesch 1996 ; Stapleton and Taylor 2002).

La protéine FEMX est impliquée dans la liaison de la première glycine à la chaîne peptidique, FEMA est impliquée dans la liaison de la 2^{ème} et 3^{ème} glycine, quant à FEMB dans la liaison de la 4^{ème} et 5^{ème} glycine.

L'inactivation de ces gènes permet d'avoir une réduction importante de la résistance à la méticilline, mais va aussi affecter la sécrétion de facteurs de virulence, diminuant ainsi le pouvoir pathogène de la bactérie (Stapleton and Taylor 2002).

7-1-5 La résistance hétérogène et homogène des SARM

Une souche est définie comme homogène lorsque toute sa population exprime une résistance à haut niveau à la méticilline, c'est-à-dire capable de croître en présence d'une concentration d'oxacilline supérieure à 4mg/ml, alors qu'une souche est dite hétérogène lorsqu'elle possède plusieurs sous populations exprimant des degrés variables de résistance, dont seul un petit nombre présente une résistance de haut niveau, le pourcentage de bactéries résistantes pouvant varier de 1/10³ à 1/10⁸ (Vandenesch 1996 ; Barbier Frebourg 2001 ; Sapleton and Taylor 2002)

7-1-6 Emergence des SARM

Le SARM « naît » après avoir acquis, par transfert horizontal, un élément génétique mobile particulier appelé « Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* » (SCC*mec*), véhiculant le gène *mecA* codant pour la résistance à la méticilline.

Le SCC*mec* correspond à un fragment d'ADN de 21 à 67 kb intégré dans le chromosome de SARM à un site unique appelé *attB_{scc}* localisé à l'extrémité 3'd'une séquence à cadre de lecture ouvert : *orfX* (Nour 2005 ; Kondo et al. 2006).

Deux éléments essentiels constituent la structure de SCC*mec* : le complexe *mec* et le complexe *ccr*, mais on y retrouve également une séquence répétée inversée aux deux extrémités, ainsi que des sites privilégiés où les plasmides et les transposons s'intègrent entraînant ainsi l'émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques non β -lactamines et aux métaux lourds (Hiramatsu 2001 ; Katamaya et al. 2003 ; Nour 2005, Kondo et al 2006).

7-1-6-1 Le complexe *mec*

IL est constitué d'une copie intacte du gène *mecA*, d'une séquence d'insertion et des gènes régulateurs (*mec I* et *mec RI*) qui peuvent être intacts ou tronqués (les mutations qui surviennent à ce niveau peuvent affecter le niveau de résistance à la méticilline).

A ce jour, cinq classes de complexe *mec* (A à E) ont été décrites chez les staphylocoques (Katayama et al.2000 ; Lim et al. 2003 ; schore et al. 2005).

Cette classification du complexe *mec* est définie selon l'organisation génétique des gènes régulateurs : *mecRI* et *mecI*.

7-1-6-2 le complexe *ccr*

C'est le complexe des gènes recombinases, il intervient dans la mobilité de la cassette SCC*mec* et il est constitué soit d'une paire de gènes codant pour les recombinases A et B appelés « cassette chromosomal recombinase genesA and B » dont 4 homologues structuraux ont été décrits pour chaque gène *ccr* (*ccrA-B(1-4)*), soit d'un gène unique *ccrC* retrouvé uniquement au niveau de la cassette SCC*mec* de type V(Kondo et al. 2006).

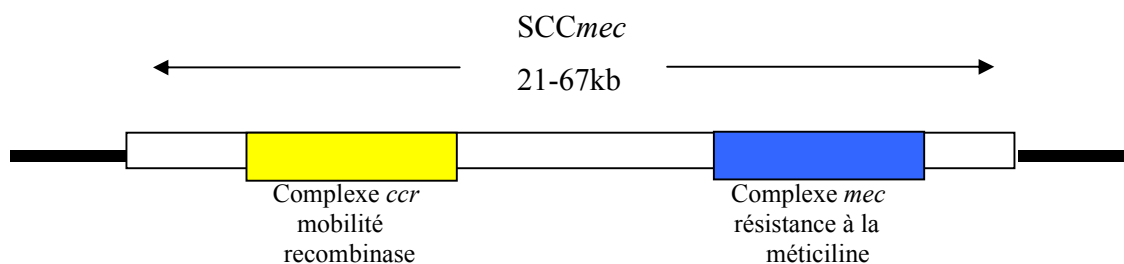


Figure 8 : Structure schématique de SCC *mec*

7-1-7 Polymorphisme génétique du SCC*mec*

Le SCC*mec* présente une diversité génétique ; à ce jour cinq types majeurs (I-V) ont été décrits et définis selon la combinaison entre les différents complexes *mec* et les complexes des gènes des recombinases (Tableau 2). Les types de cassette diffèrent par leur structure et leurs taille (entre 20 et 66 kb) ainsi que par leur répertoire de résistance aux antibiotiques (Katamaya et al. 2000 ; Hiramatsu et al. 2001 ; Ito et al. 2001 ; Daum et al. 2002 ; Ito et al. 2004)

Tableau 1 : Les différents types SCC *mec*

Types SCC <i>mec</i>	Complexe <i>mec</i>	Type de recombinases	Taille (kb)
I	Classe B	<i>ccrAB-1</i>	34
II	Classe A	<i>ccrAB-2</i>	52
III	Classe A	<i>ccrAB-3</i>	66
IV	Classe B	<i>ccrAB-2</i> ou <i>ccrAB-4</i>	20 à 24
V	Classe C2	<i>ccrC</i>	28

En 2006, Chongtrakool et al. propose une nouvelle nomenclature, dans le nouveau système de classification, les types de cassette *mec* sont décrits comme suit (les anciens noms sont indiqués entre parenthèse) :

1. Type 1B (Type-I) : type 1 *ccr* and class B *mec*
2. Type 2A (Type-II) : type 2 *ccr* and class A *mec*
3. Type 3A (Type-III) : type 3 *ccr* and class A *mec*
4. Type 2B (Type-IV) : type 2 *ccr* and class B *mec*
5. Type 5C (Type-V) : type 5 *ccr* and class C *mec*
- 6.

8 Traitement des infections à *S.aureus*

Les infections bénignes (suppurations) dues à un *S.aureus* sensible à la méticilline (SASM) se traite à l'oxacilline, si c'est une infection causée par un *S.aureus* résistant à la méticilline elle sera traitée par des macrolides (pristinamycine) ou de la cotrimoxazole.

S'il ne semble pas raisonnable de traiter en première intention des infections banales à *S. aureus* par des glycopeptides en ville (communauté), il est probablement nécessaire de réaliser un antibiogramme systématiquement sur toutes les souches isolées, afin de pouvoir adapter l'antibiothérapie, la sensibilité conservée à de nombreux antibiotiques des SARM d'origine communautaire doit permettre de conserver un choix thérapeutique assez large, en revanche l'utilisation d'un traitement empirique avec des glycopeptides pour les infections graves nécessitant une hospitalisation, même chez des patients ne présentant pas de facteurs de risques classiques de portage de SARM, est probablement l'attitude la plus prudente. Cependant, elle présente l'inconvénient d'être en opposition avec les recommandations habituelles concernant la maîtrise de l'antibiothérapie, car n'oublions pas, que la vancomycine (glycopeptide) est l'antibiotique de dernier ressort pour les infections à SARM, et que la situation est devenue inquiétante depuis que des souches résistantes aux glycopeptides ont été décrites un peu partout dans le monde, même en Tunisie (Mastouri 2006). En Algérie de telles souches n'ont pas encore été décrites selon le réseau de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (Rahal et al. 2006).

En ce qui concerne les souches productrices de la leucocidine de Pantou et Valentine (PVL +), une récente étude a démontré *in vitro* que lorsqu'ils sont présents à des concentrations sub inhibitrices, les β -lactamines (antibiotique de premier recours pour les infections à *S.aureus* sensible à la méticilline ou SASM) et dans une moindre mesure, la vancomycine provoquent une augmentation de la sécrétion de PVL par augmentation de la transcription des gènes de la PVL. Inversement, les antibiotiques agissant sur la synthèse des protéines bactériennes tels que la clindamycine et le linézolide et même l'acide fucidique, diminuent de façon significative la production de la PVL y compris à des concentrations sub optimales. (Dumitrescou et al. 2007).

Quoi qu'il en soit et quelle que soit la molécule utilisée, une monothérapie est vraisemblablement insuffisante dans ce contexte d'infection sévère et rapidement évolutive et l'adjonction d'une β -lactamine lorsqu'il s'agit d'une souche de SASM paraît licite. En effet les

autres molécules actives sur la synthèse protéique ont une bactéricidie bien trop lente pour être utilisée seule dans ce contexte.

En plus des traitements antibiotiques, les infections à *S.aureus* producteur de PVL, notamment les infections ostéoarticulaires doivent être toujours accompagnées de gestes chirurgicaux parfois répétés (drainage), car chez les souches PVL +, la constitution rapide de collection suppurée et de lésions nécrotiques non vascularisées empêchent l'action de la plupart des antibiotiques dont la concentration dans le pus est faible et donc insuffisante pour obtenir une bactéricidie nécessaire (Gillet et al 2007).

Enfin, la sérothérapie par des immunoglobulines polyvalentes, qui a déjà fait ses preuves dans les pathologies toxiques, notamment dans les syndromes de choc toxique, est en cours d'expérimentation pour la PVL, en effet il a été montré in vitro qu'une préparation d'immunoglobulines polyvalentes (Tégéline®) commercialisée était à même de neutraliser l'effet cytopathique de la toxine sur les polynucléaire. Quelques cas d'améliorations parfois qualifiés de « spectaculaires » dans des infections nécrosantes sévères de types pneumonies ou fascites liées à des souches PVL+ ont été rapportés (Gillet et al 2007).

9 Epidémiologie des infections à SARM

Depuis les premiers cas d'infection à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) rapportés en 1961 en Angleterre, les SARM ont été décrits par vagues successives, d'abord en Europe continentale, puis en Amérique et dans le monde entier.

De nos jours, Les SARM sont endémiques dans beaucoup de régions du monde telles que le sud de l'Europe (France, Espagne), l'Est des États-Unis et l'Est de l'Australie, et relativement rare dans des régions voisines, le Nord de l'Europe (Danemark) et l'Ouest de l'Australie. Cette prévalence de SARM plus importante dans les pays du sud de l'Europe où le taux de résistance aux antibiotiques est le plus élevé, serait la conséquence d'une consommation importante d'antibiotiques et d'un retard dans la mise en place d'un programme de maîtrise contre la diffusion des bactéries multirésistantes (Eveillard et al.2002).

En Afrique, peu de pays disposent de données de surveillance régulière concernant les SARM. En 1997, une étude épidémiologique de l'antibiorésistance en Afrique de l'Ouest (Bénin, Côte d'Ivoire, et Togo) a révélé un taux global de 14,5% avec une fréquence de souches productrices de PVL significativement élevée (30% contre 2%) (Baba Moussa et al. 1999) ; une autre étude étalée sur 3 ans entre 1997 et 1999 au Togo, dans un hôpital de Lomé, a recensé un taux de 67 % de SARM (patients hospitalisés et externes confondus) ce qui est relativement important (Dagnara 2001) ; alors qu'à Abidjan, ce taux s'élevait de 25% lors d'une étude menée en 2004. (Akoua Koffi et al. 2004).

Les pays du Maghreb ne sont pas en reste, là encore, la prévalence des SARM ne cesse d'augmenter, elle est passée en Tunisie et Algérie de 10% en 1997, à 15,5% en 2003 en Tunisie, et de 14% en 2001 en Algérie pour atteindre les 33,2% en 2004 (Ramdani et al. 2006).

Une récente étude étalée sur 3 ans de 2003 à 2005 et portant sur le taux de SARM dans les hémocultures au niveau de 9 pays bordant le bassin méditerranéen (Algérie, Chypre, Egypte, Jordanie, Liban, Malte, Maroc, Tunisie et Turquie) a placé l'Algérie en sixième position avec un taux d'incidence à SARM de 45%. L'Algérie arrive derrière La Jordanie (56 %), le Liban (56 %), l'Egypte (52 %), Malt (50 %) et la Turquie (46 %) (Borg et al. 2007).

Le Maroc, la Tunisie et le Liban ont enregistré les taux d'incidences les plus faibles avec respectivement 19, 18 et 12 % (in Ramdani et al. 2006).

De plus les derniers rapports du réseau de surveillance des bactéries aux antibiotiques en Algérie montrent un taux croissant de *S.aureus* qui augmente de 40 % en 2005 à 46,6 en 2006 (Rahal et al. 2005 ; 2006).

L'étude épidémiologique des SARM repose sur la connaissance et la caractérisation des souches hospitalières (SARM-H) et communautaires (SARM-C), sur leur caractérisation moléculaire, ainsi que sur leur diffusion dans le monde.

9-1 Définition des infections communautaires et nosocomiales

Une infection à SARM-C est une infection qui existait ou était en incubation à l'admission du patient. Une infection à SARM-H est acquise après hospitalisation. Généralement, 48 à 72 heures est le délai pris comme limite de séparation. Le paramètre « temps » varie dans la littérature de 48 heures après admission jusqu'à 5 jours après hospitalisation. Le terme communautaire implique donc que le SARM a été acquis hors du milieu hospitalier, cependant le site réel de l'acquisition de la bactérie est rarement déterminé avec certitude en raison de la longue durée de portage. Ainsi cette définition basée seulement sur le facteur temps n'est pas précise et mérite d'être revue car certaines infections se manifestant initialement dans la communauté, seraient dues à des souches hospitalières ayant colonisé au départ soit le malade soit son entourage.

Par ailleurs, certaines infections sont contractées dans des circonstances ne permettant pas leur classification d'autres présentent des caractéristiques mixtes aux deux types d'acquisitions, C'est pourquoi d'autres facteurs rentrent en considération pour de déterminer l'origine hospitalière ou communautaire des SARM tels que l'antibiorésistance, le diagnostic clinique, ainsi que la biologie moléculaire qui est déterminante (Nour et al. 2005).

9-2 Emergence et mode de transmission des SARM hospitaliers (SARM-H)

L'émergence des SARM-H a pour principale origine la sélection de souches résistantes à partir de la flore endogène des patients au cours d'un traitement comprenant un ou plusieurs antibiotiques à large spectre.

Le réservoir est donc habituellement constitué d'un nouveau malade infecté ou colonisé par le personnel médical ou paramédical (nez, mains), ou plus rarement par l'environnement inerte préalablement contaminé : literie, poignées de porte, robinets, blouses, dossiers médicaux, brassards des appareils à pression ainsi que l'air de la chambre.

Les sites habituellement colonisés sont : la peau, les narines, le tube digestif, le périnée, les plaies et les voies aériennes supérieures. Cette colonisation est permanente ou transitoire et son importance varie en fonction de la pathologie sous-jacente : cette colonisation est

particulièrement fréquente et massive chez les brûlés et les malades en réanimation. Les malades sous traitement antibiotique habituellement inactif sur le SARM (toutes les β -lactamines, aminosides, quinolones) sont plus aptes à être colonisés par un SARM. (Le Gallou et Richet 1996 ; Eveillard et al. 2002)

9-3 Emergence et mode de transmission des SARM communautaires

Des SARM hospitaliers étaient occasionnellement isolés hors de l'hôpital chez des sujets colonisés au cours d'une hospitalisation ou d'un acte de soin. Ces sujets avaient généralement des facteurs de risques bien établis, en rapport avec l'origine hospitalière des souches de SARM : hospitalisation ou chirurgie récente, pathologie chronique, âge élevé, membre de l'entourage travaillant dans un établissement de soins. Les infirmières à domicile ont récemment été incriminées dans la propagation de ces souches hors de l'hôpital.

Depuis la fin des années 1990, des souches de SARM sont régulièrement isolées hors de l'hôpital chez des patients ne présentant aucun de ces facteurs de risque. Dans la littérature, ces nouveaux SARM (SARM d'origine communautaires ou SARM-C) ont parfois été confondus ou rattaché aux SARM hospitaliers (SARM-H) isolés dans la communauté chez des sujets à risque (Durupt et al 2005).

Ces infections cutanées à SARM-C surviennent souvent de façon épidémique dans des communautés fermées où la promiscuité entre individus est importante : communauté « primitives » (indiens d'Amérique, communauté rurales d'Alaska, Aborigènes, toxicomanes, homosexuels masculins, équipes de sport, camps militaires, prison. La transmission entre individus peut être directe ou indirecte (par matériel).

D'après Boyce et al, le niveau de cette contamination varie en fonction de la localisation du portage ou de l'infection à SARM. Elle est maximale en cas d'urines infectées ou de lésions cutanées (furoncles, ou dermabrasion) non protégées par des pansements, ces dernières ont été clairement identifiées comme facteurs de transmission de SARM-C dans les sports de contact (rugby, football américains, sport de combats), dans les prisons et les camps militaires. Le rasage

corporel (torse, jambes, pubis) a également été incriminé lors des épidémies d'abcès cutanées chez les sportifs. L'incision des furoncles par les prisonniers eux-mêmes et les lacérations cutanées participent à la transmission des SARM-C par contact direct dans les prisons. La transmission indirecte liée au partage de matériel (rasoir, savons, serviette de toilettes, maillots, casques, appareil de musculation) a été rapportée dans toutes les communautés fermées. L'eau peut aussi être vecteur. Cela a été montré dans un club de sports (contamination du jacuzzi) et lors du lavage du linge dans les collectivités. Le lavage du linge à la main ou en machine à température basse a été incriminé.

Le manque d'hygiène semble aussi être associé à l'acquisition d'une infection à SARM-C. Les études chez les militaires, les sportifs ou les prisonniers ont montré que les difficultés d'accès aux douches et aux savons étaient associées aux épidémies de SARM-C (Eveillard et al. 2002 ; Durupt et al. 2005 ; Weber 2005)

9-4 Les différentes caractéristiques qui opposent les SARM-C aux SARM-H

Il existe des différences significatives entre les deux groupes, d'après plusieurs études et notamment celle menée aux Etats Unis, en 2000 par Naimi et al la différence entre les deux groupes serait sur tous les plans : démographiques, cliniques, résistances aux antibiotiques et moléculaire.

- Sur le plan démographique, il apparaît clairement que les SARM-C sont associés à des patients plus jeunes et en bonne santé avec une médiane d'âge de 23 ans versus 68 ans pour les SARM-H, les SARM-C appartiendraient également à des minorités ethniques ou des milieux sociaux défavorisés (notion de promiscuité, manque d'hygiène).
- Sur le plan clinique, les infections à SARM-C sont majoritairement des infections suppuratives de la peau et des tissus mous, parfois graves (infection systémique, pneumonie nécrosantes, chez les souches sécrétrices de PVL) (Naimi et al. 2003 ; Duprut et al 2005), alors que chez les SARM-H, les infections prédominantes sont les infections respiratoires, les bactériémies, ou encore les infections urinaires, cela concorderait avec la

pose de certains matériels (sondes, un cathéters ou appareils respiratoires) (Naimi et al. 2003). Il a été montré également que les souches communautaires semblent adhérer mieux aux cellules épithéliales humaines que les souches hospitalières et sont plus tolérantes à la salinité cutanée de l'homme. Ceci facilite la colonisation des personnes ne présentant pas des facteurs de risques classiques et par conséquent, favorise leur dissémination dans la communauté (Nour et al. 2005).

- Sur le plan antibiorésistance, à la différence des SARM-H qui sont généralement multirésistants, les SARM-C gardent une sensibilité à la plupart des antibiotiques (hormis les β -lactamines. (Duru et al. 2005), une étude réalisée par Nimmo et al a également montré que toutes les souches SARM-C présentaient une résistance hétérogène à l'oxacilline, alors que la moitié des souches SARM-H présentaient une résistance homogène, cependant, même si les souches acquises en milieu communautaire ont un profil de résistance plus étroit que les souches d'origine hospitalière, il paraît plus raisonnable de les considérer comme multirésistantes en raison de leurs capacités d'acquisition rapide de nouvelles résistances (Eveillard et al. 2002).
- Sur le plan moléculaire, les SARM-C sont fortement associés à certains éléments génétiques : les cassettes de résistance à la méticilline *SCC_{mec}* (Staphylococcal chromosomal cassette) de type IV et V (alors que les types I, II et III sont associés aux SARM-H), les gènes de la leucocidine de Pantan et Valentine ou PVL et l'allèle *agr* (accessory gene regulator) de type 3 considéré comme un marqueur phylogénétique stable. Ces trois éléments génétiques ne sont jamais associés aux SARM-H. L'association des SARM-C à la toxine PVL s'expliquerait par le fait que les SARM -H n'ont pas besoin d'une telle toxine dermonecrotique pour coloniser l'hôte, car les patients les plus infectés à l'hôpital sont généralement dans un état permettant leur colonisation par les SARM (cathéters, excoriations...) (Nour et al. 2005). Enfin les études génomiques par PFGE (pulsed field gel electrophoresis) et MLST (multilocus sequence typing) révèlent la nature clonale des SARM-C dont le fond génétique est différent de celui des SARM-H. (Naimi et al. 2003 ; Duprut et al 2005 ; Sola 2006 et al).

9-5 Diffusion clonale des SARM dans le monde

La grande plasticité du génome de *Staphylococcus aureus* est associée à la constante évolution des caractéristiques épidémiologiques des clones de *S. aureus* responsables d'infections chez l'homme. Ses clones sont caractérisés par leur capacité à acquérir des mécanismes de résistance à de nombreux antibiotiques, compliquant le traitement des infections sévères et profondes. Schématiquement, chaque décennie amène l'émergence de nouveaux clones. Ainsi avant les années 40, les souches de *S. aureus* étaient sensibles à la pénicilline G, dix années après 90 % étaient sécrétrices de bêta-lactamases. En 1960 la première souche de *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) est apparue en Angleterre, puis les SARM se sont répandus de façon épidémique dans les hôpitaux à partir des années 70, pour devenir vers 1980 multirésistants aux antibiotiques et pandémiques. Les années 90 ont vu la description des souches de SARM de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Aux alentours des années 2000, les SARM n'ont plus été limités au secteur hospitalier, mais de nouveaux clones ont été décrits comme responsables d'infections communautaires. Enfin le gène *vanA* de résistance à la vancomycine des entérocoques a été retrouvé dans trois souches de *S. aureus* aux USA (Reverdy et al.2003).

Afin d'identifier ces clones, les épidémiologistes les ont caractérisés en utilisant différents outils moléculaires.

9-5-1 Les outils de description des grands clones de SARM

Le développement des outils de biologie moléculaire a permis de donner des noms aux grands clones pandémiques de SARM et de montrer leur diffusion nosocomiale.

L'appartenance d'une souche de SARM à un clone est démontrée en caractérisant la souche par :

- Le séquençage de 7 gènes de ménage (par la technique MLST pour *multilocus sequence typing*). Un type de séquence (en anglais, ST pour *sequence type*) est attribué à chaque souche analysée ; tous les ST ayant 5 des 7 gènes en commun sont regroupés dans un même complexe clonal (CC).
- La caractérisation du nombre et la structure des répétitions présentes dans la séquence codante de la protéine A de *S. aureus* (*spa typing*). L'analyse de ces répétitions par PCR

permet d'attribuer à chaque souche un profil (*spa type*) dont la définition et la nomenclature sont standardisées au niveau international.

- La caractérisation de la cassette contenant le gène de résistance *mecA* à la méticilline (SCC*mec* pour *staphylococcal chromosomal cassette*). Il existe 5 grands types de cassettes et certains sous-types.
- Le CNR des staphylocoques de France, a également caractérisé le type d'allèle *agr* de chacun des grands clones pandémiques. Il existe 4 types d'allèle *agr* qui reflètent le fond génétique de la souche analysée.

D'autres outils sont utilisés pour typer les souches de SARM comme le profil de restriction de l'ADN chromosomique par électrophorèse en champ pulsé. Cet outil est d'un grand intérêt pour les études de micro-épidémiologie afin de démontrer le lien entre les souches isolées dans un espace spatio-temporel étroit. Son trop fort pouvoir discriminant et sa faible reproductibilité inter-laboratoires ne permettent pas son utilisation exclusive pour des études d'épidémiologie globale (Reverdy et al 2003).

9-5- 2 les principaux clones mondiaux de SARM

Le tableau suivant reprend les principaux grands clones hospitaliers et communautaires

Tableau 3 : Principaux clones de SARM décrits dans le monde (Oliveira et al. 2001 ; Vandenesch et al. 2003)

Famille clonale	Type clonal	Complex Clonal	Séquence type (ST)	Type <i>agr</i>	Type SCC <i>mec</i>	Origine
Archaïque/ Ibérique	Archaïque	CC 8	250	1	I	Hospitalier
	Archaïque	CC 8	247	1	I	
	Ibérique	CC 8	250	1	I	
	Ibérique	CC 8	247	1	I	
Clone V	Clone V	CC 8	8	1	IV	
Brésilien	Brésilien	CC 8	239	1	III	
	Hongrois	CC 8	239	1	III	
	Clone IV	CC 8	239	1	III	
New York/Japon	New York/Japon	CC 5	5	2	II	
Pédiatrique	Pédiatrique	CC 5	5	2	IV	
Européen*	Européen	CC 80	80	3	IV	Communautaire
USA 300	USA	CC 8	8	1	IV	
Sud ouest pacifique	Asie Océanie	CC 30	30	3	IV	

* Le clone européen correspond au clones communautaire ST80, ses souches ont un profil de résistance caractéristique, elles sont résistantes à la pénicilline G, l' oxacilline (résistance hétérogène), la kanamycine, la tétracycline et présentent une résistance intermédiaire à l'acide fusidique. De plus elles portent toutes le gène codant la leucocidine de Panton-Valentine (Vandenesch et al 2003).

En 2006, une globale distribution de ces SARM producteurs de PVL a été étudiée par Tristan et al. Ce qui ressort de cette étude, contrairement à celle menée par Vandenesch en 2003, c'est qu'il n'existe plus de limite géographique dans la répartition des clones, et qu'on assiste de nos jours à des échanges intercontinentaux : des USA vers l'Europe avec le clone ST8 ; des USA vers l'Asie avec le clone ST59, et de l'Europe vers l'Asie avec le clone ST80 (Tristan et al 2007).

9-5-3 Les clones de SARM en Algérie

En Algérie, au CHU Mustapha Bacha d'Alger, lors d'une étude menée en 2004 par Ramdani et al. une forte prévalence de SARM producteurs de PVL a été détectée (72%), la grande majorité de ces souches arboraient le clone communautaire ST80 (séquence type 80, *agr* type 3 et *SCCmec* type IV).

Parmi les souches responsables d'infections nosocomiales 27 de 61 étaient productrices de PVL, elles avaient les mêmes caractéristiques que les clones communautaires, ce qui confirme la dissémination de SARM-C à l'hôpital.

Parmi les souches non productrices de PVL, deux MRSA responsables de chocs toxiques ont été isolés de nouveaux nés. Elles se distinguaient sur le plan moléculaire des souches décrites au Japon et en Belgique par un *agr* type 3 et un clone ST 37. De plus différents clones nosocomiaux ont été trouvés, dont 5 souches arborant les caractéristiques du clone Brésilien et Hongrois (ST 239 et *agr* type1), 6 faisant parties du clone pédiatrique (ST 5 et *agr* type 2) et enfin deux souches avaient les même caractéristiques que le clone ST 80 mais elles étaient non productrices de PVL (PVL -) (Ramdani et al. 2006). Ces souches ont dues probablement perdre leur gène de la PVL, ce dernier étant porté par un phage (Narita et al. 2001).

10 Le portage nasal et son épidémiologie

La colonisation de *S. aureus* chez l'homme se fait rapidement, dès les premières semaines de la vie, environ 90% des nouveaux nés sont porteurs de *S.aureus*, mais ce taux fluctue au cours de la vie, il avoisinera ainsi les 20 % chez les nourrissons de 6 mois à deux ans (Fleurette 1995). Le portage « adulte » est acquis vers l'âge de 6 ans. Chez l'adulte, les fosses antérieures du nez constituent la niche écologique principale de *S.aureus*. Il peut être également isolé au niveau de la peau et du périnée (Williams 1961). En outre, il semblerait que si on éliminait le portage nasal grâce à un antibiotique local, dans la plupart des cas, *S.aureus* disparaît des autres sites de colonisation de l'organisme (Williams 1963). Une étude récente montre que les porteurs de *S.aureus* au niveau du nez ont un portage de 90% au niveau des mains, 60% au niveau du périnée (Wertheim et al. 2005)

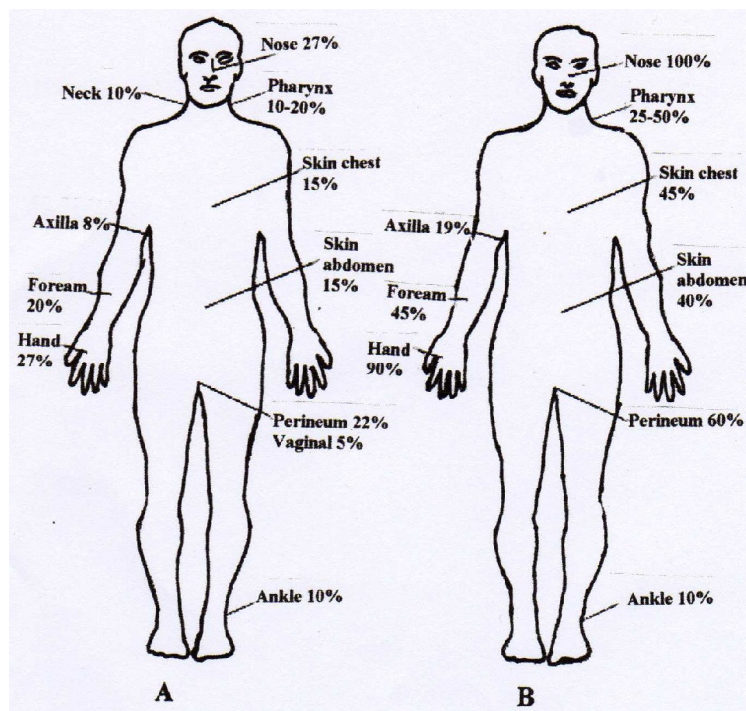


Figure 9: Portage à *S.aureus* d'après (Wertheim et al.2005)

- A. Fréquence du portage nasal à *S.aureus* dans la population en général.
- B. Fréquence du portage nasal à *S.aureus* chez les porteurs nasal.

La plupart des auteurs donnent 20-30% comme valeurs de référence du portage nasal de *S.aureus* dans la population générale. Des prélèvements répétés chez les mêmes malades pendant plusieurs mois permettent de distinguer trois types de portage différents. Une large partie de la population (60%) est porteuse de différentes souches avec une fréquence variable, il s'agit de porteurs dits occasionnels ou intermittents. Une minorité de la population (20%) correspond aux individus qui ne sont jamais porteurs. Enfin, approximativement 20% des individus sont dits « porteurs permanents ». Ce terme doit être réservé à une fraction de la population, toujours colonisée par la même souche sur une période de plusieurs mois voire plusieurs années. Le portage permanent est retrouvé aussi bien chez les enfants que chez les adultes avec une modification des souches retrouvées au niveau du nez entre 10 et 20 ans (VandenBerg et al. 1999).

Les raisons de ces différences de portage ne sont pas connues. Le portage permanent semble avoir des conséquences sur l'acquisition d'autres souches. Il constituerait une barrière à la colonisation par d'autres souches. Ainsi l'acquisition et la transmission de nouvelles souches de *S.aureus* ne concerneraient que les porteurs intermittents et les porteurs permanents traités par des antibiotiques.

A partir des différents sites de colonisation, les souches de staphylocoques vont pouvoir diffuser vers le milieu extérieur à l'hôte ou pénétrer dans le milieu intérieur en déclenchant une maladie. Une auto-infection du malade est fréquente à partir de ses propres colonies staphylococciques nasales. On parle de contamination endogène. Par ailleurs, les porteurs nasaux sont des « disséminateurs ». En effet les porteurs pourraient avoirs un rôle prépondérant dans les échanges de souches (Fleurette 1989).

Depuis l'émergence et la diffusion clonale des SARM en communauté, de plus en plus d'études s'intéressent au taux de portage de *S.aureus* et de SARM en communauté, et en milieu hospitalier avec en plus un dépistage des patients à l'admission et en cours d'hospitalisation permettant d'identifier les sujets porteurs de SARM asymptomatiques, ainsi que le dépistage au sein du personnel soignant, ce dernier étant incriminé dans la diffusion des SARM entre la communauté et l'hôpital.

Cette stratégie de dépistage constitue une composante majeure de tout programme de contrôle.

10-1 Prévalence des différents portages dans le monde

S' il est bien admis que le portage nasal de *S. aureus* est environ de 30% en communauté le portage de SARM est en revanche variable selon les études, il est de 17 à 39 % chez des communautés isolées en Australie (O'Brien et al 1999), de 16 % à Abidjan (Akoua Koffi et al. 2004), et jusqu'à moins de 0,28% en Malaisie (Choi et al. 2006).

En milieu hospitalier, ce taux est de 7,3% à Atlanta (USA), ainsi qu'à Taiwan chez des enfants hospitalisés (Hidron et al. 2005 ; Huang et al. 2006), en France il est de 6,9% chez les patients à l'admission et de 6,3 parmi le personnel hospitalier (Nguyen Van et al. 2006), Au Texas (USA), il est de 10,2 % chez des patients à l'admission (Haley et al. 2007) et enfin il atteint les 38,7% chez le personnel soignant à Abidjan (Akoua Koffi et al. 2004).

En Algérie, à Tlemcen Mesli et al, ont estimé le taux de portage nasal de *S.aureus* de 27.9 % et le taux de SARM de 3,1 %. Cette étude a été menée au sein de la communauté et a porté 344 sujets. (Mesli et al, 2006).

Suite à ces études, certains facteurs de risque de colonisation par un SARM ont été établis, chez les personnes hospitalisées tels qu' une antibiothérapie antérieure à 3 mois avant l'admission, une hospitalisation dans l'année, HIV séropositifs, hospitalisation avec une infection cutanée, en communauté, le manque d'hygiène, le tabagisme, ainsi que la prise de pilules contraceptives ont été incriminés (Hidron et al. 2005 ; Choi et al. 2006).

Chapitre II

Matériels et méthodes

1 Matériels

I-1 Matériel de laboratoire

Le matériel utilisé est celui habituellement présent au niveau d'un laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire.

I-2 Matériels biologiques

I-2-1 Les souches de référence utilisées

Le contrôle de qualité est assuré par les souches de références :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, résistante à la méticilline
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sensible à la méticilline

I-2-2 Les souches isolées

Notre étude est une enquête descriptive qui porte au total sur 700 souches de *S.aureus* isolées à l'hôpital Mustapha Bacha d'Alger, sur une période allant d' Avril 2006 à Décembre 2007.

Une enquête rétrospective a été menée entre Avril et Octobre 2006, dans laquelle 167 souches de *S.aureus* avaient déjà été isolées, puis une enquête prospective entre Novembre 2006 et Décembre 2007 a permis d'isoler les 533 restantes.

Les souches ont été isolées chez 663 patients, chez certains de ces patients nous avons isolé jusqu'à 3 souches de *S.aureus* différentes (antibiotypes ou morphologie différentes) ou provenant d'infections différentes.

Les *S.aureus* ont été isolés à partir de malades consultants ou de malades hospitalisés au niveau de différents services, ces souches proviennent également de divers prélèvements : pus,

urines, hémocultures, liquides céphalorachidiens, liquides articulaires, liquides d'ascite et péritonéale prélèvement buccal, prélèvements respiratoires, prélèvements vaginaux, tissus mous et osseux, sérosités, sécrétions conjonctivales et matériels.

Nous avons également réalisé une enquête de portage nasal où nous avons isolé 56 souches au niveau du service de dermatologie de l'hôpital Mustapha Bacha, ces 56 souches provenaient de 46 malades.

I-3 Les milieux de cultures utilisés (Annexe 1)

- Gélose au sang frais (GSF)
- Gélose au sang cuit (GSC)
- Gélose Chapman
- Gélose nutritive (GN)
- Gélose Mueller Hinton (MH)
- Gélose Mueller Hinton additionnée de 4% de NaCl + 6 µg/ml d'oxacilline
- Gélose P
- Gélose Chapman additionnée de 4 µg/ml d'oxacilline
- Gélose au sang frais (GSF) additionnée de 4 µg/ml d'oxacilline

2-Méthodes

2-1 Identification de l'origine communautaire ou nosocomiale des souches

Nous avons pris une limite supérieur à 48 heures d'hospitalisation comme délai de séparation entre les deux infections, mais comme certaines infections sont contractées dans des circonstances ne permettant pas leur classification, nous nous sommes donc également basés sur l'antibiorésistance des souches, le diagnostic clinique ainsi que les antécédents hospitaliers des patients.

Afin de récolter ces différentes informations, nous avons établi un questionnaire destiné à tous les patients chez lesquels nous avons isolé un *S. aureus*, ils devaient ainsi répondre à un certain nombre de questions concernant l'infection, le traitement, les antécédents hospitaliers et familiaux, ainsi que la notion de vie en promiscuité (Annexe 2)

2-2 Identification bactériologique

2-2-1 Isolement et identification des *Staphylococcus aureus*

2-2-1-1 La culture

Elle se fait, en ensemençant les différents prélèvements dans les milieux suivants : GSF, GSC que nous incubons à 37°C sous CO₂ et gélose Chapman que nous incubons à 30°C en atmosphère normale.

Après 18 à 24 heures d'incubation, nous isolons les colonies caractéristiques du Staphylocoque et nous confirmons leur appartenance au genre *Staphylococcus* en effectuant un Gram et une Catalase.

Puis nous passons à la confirmation de l'espèce par :

2-2-1-2 La recherche de la coagulase libre

C'est le test principal d'identification de l'espèce *S.aureus*. D'autres espèces comme *S.delphini*, *S. intermedius*, *S.schleiferi* subsp *coagulans* et quelques souches de *S.hyicus* produisent une coagulase, mais ces souches sont rarement isolées chez l'homme. (Vandenesch 1996)

Le test s'effectue en mettant en présence, du plasma de lapin et la souche à étudier dans un tube à 37°C : la prise en masse du mélange est réalisée en 3 à 6 ou parfois en 24 heures, la coagulation peut être suivie d'une dissolution du caillot par suite de l'action de la staphylokinase, la figure suivante représente la lecture positive ou négative du test de la coagulase.

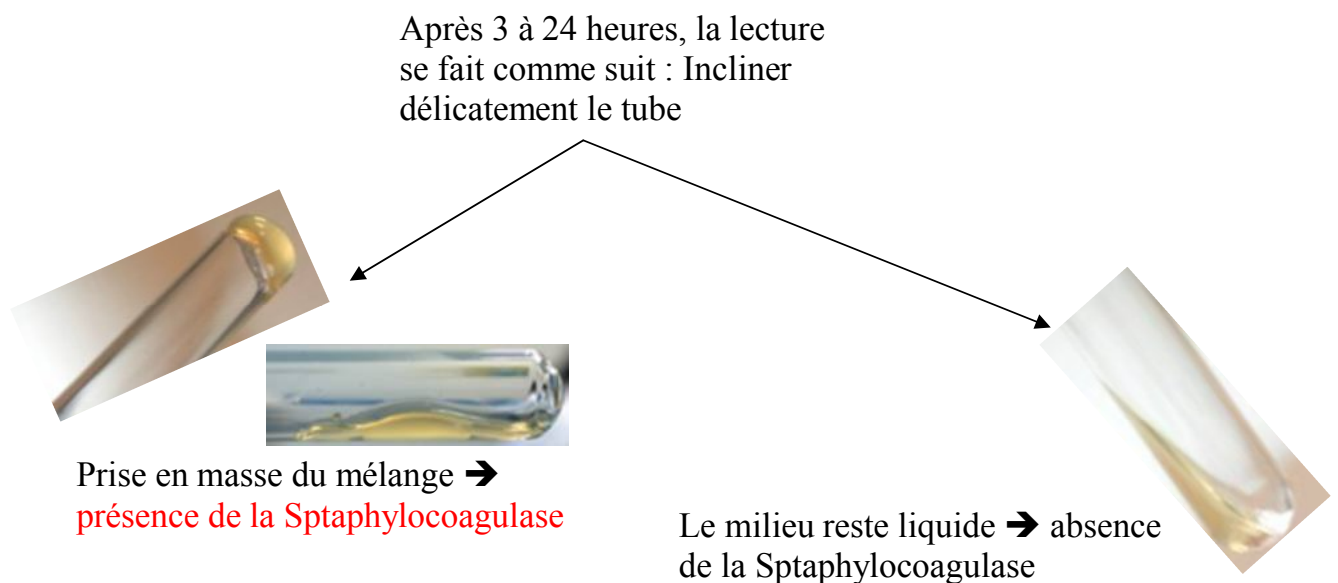


Figure10 : Lecture du test de la coagulase pour identification de *S.aureus*

2-2-1-3 Le test rapide d'identification de *S.aureus*

Principe

C'est un kit combinant plusieurs réactions d'agglutination, le réactif appelé Pastorex Staph-plus (Biorad), contient des particules de latex qui permettent la recherche sur les *Staphylococcus* de la protéine A qui possède une affinité pour le fragment Fc des IgG

Toute agglutination du réactif test en présence d'une souche de *Staphylococcus* permet d'identifier *Staphylococcus aureus*.

Mode opératoire

Nous mettons en contact la souche à tester avec une goutte de réactif positif et négatif (pour distinguer les agglutinations non spécifiques), si le test est positif une réaction d'agglutination apparaît tout de suite après émulsion, la figure suivante représente l'illustration de ce test.

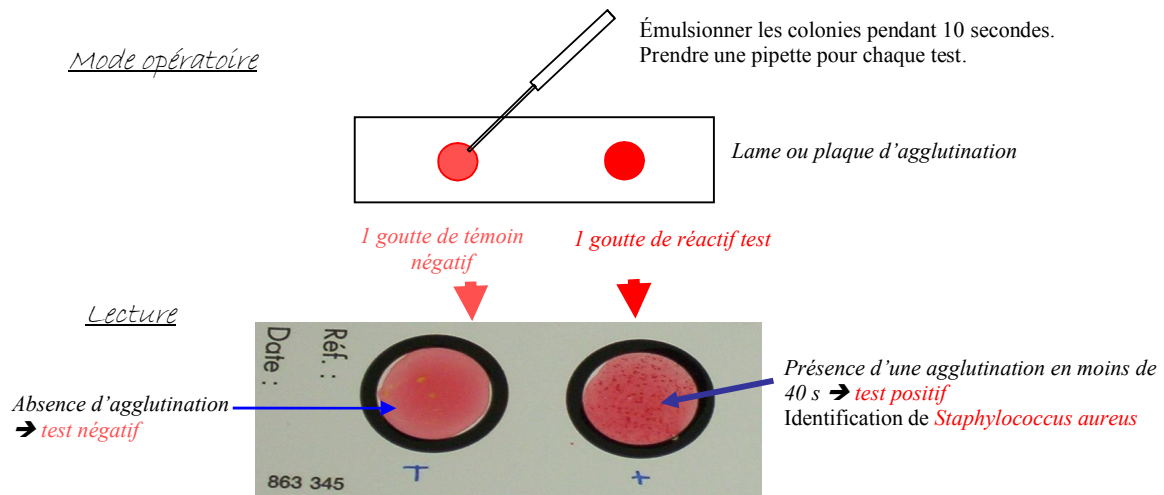


Figure 11 : Test d'agglutination rapide pour identification de *S. aureus*

2-2-1-4 La galerie API

La détermination de l'espèce peut être réalisée à l'aide de galeries biochimiques d'identification. Ces systèmes utilisent des tests d'acidification ou d'assimilation des sucres et des tests enzymatiques.

Au laboratoire, nous utilisons la galerie ID 32 STAPH (bioMérieux), pour confirmer l'identification de certaines souches pour lesquelles le test de la coagulase était douteux, ou lorsqu'il était en contradiction avec le test d'agglutination rapide, c'est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus*, et *Aerococcus* comprenant 26 tests biochimique miniaturisés.

La galerie contient 32 cupules dont 26 sont utilisés comme cupules tests contenant chacune un milieu réactionnel déshydraté. (Voir annexe 3 : composition de la galerie et tableau de lecture)

Mode opératoire

Nous préparons un inoculum de 0,5 Mc Farland à partir d'une culture pure et préférentiellement jeune dont on recherche l'identification, puis nous ensemençons la galerie en disposant 55µl de suspension par cupule avec une pipette.

Une fois l'ensemencement terminé, nous recouvrons les tests URE (urée), ADH (L-arginine), et ODC (L-ornithine) avec deux gouttes d'huile de paraffine, puis nous incubons la galerie à 37 °C pendant 24 h (plus ou moins 2 h) en aérobie.

Lecture

Nous révélons toutes les réactions de la rangée 0 en ajoutant 1 goutte des réactifs suivants :

- Pour le test NIT (nitrate), les réactifs : Nit 1 et Nit 2.
- Pour le test VP (sodium pyruvate), les réactifs : VP 1 et VP 2.
- Pour le test β Gal (2-naphtyl-βD galactopyranoside) à Pyr A (acide pyroglutamique β-naphtylamide), le réactif FB, ou Zym A et Zym B.

Après 5 à 10 minutes, nous interprétons les résultats en se reportant au tableau de lecture (annexe3).

Pour finir nous codons les réactions obtenues en un profil numérique, grâce à une fiche d'identification appelée "chéquier" fourni avec la galerie. L'identification est obtenue avec le logiciel d'identification : Api Web, dans lequel nous entrons le profil numérique, nous obtenons alors notre identification avec un pourcentage de fiabilité.

2-3 Etude de la résistance aux antibiotiques

2-3-1 L'antibiogramme selon la technique du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

Après avoir confirmé que c'est bien un *S.aureus*, nous testons sa sensibilité aux antibiotiques, selon les recommandations de la standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale (Rahal 2005) qui préconise la méthode suivante :

A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, nous raclons à l'aide d'une anse platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, puis nous déchargeons l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% et nous homogénéisons la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625nm. Nous pouvons ajuster l'inoculum en ajoutant soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

Puis nous ensemençons en trempant un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, nous l'essorons fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum, puis nous frottons l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrés.

Nous répétons cette opération deux fois, en tournant la boîte de 60°C à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, et nous finissons en passant l'écouvillon une dernière fois sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où nous ensemençons plusieurs boîtes de Pétri, nous devons recharger l'écouvillon à chaque fois.

Il est conseillé d'ensemencer les boîtes sans dépasser les 15 minutes après la préparation de la dilution

Une fois l'ensemencement terminé, nous appliquons les disques d'antibiotiques testés pour la résistance du *S.aureus* en prenant bien soin d'espacer les disques de 24mm, centre à centre, nous aurons ainsi 3 boîtes de pétri où seront disposés les disques d'antibiotiques suivants Pénicilline, Oxacilline, Céfoxitine, Gentamicine, Kanamycine, Erytromycine, Clindamycine ou Lincomycine ; Pristinamicine ; Ofloxacin ; Vancomycine ; Teicoplanine ; Rifampicine ; Fosfomycine, Cotrimoxazole, Acide fucidique, Tétracycline et la Mupirocin (pour les souches de portage)

Nous incubons les boîtes 18 heures à 35°C

Le disque de d'oxacilline est placé dans une boîte à part qui sera incubée à 30°C pendant 48h, avec une première lecture à 24h.

Nous devons nous assurer que les disques d'Erytromycine et de Lincomycine sont placés côte à côte afin de vérifier l'existence d'une résistance inductible, cette résistance se manifestera par un angle droit au niveau de la zone d'inhibition.

La lecture des boîtes

Elle se fait le lendemain, nous mesurons les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse, et comparons ces diamètres aux valeurs critiques figurant dans le tableau de l'annexe 4.

2-3-2 Recherche de la résistance des Staphylocoques à l'oxacilline :

La résistance des Staphylocoques à l'oxacilline est recherchée en utilisant:

2-3-2-1 Le disque d'oxacilline

Le disque d'oxacilline (5µg) est appliqué dans les conditions standards citées auparavant, après 24h d'incubation à 30°C, nous lisons les diamètres d'inhibition une première fois et les comparons aux valeurs critiques, si la souche est sensible, nous réincubons la boîte. Si le lendemain, le diamètre a diminué, et il y a apparition d'une double zone avec des microcolonies à l'intérieur de la zone d'inhibition, la souche sera identifiée comme résistante hétérogène.

2-3-2-2 Le disque de cefoxitine

Le disque de cefoxitine (30µg) est appliqué dans les conditions standards citées auparavant, puis après 24h selon les valeurs critiques, si le diamètre est $\leq 19\text{mm}$, la souche est dite résistante à l'oxacilline, alors que si il est $>20\text{mm}$, la souche est dite sensible à l'oxacilline.

2-3-2-3 Le test de screening à l'oxacilline

Nous utilisons une gélose MH additionnés de 4% de NaCl et 6µg/ml d'oxacilline
(Voir Annexe 5 : la préparation de la dilution d'oxacilline)

Nous ensemençons par spot, en appliquant verticalement sur la gélose l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne à 0,5 McFarland.

Nous devons également tester les souches de référence dans les mêmes conditions.

La lecture se fait après 24h et 48h d'incubation à 30°C en atmosphère normale, la culture de plus d'une colonie de la souche à tester suffit pour indiquer une résistance à l'oxacilline, impliquant une résistance à toutes les β lactamines (Rahal 2005).

2-3-2-4 La mise en évidence de La PLP 2a (ou PBP 2')

La recherche de la PLP 2a doit se faire systématiquement devant toute infection sévère à *Staphylococcus sp* (c'est un test rapide), pour les *S.aureus* isolés d'infection non sévère, la recherche de la PLP 2a ne se fera que s'il y a discordance avec les résultats obtenus au niveau des tests précédents.

Principe

C'est un kit commercialisé (Oxoid) qui contient des particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal dirigé contre la PLP 2a qui vont réagir après extraction spécifiquement avec les MRSA entraînant l'apparition d'une agglutination visible à l'œil nu.

Les souches MSSA n'agglutinent pas les particules de latex.

Mode opératoire

Pour l'extraction, nous mettons 4 gouttes du réactif d'extraction 1 dans un tube pour microcentrifugeuse, dans lequel nous déchargeons 3 öses pleines de cultures à tester (öses calibrés de 1µl), nous refermons les tubes et les mettons au bain marie à 95 °C pendant 3 minutes.

Après avoir laissé les tubes refroidir à température ambiante, nous ajoutons une goutte du réactif d'extraction 2, nous homogénéisons puis centrifugeons à 1500 g pendant 5 minutes.

L'agglutination se fait à partir du surnageant (50 µl) auquel nous ajoutons une goutte de latex sensibilisé (par un anticorps monoclonal anti PLP 2a), et nous émulsionnons le tout à l'aide d'un bâtonnet, en étalant le mélange sur toute la surface.

Nous répétons cette technique d'agglutination pour le latex contrôle négatif.

Pour finir, nous donnons à la carte sur laquelle se fait l'agglutination des mouvements rotatifs pendant 3 minutes.

Si une agglutination apparaît uniquement sur le latex contrôle positif, nous qualifierons la souche testée comme MRSA.

2-4 La conservation des souches

Nous conservons automatiquement toutes les souches identifiées comme *S.aureus*, de plus nous utilisons pour chaque souche deux méthodes de conservation :

- la première, est la conservation sur tubes contenant de la gélose de conservation, dans laquelle nous ensemençons la souche (culture pure) par piqûre centrale, la durée de conservation est de 6 mois à 1 an.
- La deuxième est la méthode de congélation sur bille à -20°C, elle se fait sur des cryotubes contenant un bouillon de culture avec 10% de glycérol (cryoconservateur) et qui contient une vingtaine de petites billes, sur lesquelles la souche adhère. Nous devons ensemencer richement le tube (jusqu'à ce que le milieu devienne trouble) puis après agitation, nous aspirons tout le bouillon du tube avec une pipette, il ne restera ainsi dans le tube que les billes sur lesquelles la souche aura adhéré. Cette méthode est avantageuse lors de la décongélation, car il suffira de retirer à chaque fois une bille, sans décongeler le tube en entier. Cette méthode a une durée de conservation plus longue, 10 ans et plus en ce qui concerne le *S.aureus*

2-5 Identification moléculaire

L'étude moléculaire s'est faite au centre national de référence (CNR) des staphylocoques en France à Lyon où nous avons passé 4 semaines afin de nous initier et de participer aux manipulations.

Cette étude s'est faite entre Mai 2007 et Septembre 2007, elle a porté sur 120 souches choisies au hasard parmi notre collection citée auparavant.

Nous nous sommes limités pour une première étude moléculaire de ces souches à la recherche des gènes suivants :

- Le gène de la gyrase de *S. aureus* (*gyrA*) à fin de confirmer l'espèce : *Staphylococcus aureus*
- Le gène de résistance à la méticilline (*mecA*)
- Les gènes des allèles 1 à 4 du système de régulation *agr* (accessory gene regulator)
- Et les gènes codant pour les toxines staphylococciques suivantes : les entérotoxines (*sea, seb, sec, sed, seh, sek, sel, sem, seo, sep, seq et ser*), les exfoliatines (*eta, etb et etd*), la leucocidine M (*lukM*), la leucocidine de Panton et Valentine (*lukSF-PV*), l'hémolysine β (*hly*), la toxine du choc toxique staphylococcique (*tst*), et les facteurs d'inhibition de la différenciation des cellules de l'épiderme EDIN (*edin*)

Ces gènes ont été recherchés par PCR (Polymérase Chain Réaction) multiplex, c'est-à-dire plusieurs gènes recherchés en même temps dans une même PCR, pour cela le CNR a mis au point huit PCR dans lesquels sont regroupées les différentes amorces des gènes recherchés selon leur affinité ou selon la taille des gènes.

Les huit PCR sont présentées en annexe 6.

En ce qui concerne la méthode, nous avons partagé notre travail en 4 parties essentielles : la préparation des souches, afin de revivifier et contrôler la pureté des souches envoyées, puis l'extraction de l'ADN, viennent ensuite l'amplification des gènes recherchés et leurs détection par électrophorèse sur gel d'agarose.

2-5-1 La préparation des souches

Nous avons isolé les souches à étudier sur gélose P (annexe 1), c'est une gélose enrichie mise au point par le CNR afin de mieux observer les caractères morphologique de la souche. Après 24 à 48h d'incubation à 37 °C, les colonies vont apparaître plus grande que sur une simple gélose nutritive jusqu'à 4mm de diamètre, leur pigmentation sera bien distincte cela nous permet d'identifier si une éventuelle souche est dissociée c'est-à-dire qu'elle contient deux souches différentes.

2-5-2 L'extraction de l'ADN

L'extraction de L'ADN a été mise au point par le CNR et se fait de la façon suivante :

2-5-2-1 Lyse des souches

Après nous être assuré de la pureté des souches sur gélose P, nous ensemençons un bouillon coeur cervelle avec une strie de colonies et l'incubons une nuit à 37°C ou 2 à 3 heures au bain marie à 37°C sous agitation.

Après cela nous agitons au vortex puis transvasons stérilement le bouillon de culture dans un tube à centrifuger conique et centrifugeons 10 minutes à 3000 tours/minute. Nous devons en parallèle contrôler la pureté du bouillon sur une gélose P.

Une fois la centrifugation terminée, nous rejetons le surnageant dans un flacon auquel nous ajoutons de l'eau de javel, puis nous reprenons le culot avec 500 µl de TE (Tris EDTA), nous homogénéisons et transvasons à la pastette ou avec un cône à filtre dans un tube Eppendorf de 1,5 ml préalablement numéroté. A ce mélange nous ajoutons 10 µl de Lysostaphine (afin de lyser la paroi cellulaires), puis agitons au vortex et incubons 40 min à 60 min au bain-marie à 37°C.

Quand le milieu s'éclaircit et devient visqueux (formation d'un filament entre le bouchon et le tube à l'ouverture de celui-ci), nous stoppons l'incubation et ajoutons 5 µl de protéinase K (qui

accentue la lyse de la paroi cellulaire), nous agitions encore une fois au vortex et réincubons 60 min minimum à 50°C au bain-marie.

Après cette étape il est possible, soit de congeler les tubes à – 20°C, soit de passer à l'extraction.

2-5-2-2 L'extraction

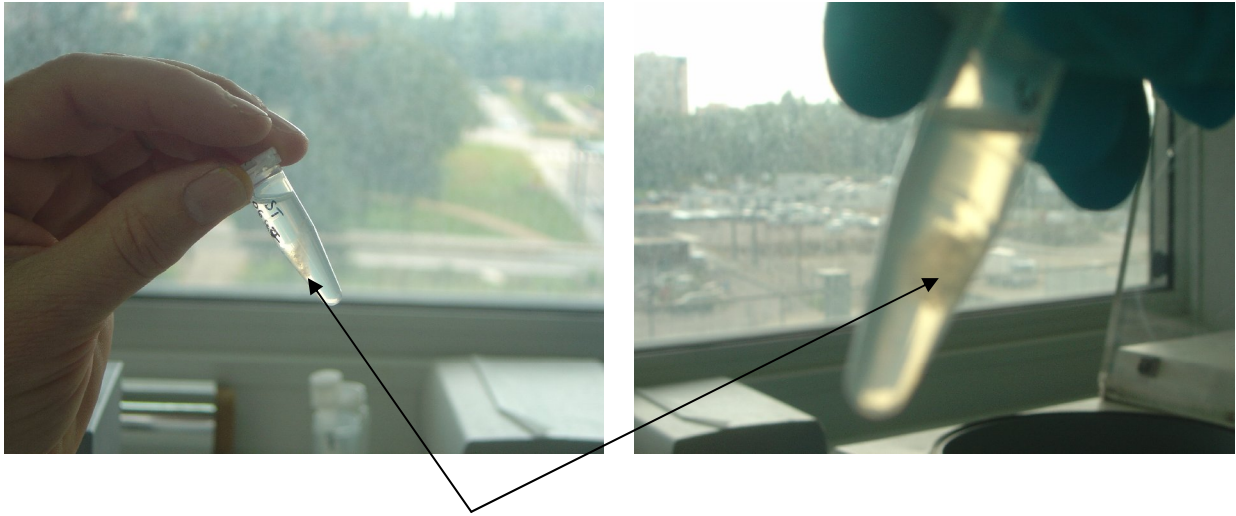
Une fois les souches lysées, nous leur ajoutons 500 µl de Phénol / Chloroforme / Alcool iso amylique, nous agitions vigoureusement au vortex jusqu'à obtenir un mélange laiteux puis centrifugeons 15 min à 10000 tours / min. Nous obtenons ainsi 3 phases : la phase supérieure qui contient l'ADN, l'interphase qui contient des protéines et la phase inférieure qui contient le Phénol-chloroforme.

Nous prélevons délicatement la phase supérieure (sans l'interphase) à la pipette munie d'un cône à filtre et la déposons dans un nouvel eppendorf, auquel nous ajoutons 500 µl de Chloroforme / Alcool iso amylique, puis nous homogénéisons (par retournement et au vortex) jusqu'au mélange des 2 phases.

Nous centrifugeons à nouveau 15 min à 10000 tours / min puis nous prélevons la phase supérieure sans aller jusqu'à l'interphase et la transférons dans une nouvelle série de tubes, ensuite nous centrifugeons une deuxième fois pendant 5 min à 10000 tours / min. (étape non obligatoire) et reprélevons le surnageant que nous mettons dans la série de tubes pour conservation.

En dernier, nous précipitons l'ADN par de l'éthanol absolu conservé à -20°C et mélangeons délicatement par retournement jusqu'à l'apparition d'une pelote d'ADN.

Pour finir de précipiter l'ADN, nous mettons les tubes à – 20°C au minimum 15 minutes ou plusieurs heures (ils peuvent attendre plusieurs jours à ce stade).



Pelote d'ADN formée

Figure 12 : Précipitation de l'ADN

Enfin, nous centrifugeons 5 min à 7000 tours ou 10 000 tours/min, et éliminons le surnageant soit par retournement si le culot est bien accroché soit avec une pipette, puis nous laissons sécher environ 30 min à température ambiante ou à l'étuve .

2-5-2-3 Dilution des ADN pour la PCR.

Nous reprenons le culot dans 100 μ l d'eau distillée stérile et nous le laissons dissoudre au moins 30 min au bain-marie entre 50 et 60°C.

Nous obtenons ainsi de l'ADN pur que nous diluons au 1/100 en passant par une première dilution au 1/10 (90 μ l d'eau + 10 μ l d'ADN pur), puis une deuxième dilution au 1/10 (180 μ l d'eau + 20 μ l d'ADN dilué au 1/10).

C'est la dilution au 1/100 que nous utilisons pour réaliser les PCR, dans le cas où la bande apparaît trop faiblement lors de la révélation, nous reprenons la PCR avec une dilution plus forte (1/10).

Les dilutions d' ADN sont conservées à + 4°C, ils sont ensuite rangées (ADN pur, dilutions 1/10 et 1/100) dans des boîtes de conservation au congélateur à -20°C. Après un délai d'une année, seul l'ADN pur est conservé.

2-5-3 L'amplification

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

2-5-3-1 Préparation des mélanges réactionnels (MIX)

Chaque PCR doit contenir les réactifs suivant : du tampon 10X sans MgCl₂ (tampon spécial pour PCR), de l'MgCl₂, des désoxyribonucléotides(DNTP), de l'eau PPI (Pour Préparation Injectable), l'enzyme Taq polymérase et les amorces appropriées à chaque gène recherché (Les amorces utilisées sont présentées en annexe 7).

Tous ces réactifs sont mélangés avec des proportions différentes selon les amorces utilisées, ces derniers sont présentés en annexe 8.

Le mélange réactionnel peut être préparé plusieurs semaines à l'avance sans addition de la Taq, celle-ci est de préférence ajoutée juste avant l'amplification mais elle peut toutefois être conservée quelques jours dans le mélange réactionnel.

Les numéros de lots ainsi que les dates de dilution des différents réactifs doivent être mentionnés lors de chaque utilisation.

Le mélange réactionnel est réparti dans les tubes à essai, à raison de 35 ou 45 µl.

2-5-3-2 Amplification de l'ADN

Nous utilisons 5µl d'ADN dilué au centième extrait de la souche étudiée et 35 à 45 µl du mélange réactionnel.

L'amplification est réalisée au niveau d'un thermocycleur et elle dure un peu plus d'une heure, dans les conditions suivantes : une étape de chauffage à 94 °C pendant 5 min suivie de 25

cycles répétés comportant chacun une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant une minute puis est terminée par une dernière étape de chauffage à 72°C pendant 7 min.

Chaque PCR comportera :

- Un témoin négatif : sans ADN, c'est-à-dire contenant uniquement le mélange réactionnel.
- Un témoin positif contenant un mélange de plusieurs ADN porteur des gènes à rechercher, c'est à dire plusieurs ADN dilué au 1/100^e préparé à partir de souches de références contenant les gènes codants les toxines recherchées.

2-5-4 Révélation des fragments amplifiés

L'ADN ainsi amplifié sera révélé par électrophorèse sur gel d'agarose

2-5-4-1 Préparation du gel

Nous utilisons un gel d'agarose d'une concentration de 1,5% dans du tampon TBE (annexe 9) puis, nous chauffons le mélange tampon-agarose au micro-onde jusqu'à obtention d'un liquide limpide auquel nous ajoutons un agent révélateur : le SYBR safe (sensible à la lumière) (annexe 9) à raison de 1µl pour 10 ml de tampon. Une fois que le gel a atteint une température voisine de 55 à 60°C, nous le coulons au niveau du support de l'électrophorèse, ensuite il faudra attendre au moins 30 minutes pour que le gel se solidifie totalement avant de déposer les amplifiats.

Un volume de 30 ml de tampon est nécessaire pour les petits gels (8 puits) et de 80 ml pour les plus grands (14 à 20 puits).

Nous devons faire attention à la déformation des supports de gel si la température de celui-ci est trop élevée.

Nous devons également éviter la formation de bulles d'air lors du coulage du gel.

2-5-4-2 Dépôts des amplifiats et migration

Nous déposons dans chaque puits 8 μ l d'amplifiats mélangés à un traceur, le loading (traceur) (annexe 9). La migration se fera à 130 volts pour une durée de 20 à 40 min selon la taille des fragments d'ADN (quand la taille des fragments à révéler est proche, la migration doit durer plus longtemps à fin de mieux les séparer) et de la taille du gel (plus le gel est petit (8 puits), plus la migration est courte, afin que la bande à détecter ne sorte pas du gel et soit éluée dans le tampon).

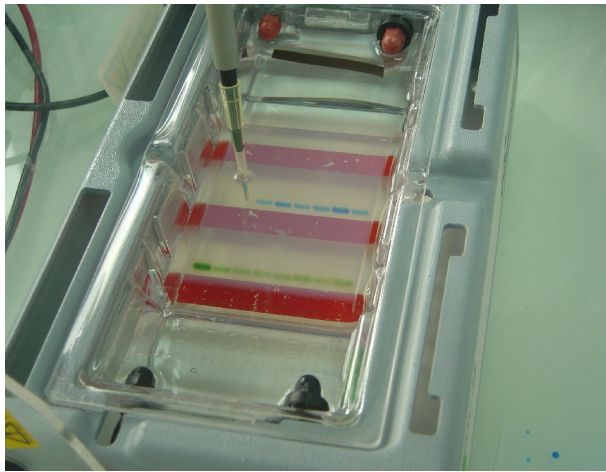


Figure 13 : Dépôts des amplifiats dans le gel

2-5-5 Révélation des amplifiats

Une fois la migration terminée, les produits de PCR ainsi séparés vont être lu grâce à un appareil de transillumination couplé à appareil photo caméra (voir image ci dessous)



Figure 14 : Appareil photo caméra, qui sert à révéler les bandes après amplification

Une fois les amplifiats révélés, nous interprétons alors les résultats en comparant la taille des fragments révélés avec ceux du témoin positif, un exemple d'interprétation de chaque PCR est apporté ci-dessous (en rappelant que les gènes recherchés sont regroupés selon leur affinité et poids moléculaire dans huit PCR)

Exemple 1 : Amplification des gènes *mec A* et *gyr A* regroupés au niveau de la PCR double

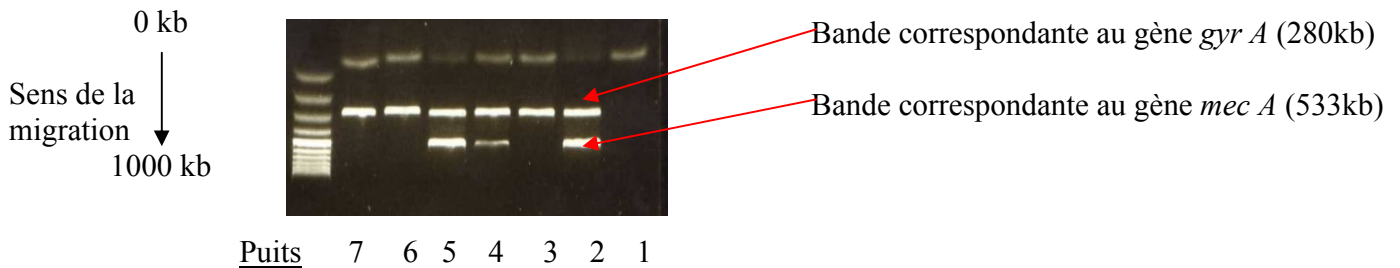


Figure 15 : Photo de la PCR des gènes *MecA* et *Gyr A*

Puit 1 : Aucune bande n'apparaît (témoin-)

Puit 2 : Les 2 bandes correspondantes aux 2 gènes recherchés apparaissent (témoin+)

Puit 3, 6, 7 : Nous constatons dans chacun de ces puits la présence d'une bande ayant le même poids moléculaire que le gène *mec A* donc chacune de ces souches contient ce gène.

Puit 4,5 : Nous constatons dans chacun de ces puits la présence de 2 bandes ayant le même poids moléculaire que les gènes *mec A* et *gyrA* donc chacune de ces souches contient les gènes *mecA* et *gyrA*

Tableau 4 : Résultat de la PCR des gènes *mecA* et *gyrA*

Emplacement des souches	<i>mecA</i> (533kb)	<i>gyrA</i> (280kb)
Puit 1 : Témoin négatif	-	-
Puit 2 : Témoin positif	+	+
Puit 3 : Souche 1	-	+
Puit 4 : Souche 2	+	+
Puit 5 : Souche 3	+	+
Puit 6 : Souche 4	-	+
Puit 7 : Souche 5	-	+

Exemple 2 : Amplification des gènes *agr* de type 1,2,3,4 regroupés au niveau de la PCR *agr*

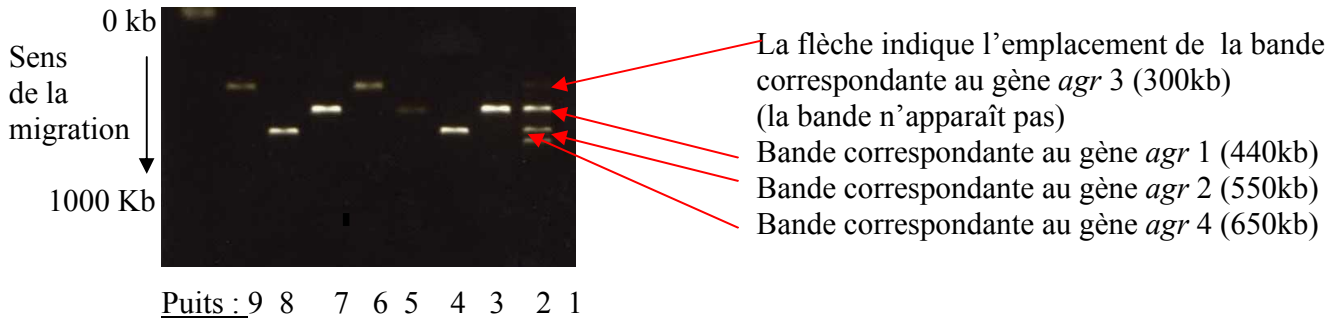


Figure 16 : Photo de la PCR des gènes *agr*

Puit 2 : C'est le témoin positif, mais seulement 3 bandes apparaissent, la 4^{ème} bande correspondante au gène *agr 3* n'est pas apparue.

Puit 3,5 et 7 : Dans chacun de ces puits une bande ayant le même poids moléculaire que l'*agr1* apparaît

Puit 4 et 8 : Dans chacun de ces puits une bande ayant le même poids moléculaire que l'*agr2* apparaît

Puit 6 et 9 : Dans chacun de ces puits une bande ayant le même poids moléculaire que l'*agr 3* apparaît.

Tableau 5 : Résultat de la PCR des gènes *agr 1,2,3 et 4*

Emplacement des souches	<i>agr 4</i> (650 kb)	<i>agr 2</i> (550 kb)	<i>agr1</i> (440 kb)	<i>agr3</i> (300 kb)
Puit 1 : Témoin négatif	-	-	-	-
Puit 2 : Témoin positif	+	+	+	-
Puit 3 : Souche 1	-	-	+	-
Puit 4 : Souche 2	-	+	-	-
Puit 5 : Souche 3	-	-	+	-
Puit 6 : Souche 4	-	-	-	+
Puit 7 : Souche 5	-	-	+	-
Puit 8 : Souche 6	-	+	-	-
Puit 9 : Souche 7	-	-	-	+

Exemple 3 : Amplification des gènes *lukM*, *seh*, *sem*, *tst* regroupés au niveau de la PCR 1

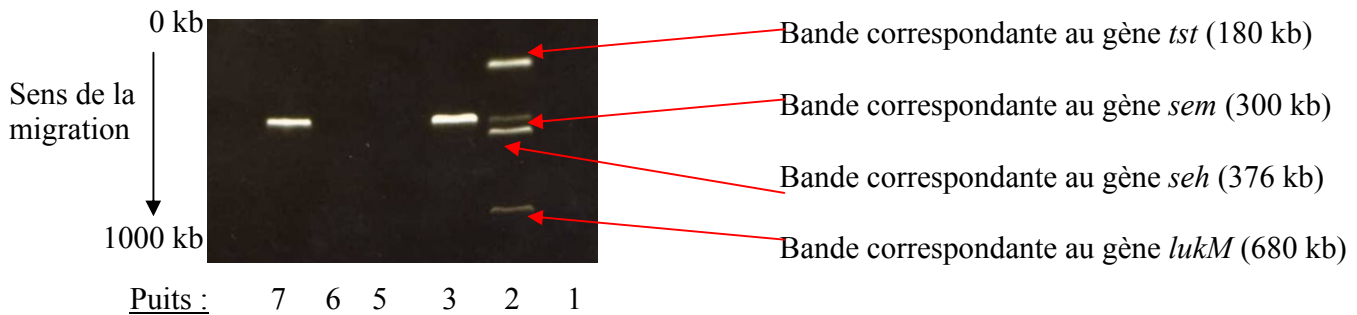


Figure 17 : Photo de la PCR 1

Puit 3 et 6 : Dans chacun de ces puits une bande ayant le même poids moléculaire que le gène *sem* apparaît.

Puit 4,5 et 7 : Aucune bande n'apparaît, ce qui signifie que les souches présentes au niveau de ces puits ne contiennent aucun des gènes recherchés.

Tableau 6 : Résultat de la PCR des gènes *lukM*, *seh*, *sem*, *tst*

Emplacement des souches	<i>lukM</i> (780kb)	<i>seh</i> (376kb)	<i>sem</i> (300kb)	<i>tst</i> (180kb)
Puit 1 : Témoin négatif	-	-	-	-
Puit 2 : Témoin positif	+	+	+	+
Puit 3 : Souche 1	-	-	+	-
Puit 4 : Souche 2	-	-	-	-
Puit 5 : Souche 3	-	-	-	-
Puit 6 : Souche 4	-	-	+	-
Puit 7 : Souche 5	-	-	-	-

Exemple 4 : Amplification des gènes *etb*, *sed*, *selr*, *sec*, *eta* regroupés au niveau de la PCR 2

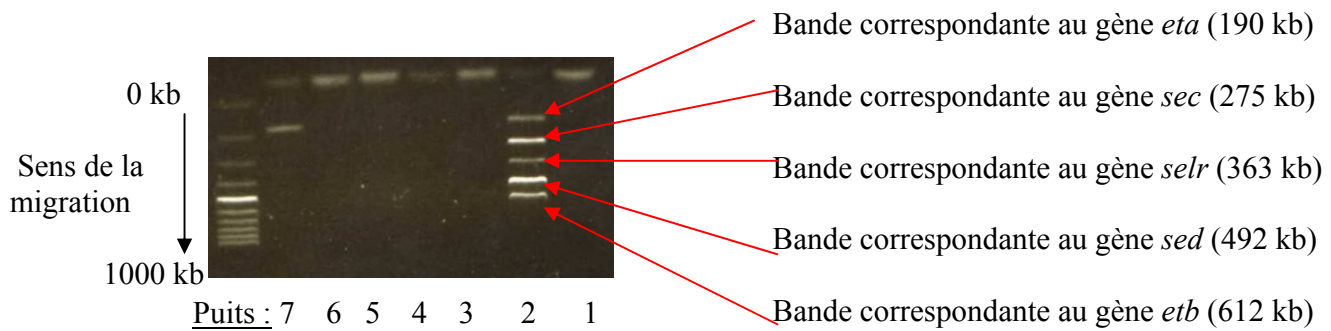


Figure 18 : Photo de la PCR 2

Puit 7 : Une bande ayant le même poids moléculaire que le gène *eta* apparaît

Puit 3, 4, 5, 6 et 7 : Aucune bande n'apparaît, ce qui signifie que les souches présentes au niveau de ces puits ne contiennent aucun des gènes recherchés.

Tableau 7 : Résultat de la PCR des gènes *etb*, *sed*, *selr*, *eta*

Emplacement des souches	<i>etb</i> (612kb)	<i>sed</i> (492kb)	<i>selr</i> (363kb)	<i>sec</i> (275kb)	<i>eta</i> (190kb)
Puit 1 : Témoin négatif	-	-	-	-	-
Puit 2 : Témoin positif	+	+	+	+	+
Puit 3 : Souche 1	-	-	-	-	-
Puit 4 : Souche 2	-	-	-	-	-
Puit 5 : Souche 3	-	-	-	-	-
Puit 6 : Souche 4	-	-	-	-	-
Puit 7 : Souche 5	-	-	-	-	+

Exemple 5 : Amplification des gènes *sea*, *lukPV*, *hlb* *selp* regroupés au niveau de la PCR3

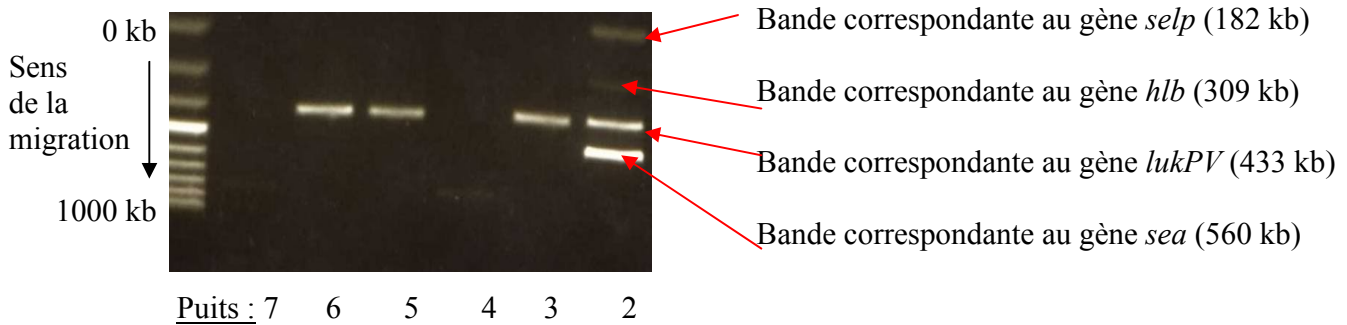


Figure 19 : Photo de la PCR 3

Puit 2 : C'est le témoin positif, mais seulement 3 bandes apparaissent, la 3^{ème} bande correspondante au gène *hlb* n'est pas clairement apparue

Puit 3,5 et 6 : Dans chacun de ces puits une bande ayant le même poids moléculaire que le gène *lukPV* apparaît.

Puit 2 et 5 : Aucune bande n'apparaît, ce qui signifie que les souches présentes au niveau de ces puits ne contiennent aucun des gènes recherchés.

Tableau 8 : résultat de la PCR des gènes *sea*, *lukPV*, *hlb*, *selp*

Emplacement des souches	<i>sea</i> (560kb)	<i>lukPV</i> (433kb)	<i>hlb</i> (309kb)	<i>selp</i> (182kb)
Puit 1 : Témoin négatif	-	-	-	-
Puit 2 : Témoin positif	+	+	-	+
Puit 3 : Souche 1	-	+	-	-
Puit 4 : Souche 2	-	-	-	-
Puit 5 : Souche 3	-	+	-	-
Puit 6 : Souche 4	-	+	-	-
Puit 7 : Souche 5	-	-	-	-

Exemple 6 : Amplification des gènes *seb*, *etv1*, *selq* regroupés au niveau de la PCR 4

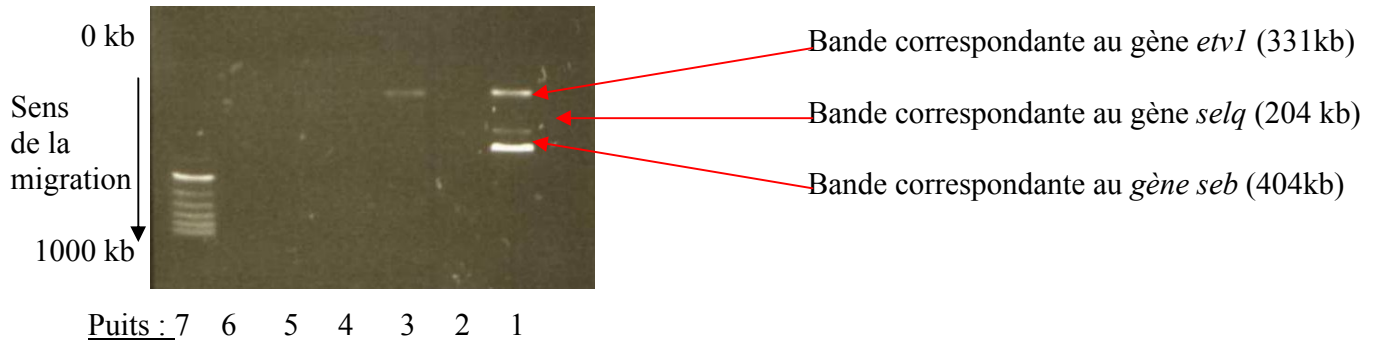


Figure 20 : Photo de la PCR 4

Puit 4 : Une seule bande ayant le même poids moléculaire que le gène *selq* apparaît.

Puit 3, 5,6 et 7 : Aucune bande n'apparaît, ce qui signifie que les souches présentes au niveau de ces puits ne contiennent aucun des gènes recherchés.

Tableau 9 : Résultat de la PCR des gènes *sea*, *lukPV*, *hnb*, *selq*

Emplacement des souches	<i>seb</i> 404kb	<i>etv1</i> 331kb	<i>selq</i> 204kb
Puit 1 : Témoin négatif	-	-	-
Puit 2 : Témoin positif	+	+	+
Puit 3 : Souche 1	-	-	-
Puit 4 : Souche 2	-	-	+
Puit 5 : Souche 3	-	-	-
Puit 6 : Souche 4	-	-	-
Puit 7 : Souche 5	-	-	-

Exemple 7 : Amplification des gènes *etd*, *sel*, *seo* regroupés au niveau de la PCR 5

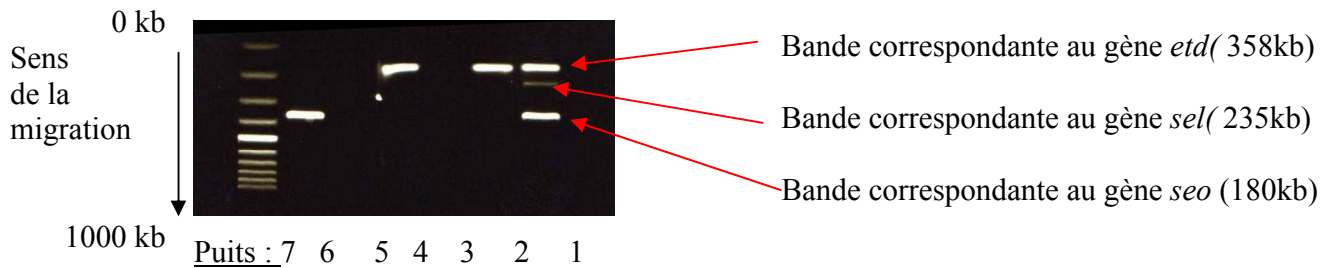


Figure 21 : Photo de la PCR 5

Puit 3 et 5 : Dans chacun de ces puits une bande ayant le même poids moléculaire que le gène *seo* apparaît.

Puit 4,6 : Aucune bande n'apparaît, ce qui signifie que les souches présentes au niveau de ces puits ne contiennent aucun des gènes recherchés.

Puit 7 : Une seule bande ayant le même poids moléculaire que le gène *etd* apparaît.

Tableau 10 : Résultat de la PCR des gènes *etd*, *sel*, *seo*

Numéro de la souche	<i>etd</i> (355kb)	<i>sel</i> (235kb)	Seo (180kb)
Puit 1 : Témoin négatif	-	-	-
Puit 2 : Témoin positif	+	+	+
Puit 3 : Souche N°1	-	-	+
Puit 4 : Souche N°2	-	-	-
Puit 5 : Souche N°3	-	-	+
Puit 6 : Souche N°4	-	-	-
Puit 7 : Souche N°5	+	-	-

Exemple 8 : Amplification des gènes *etd*, *sel*, *seo* regroupés au niveau de la PCR 6

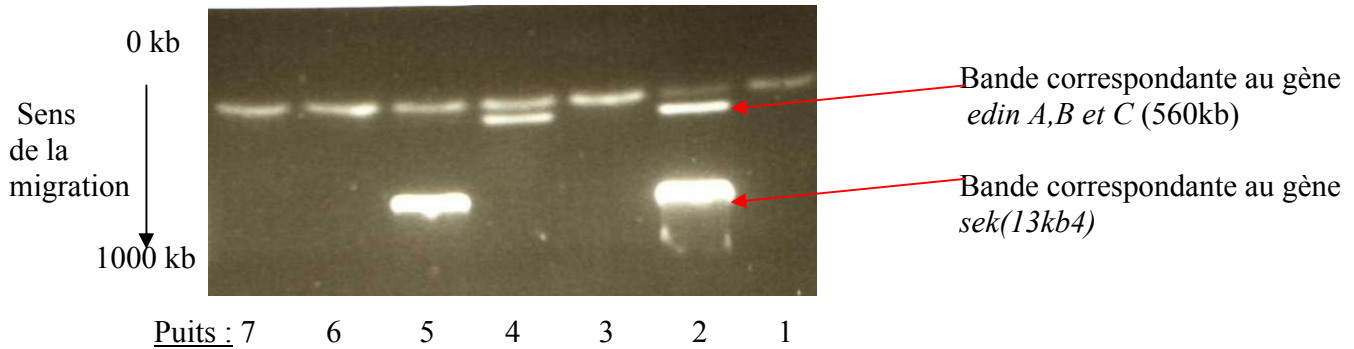


Figure 22 : Photo de la PCR 6

Puit 4 : Une bande ayant le même poids moléculaire que le gène *sek* apparaît

Puit 5 : Une bande ayant le même poids moléculaire que les gènes *edin A,B,C* apparaît

Puit 3,6 et 7 : Aucune bande n'apparaît, ce qui signifie que les souches présentes au niveau de ces puits ne contiennent aucun des gènes recherchés.

Tableau 11 : Résultat de la PCR des gènes *edin A,B,C* , *sek*

Numéro de la souche	<i>edin A,B,C</i> (560kb)	<i>sek</i> (134kb)
Puit 1 :Témoin négatif	-	-
Puit 2 :Témoin positif	+	+
Puit 3 : Souche N°1	-	-
Puit 4 : Souche N°2	-	+
Puit 5 : Souche N°3	+	-
Puit 6 : Souche N°4	-	-
Puit 7 : Souche N°5	-	-

2-6 L'étude de portage nasal

Pour des raisons matérielles nous n'avons pu mener cette étude qu'en Janvier 2008. Elle s'est déroulée au niveau du service de dermatologie, service à haut risque où nous avons recensé une prévalence d'infections à *S.aureus* et à SARM très importante.

Cette étude de dépistage s'intègre dans notre stratégie préventive, afin d'identifier les porteurs de *S.aureus* et de SARM (importants disséminateurs) et d'instaurer ainsi des règles préventives pour essayer de diminuer la circulation des souches.

Ce dépistage s'est déroulé sur 4 mois en ciblant les patients entrants, les patients déjà hospitalisés et le personnel soignant.

Nous avons également établi un deuxième questionnaire de dépistage pour le portage cette fois, en posant un certain nombre de questions à chaque personne qui a bien voulu se soumettre à notre étude. Les questions portaient sur un certain nombre de facteurs de risque tels que l'âge, les antécédents d'hospitalisation, les patients porteurs de plaie cutanée infectée à l'admission (à l'exception des plaies chirurgicales), les personnes ayant déjà fait des infections à *S.aureus* ou à SARM, les conditions de vie en promiscuité, les patients ayant des pathologies chroniques...(voir le questionnaire portage en annexe 2)

2-6-1 Méthode de prélèvement et d'identification

Le prélèvement recommandé pour le dépistage est le prélèvement nasal, car les fosses nasales antérieures sont des sites préférentiels de cette bactérie, et que la fréquence cutanée dépend du portage nasal (Nguyen Van 2006).

Les prélèvements ont été obtenus à l'aide d'un écouvillon non pré humidifié que nous introduisons soigneusement et profondément dans les deux narines et tournons délicatement sur lui même plusieurs fois. Nous ensemençons directement les prélèvements sur les milieux Chapman, GSF (gélose au sang frais) sans antibiotiques pour l'isolement de *S. aureus* et

Chapman et GSF additionné de 4µg/ml d' oxacilline (voir leur préparation en annexe 5), ces deux derniers étant des milieux sélectifs pour les *S.aureus* résistants à la méticilline (SARM).

Une fois les prélèvements ensemencés, nous les incubons systématiquement pendant 48 heures afin de mieux les examiner. Puis nous repiquons les colonies suspectes de staphylocoques en prélevant 3 à 4 colonies de même morphologie dans une même boîte, sur GSF (afin de ne pas manquer le *S. aureus*) ensuite après une deuxième incubation, nous les identifions selon les techniques sus citées.

Une fois les souches identifiées, nous recherchons la résistance aux antibiotiques ainsi qu'à l'oxacilline, comme citée précédemment.

Chapitre III

Résultats et discussion

1-Analyse des souches isolées à partir des infections à *S.aureus*

1-1 Infections à *S.aureus* en fonction des services

Nous avons récolté au total 700 souches isolées à partir de 663 patients, 352 souches étant d'origine communautaires et 311 étant d'origine nosocomiales. Le tableau suivant illustre la répartition de ces souches selon les différents services de l'hôpital.

Tableau 12 : Répartition des infections selon les services et l'origine des infections

Services	Communautaires		Nosocomiales		Total	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombres	Pourcentage
Consultation	224	33,79%	39	5,88%	263	39,67%
Dermatologie	47	7,09%	115	17,35%	162	24,43%
Orthopédie	12	1,81%	27	4,07%	39	5,88%
Chirurgie infantile	19	2,87%	9	1,36%	28	4,22%
Diabétologie	4	0,60%	18	2,71%	22	3,32%
Neurochirurgie	2	0,30%	16	2,41%	18	2,71%
Néonatalogie	8	1,21%	8	1,21%	16	2,41%
Urgences	10	1,51%	6	0,90%	16	2,41%
Réanimation	2	0,30%	13	1,96%	15	2,26%
Pédiatrie	5	0,75%	7	1,06%	12	1,81%
Cardiologie	2	0,30%	9	1,36%	11	1,66%
Gynécologie	1	0,15%	10	1,51%	11	1,66%
Médecine interne	5	0,75%	5	0,75%	10	1,51%
Gastrologie	2	0,30%	7	1,06%	9	1,36%
ORL	1	0,15%	7	1,06%	8	1,21%
Ophtalmologie	1	0,15%	6	0,90%	7	1,06%
Chirurgie	2	0,30%	6	0,90%	8	1,21%
Pneumologie	3	0,45%	3	0,45%	6	0,90%
Service des détenus	2	0,30%	0	0%	2	0,30%
Total	352	53,09%	311	46,91%	663	100

Nous avons isolé des souches responsables d'infections à *S.aureus* quasiment à partir de tous les services de l'hôpital, avec le taux de fréquence le plus élevé au niveau du service de dermatologie (24,43%). Cela s'explique par le fait que *S.aureus* soit majoritairement responsable

d'infections suppuratives de la peau et des tissus mous, qui sont l'apanage de la dermatologie. Les services d'orthopédie, de chirurgie infantile, et de diabétologie, viennent à la suite de ce classement loin derrière la dermatologie. Quant à la fréquence la plus faible, c'est au niveau de la pneumologie et du service des détenus qu'on la retrouve.

Les souches isolées à partir de patients consultants représentent 39,67% des 700 souches, elles sont en majorité (85 %) toutes d'origine communautaire.

En sachant que nous avons principalement classé comme souches communautaires, toute souche isolée à partir de patient n'ayant pas été hospitalisé dans l'année où dont l'hospitalisation est inférieure à 48 h, et n'ayant aucun contact avec un personnel hospitalier ou patient hospitalisé.

En ce qui concerne les souches isolées à l'hôpital, la majorité d'entre elles sont nosocomiales. En revanche dans les services des urgences médicales et chirurgie infantile, nous avons noté une majorité de souches communautaires, ceci est dû aux rares antécédents hospitaliers de ces patients. Ces patients consultent le plus souvent pour drainage de suppurations (abcès, phlegmons).

La figure suivante nous illustre cette répartition

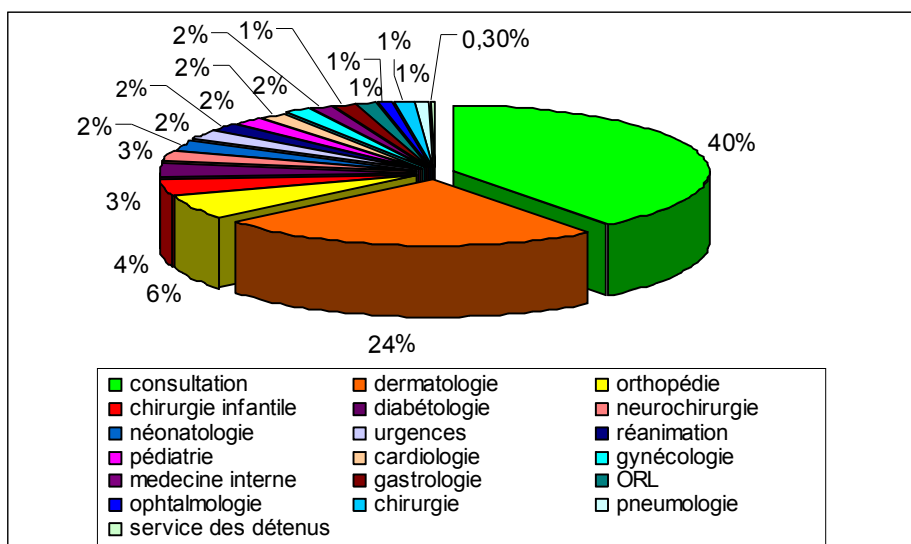


Figure 23 : Répartition des souches en fonction des services

1-2 Infections à *S.aureus* en fonction du sexe et de l'âge

Globalement la répartition des infections par sexe est en faveur d'une légère prédominance masculine ; pour 663 patients, 57,83% sont de sexe masculin.

La répartition par tranches d'âges est un peu plus parlante, le tableau suivant la représente :

Tableau 13 : Répartition des souches par tranches d'âges en fonction de l'origine des infections

Tranches d'ages	Communautaires		Nosocomiales		Total	
	Nombres	Pourcentages	Nombres	Pourcentages	Nombres	Pourcentages
00-10	55	8,30%	27	4,07%	82	12,37%
11-20	36	5,43%	24	3,62%	60	9,05%
21 – 30	73	11,01%	56	8,45%	129	19,46%
31 – 40	55	8,30%	42	6,33%	97	14,63%
41 – 50	53	7,99%	57	8,60%	110	16,59%
51 – 60	27	4,07%	41	6,18%	68	10,26%
61 – 70	24	3,62%	45	6,79%	69	10,41%
71 – 80	17	2,56%	17	2,56%	34	5,13%
81 - 90	8	1,21%	5	0,75%	13	1,96%
91 - 100	1	0,15%	0	0,00%	1	0,15%
Total	349	52,64%	314	47,36%	663	100

Selon la littérature, les infections communautaires touchent l'adulte jeune et l'enfant, alors que les infections nosocomiales sont prédominantes chez les personnes âgées (60 ans et plus) (Naimi et al. 2003), la figure suivante nous illustre mieux le tableau précédent.

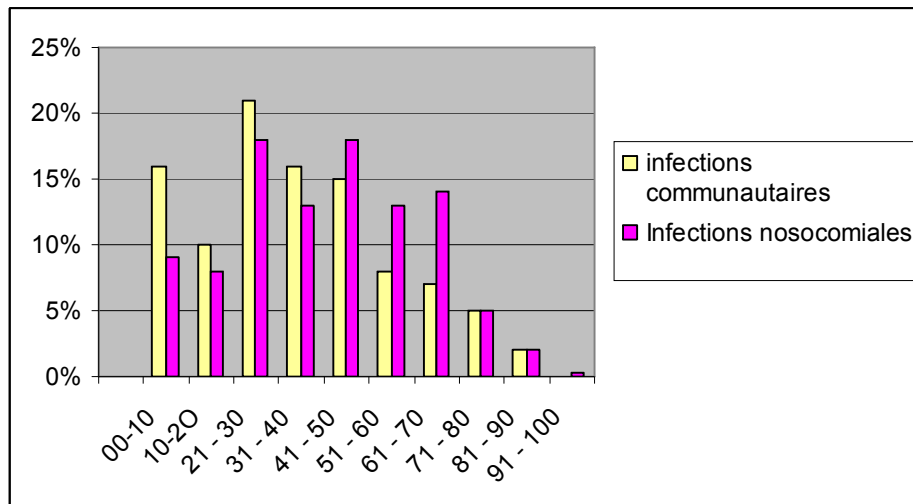


Figure 24: Diagramme représentant les infections communautaires et nosocomiales par rapport aux différentes tranches d'âges.

La fréquence des infections communautaires est majoritaire chez les enfants et les jeunes adultes alors qu'elle diminue chez les sujets âgés, au contraire les infections nosocomiales sont peu fréquentes chez les enfants, et sont plus importantes chez les adultes proches de la soixantaine.

1-3 Les infections à *S.aureus* en fonction des pathologies

Au total nous avons recensé pour 663 patients, 676 cas d'infections à *S.aureus* car certains patients souffraient de deux ou trois infections à la fois.

Le tableau suivant représente les différentes infections à *S. aureus* ainsi que leur origine

Tableau 14 : Répartition et origines des souches de *S.aureus* selon les pathologies

pathologies	Communautaires		Nosocomiales		Total	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
Suppurations	59	9%	45	7%	104	15%
Plaies opératoires	0	0%	74	11%	74	11%
Abcès/phlegmons	59	9%	12	2%	71	11%
Lésions bulleuses	19	3%	34	5%	53	8%
Ulcérations	18	3%	28	4%	46	7%
Furonculoses	38	6%	2	0,30%	40	6%
Pustuloses	12	2%	12	2%	24	4%
Fistules	9	1%	7	1%	16	2%
Pieds diabétiques	5	1%	11	2%	16	2%
Onyxis/Panaris	5	1%	2	0%	7	1%
Infections ORL	54	8%	2	0%	56	8%
Bactériémies	12	2%	27	4%	39	6%
Endocardites	1	0,15%	2	0,30%	3	0,44%
Infections ostéoarticulaires	11	2%	16	2%	27	4%
Arthrites/Ostéoarthrites	4	1%	5	1%	9	1%
Infections bronchiques	7	1%	4	1%	11	2%
Pneumopathies	11	2%	11	2%	22	3%
Infections urinaires	9	1%	5	1%	14	2%
Infections génitales	9	1%	1	0,15%	10	1%
Infections oculaires	3	0%	7	1%	10	1%
Infections du SNC	0	0%	3	0,44%	3	0,44%
Ascites/ péritonite	0	0%	3	0,44%	3	0,44%
Matériels	0	0%	3	0,44%	3	0,44%
Portage nasal	11	2%	4	1%	15	2%
Total	356	53%	320	47%	676	100%

* Les portages figurant dans ce tableau ont été classés parmi les pathologies, car ils ne font pas partie de l'enquête de dépistage, ils ont été réalisés dans un but curatif chez des patients ayant fait une infection à *S.aureus*.

Les infections à *S.aureus* sont très diversifiées, mais on retrouve en première ligne les infections suppuratives cutanées et des tissus mous avec une fréquence de 67 %. Nous retrouvons en majorité dans ces infections les furoncles, les abcès et phlegmon qui sont surtout d'origine communautaire. Les plaies opératoires lesquelles sont aussi importantes, sont d'origine nosocomiale.

Les prélèvements ORL arrive en deuxième position après les infections suppuratives et des tissus mous avec une fréquence de 8 %, ils sont également d'origine communautaire pour la plupart, cela s'explique par le fait que comme les furoncles et les abcès, les otites les angines et les sinusites sont des maladies non profondes, courantes en communauté (Eveillard 2002), toutefois

en ce qui concerne les otites, Naimi et al lors d'une étude comparative entre les SARM-H et les SARM-C les avaient retrouvées plus prédominantes en milieu nosocomial (Naimi et al. 2003).

Nous avons aussi isolé des infections graves, telles que les bactériémies qui sont en troisième position avec un taux de 6 %, la plupart sont d'origine nosocomiale. Les différentes voies d'abord ainsi que les pathologies cutanées en sont sûrement la cause. On retrouve également des infections ostéoarticulaires, des pneumopathies et fait plus rare, nous avons isolé trois *S.aureus* responsables d'endocardites infectieuses.

La figure suivante nous illustre mieux la fréquence de ces groupes d'infections.

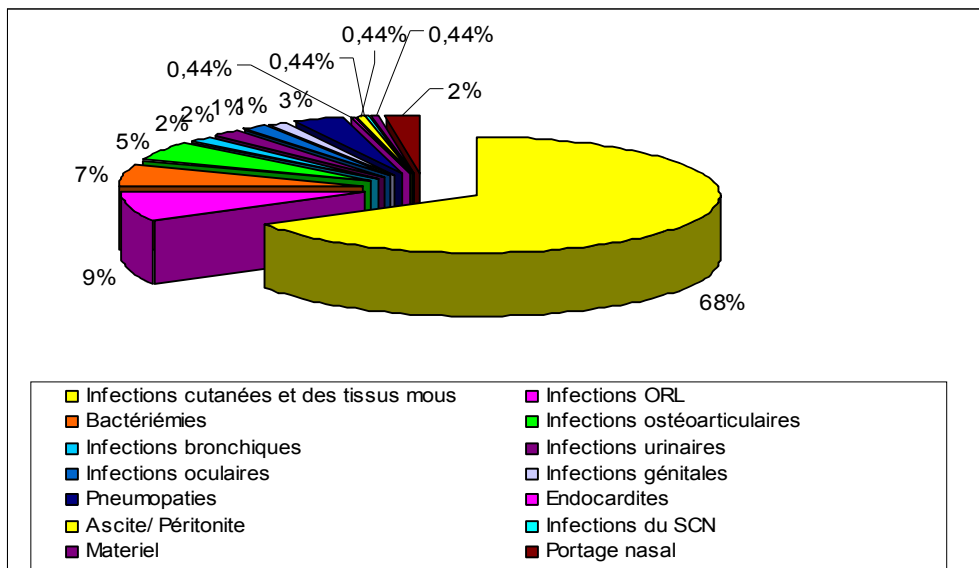


Figure 25 : Fréquence des infections à *S.aureus*

1-3-1 Fréquence des pathologies par rapport au sexe

Lors de notre analyse, nous avons remarqué que certaines pathologies touchaient particulièrement un sexe par rapport à l'autre, c'est le cas notamment des furonculoses, où une prédominance féminine est retrouvée dans 65,8 % des cas. Nous avons retrouvé chez la plupart de ces femmes l'utilisation de rasoir comme procédé d'épilation, ce qui pourrait être un facteur de risque. Rappelons que le furoncle, est une infection du follicule pilo-sébacé, et donc l'utilisation de rasoir contaminé associé à un manque d'hygiène est un moyen facile de contamination et de dissémination de l'infection.

Nous constatons aussi, au niveau des abcès et phlegmons une prédominance masculine de 67,6 %, nous pensons que cela est lié aux traumatismes qui précèdent ce type d'infection. Les personnes de sexe masculin étant plus souvent sujet à ces traumatismes.

2-Analyse de la résistance

2-1 Fréquence des *S.aureus* résistant à la méticilline (SARM)

La fréquence des SARM est de 42 % (291/700) ce taux est croissant, si on compare par rapport aux années précédentes, entre 2003 et 2004, il était de 33,2% (Ramdani et al. 2006), en 2005 et 2006, il était respectivement de 40 % et 46,7 % selon les rapports du réseau de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Cependant nous n'avons pas de détails quant aux types d'infections (prélèvements) recrutés ni aucun renseignement démographique concernant ces données.

La figure suivante nous illustre la fréquence globale des SARM retrouvée lors de notre étude, ainsi que leur répartition dans chacun des deux milieux communautaire et hospitalier. (Le tableau représentant cette figure est en annexe 10).

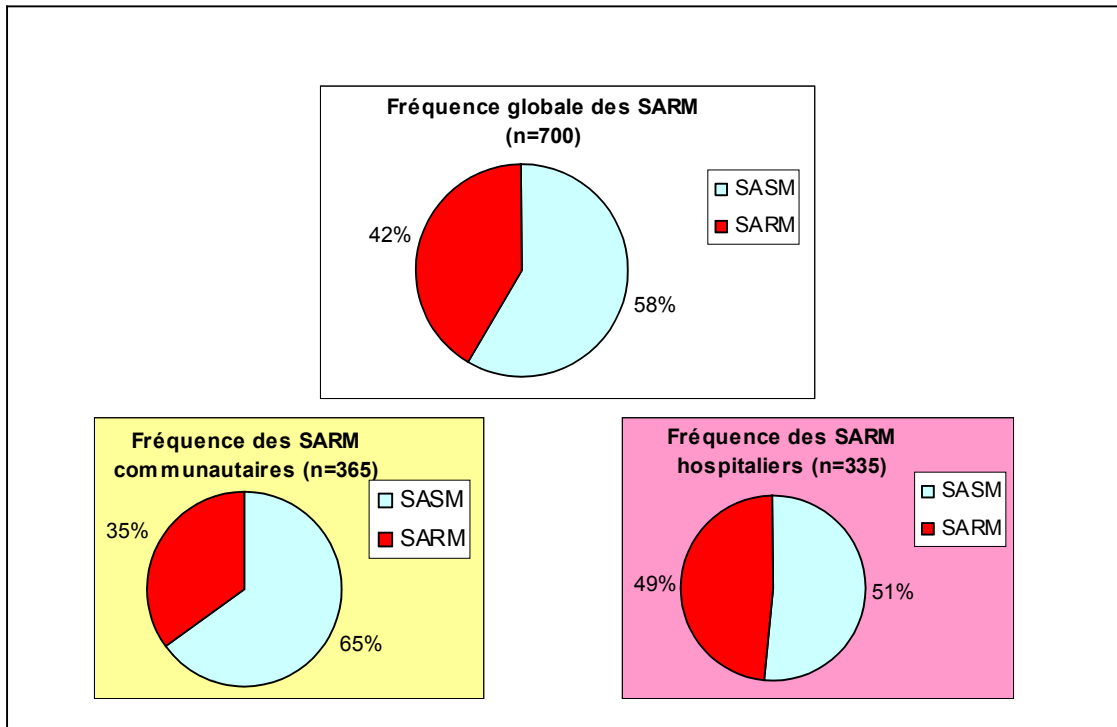


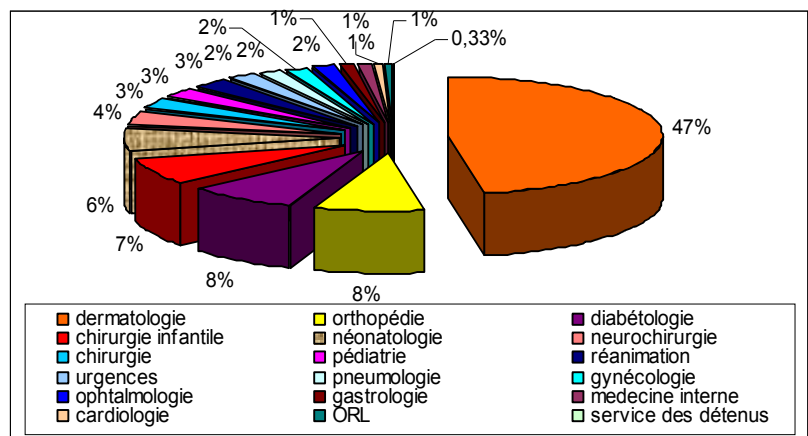
Figure 26 : Fréquence globale des SARM, et leur répartition dans les infections communautaires et nosocomiales

Le taux de SARM en communauté est de 35 % (128/365), c'est un taux élevé qui reflète bien l'émergence des SARM en communauté. En milieu hospitalier la situation est d'autant plus grave car le taux des SARM : 49 % (163/335) est quasiment égal à celui des SASM, nous essayerons de déterminer l'origine de ces SASM avec les données moléculaires.

2-2 Fréquence des SARM par rapport aux services

La figure suivante nous illustre cette répartition, (le tableau correspondant à un cette figure est en annexe 10)

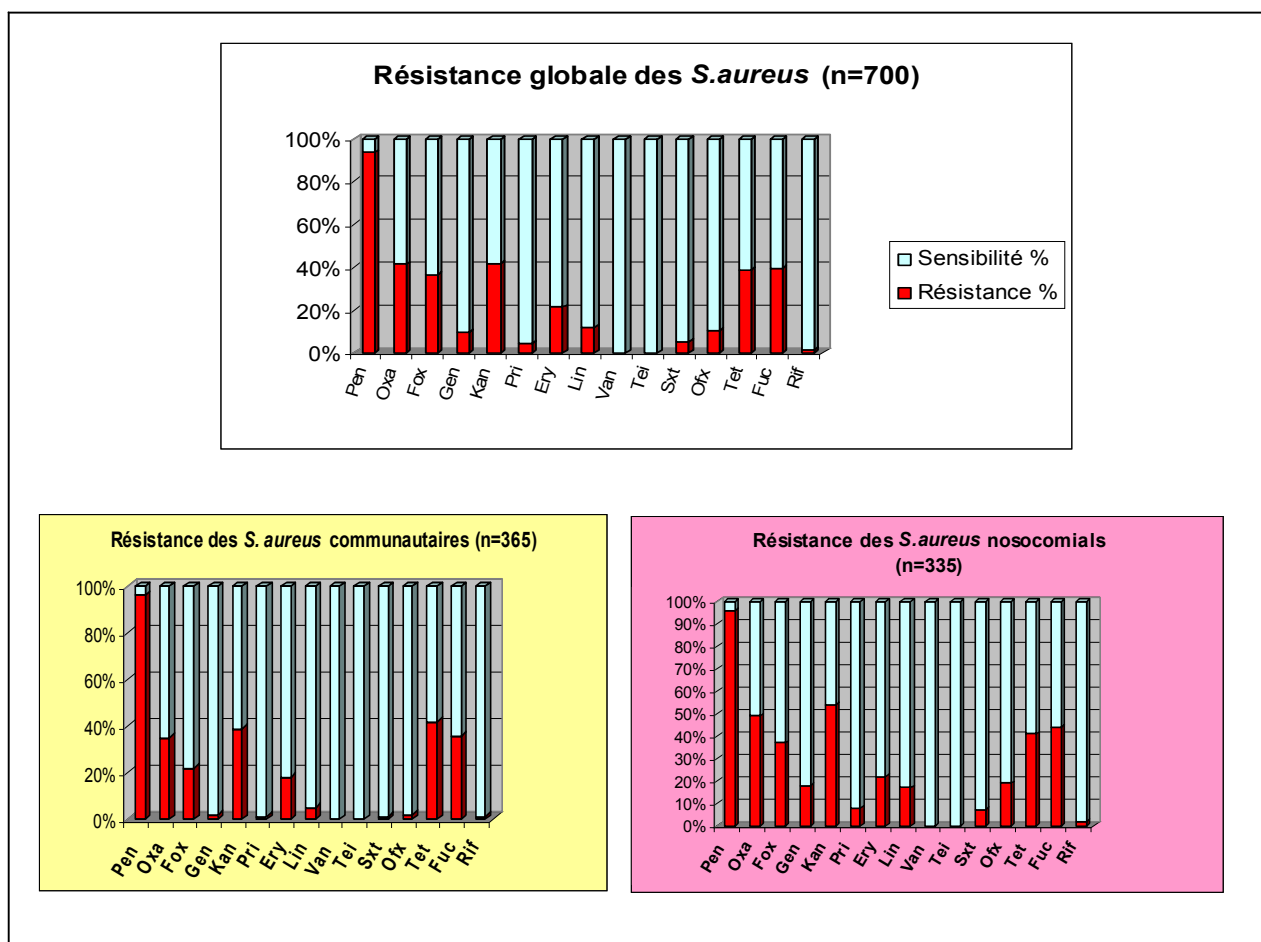
Figure 27: Répartition des SARM par service



Encore une fois le service en tête de ligne, pour la répartition des SARM est le service de dermatologie avec un taux de 47 %, ce qui n'est pas une surprise, vu que c'est le service où nous avons trouvé la plus haute fréquence de *S.aureus*, viennent ensuite les services d'orthopédie et de diabétologie avec chacun un taux de 8 %.

2-3 Fréquence de la résistance aux antibiotiques

La figure suivante nous offre une résistance globale, par rapport à tous les antibiotiques testés sur 700 souches, ainsi que sur les souches communautaires et hospitalières (les tableaux de cette figure est représenté en annexe 10)



Abréviations : Pen : pénicilline ; Oxa : oxacilline ; Fox : Céfoxitine ; Gen : Gentamicine ; Kan : Kanamycine ; Pri :Pristinamycine ; Ery :Erythromycine ; Lin :Lincomycine ; Van : Vancomycine ; Tei : Teicoplanine ; Sxt :Cotrimoxazole ; Ofx :Ofloxacine ; Tet :Tetracycline ; Fuc : Acide fucidique ; Rif :rifampicine

Figure 28 : Représentation de la résistance globale, communautaire et nosocomiale des *S.aureus* par rapport aux antibiotiques testés.

D'une façon globale, nous remarquons que la résistance à la pénicilline englobe 96 % des souches, de plus, accompagnant la résistance à l'oxacilline, des résistances à la kanamycine, tétracycline et acide fucidique sont perçues au niveau des souches communautaires et nosocomiales, ces résistances correspondraient au profil du clone communautaire ST 80 (Vandenesch et al. 2003 ; Tristan et al. 2006).

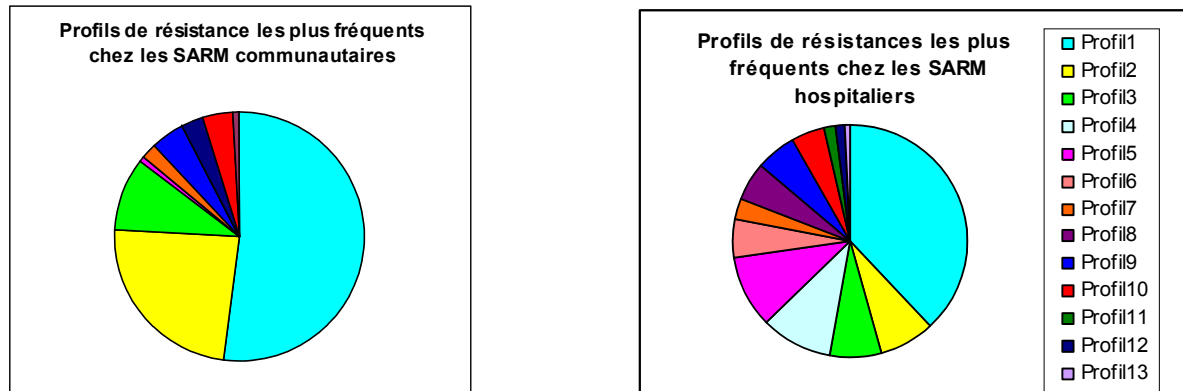
Par contre des résistances à certains antibiotiques sont perçues uniquement au niveau des souches nosocomiales, ou alors en très faible quantité chez les souches communautaires, il s'agit de résistances à la gentamicine, lincomycine, pristinamycine, ofloxacine et au Cotrimoxazole. Ces résistances correspondraient à des souches multirésistantes n'existant qu'à l'hôpital.

Nous ne notons également aucune résistance aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine)

2-4 Les profils de résistances les plus fréquents

2-4-1 Profils de résistance des SARM communautaires et hospitaliers les plus fréquents

Les figures suivantes illustrent la distribution des profils de résistance dans les deux milieux hospitaliers et communautaires (le tableau qui les représente est en annexe 10)



Profil 1: pen, oxa, kan, tet, fuc

Profil 2: pen, oxa, kan, ery, tet, fuc

Profil 3: pen, oxa, kan

Profil 4: p, oxa, gen, kan, ofx, fuc

Profil 5: pen, oxa, gen, kan, ery, lin, pri, ofx, fuc

Profil 6: pen, oxa, kan, tet

Profil 7: pen, oxa, kan, fuc

Profil 8: pen, oxa, gen, kan, ery, lin, pri, ofx, tet, fuc

Profil 9: pen, oxa, kan, ofx, fuc

Profil 10: pen, oxa, kan, ery, lin, ofx, fuc

Profil 11: pen, oxa, kan, ery

Profil 12: pen, oxa, kan, ery, fuc

Profil 13: pen, oxa, kan, ery, lin, tet fuc

Abréviations Pen : Pénicilline ; Oxa : Oxacilline ; Gen : Gentamicine ; Kan : Kanamycine ; Pri :Pristinamycine ; Ery :Erythromycine ; Lin :Lincomycine ; Ofx :Ofloxacine ; Tet :Tétracycline ; Fuc : Acide fucidique

Figure 29 : Répartitions des profils de résistance des SARM communautaires et hospitaliers les plus fréquents

Le profil 1 : pen, oxa, kan, tet, fuc, profil de résistance du clone communautaire ST80, est le profil le plus fréquent dans les deux milieux avec une fréquence globale de 14%, ce qui suggère une dissémination de ce clone de la communauté vers l'hôpital, probablement par le biais de porteurs sains, malades ou personnel médical. Cela étant favorisé par l'absence de mesures d'hygiène et préventives telles que le dépistage et l'isolement des porteurs et des infectés.

En ce qui concerne la répartition des autres profils, on remarque une plus grande diversité à l'hôpital, avec la présence de souches multirésistantes inexistantes en communauté tel que le profil 8 : pen, oxa, gen, kan, ery, lin, pri, ofx, tet, fuc ou encore le profil : pen, oxa, kan, ery, lin, pri, ofx, sxt, tet, fuc (ce profil n'est pas représenté dans la figure)

En communauté, en plus du profil clonal ST 80, nous retrouvons deux autres profils prédominants : le profil 2 : pen, oxa, kan, ery, tet, fuc et le profil 3 : pen, oxa, kan.

D'une façon générale les clones retrouvés en communauté sont moins multirésistants, ainsi que le décrit la littérature (Durupt et al. 2005). Cependant, nous avons quand même retrouvé quelques souches multirésistantes en communauté, ces souches sont probablement d'origine hospitalière et ont été disséminées par le personnel médical ou d'anciens malades hospitalisés (seule l'étude moléculaire pourrait le confirmer).

2-4-2 Profils de résistance les plus fréquents des SASM et leur répartition dans les milieux hospitaliers et communautaires

Le tableau suivant représente la distribution des profils de résistance des SASM les plus fréquents dans les deux milieux hospitalier et communautaire

Tableau 15 : Profils de résistance des SASM les plus fréquents

Profils de résistance des SASM les plus fréquents	Communautaire		Nosocomial		Total	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
pen	144	61%	93	54%	237	58%
pen,tet	23	10%	20	12%	43	11%
pen,fuc	11	5%	7	4%	18	4%
sensible	10	4%	6	3%	16	4%
pen,kan,tet	3	1%	8	5%	11	3%
pen,ery	6	3%	2	1%	8	2%
pen,kan	2	1%	5	3%	7	2%
pen,ery,tet	4	2%	2	1%	6	1%
Total	237	100%	172	100%	409	100%

Les SASM sont d'une façon générale beaucoup moins résistants que les SARM, ils sont aussi beaucoup plus fréquents en communauté ce qui est habituel.

Le profil : pen avec un taux globale de 58%, est le profil le plus fréquent suivi de loin par le profil pen, tet.

Nous avons remarqué également quelques souches présentant des profils résistants tels que les profils suivants : pen, gen, kan, lin, pri, fuc (d'origine nosocomiale); pen, gen, kan, ofx, tet, fuc (d'origine communautaire) ou pen, kan, ery, lin, tet, fuc (d'origine communautaire), nous pensons que ces souches étaient des *S.aureus* résistants à la méticilline à l'origine et qu'elles ont dues être délétées de leurs gène *mec A*.

2-5 Evaluation des tests de sensibilité à l'oxacilline

Rappelons que pour déterminer les *S.aureus* résistants à la méticilline (SARM) nous utilisons quatre tests au niveau de notre laboratoire : les disques d'oxacilline et céfoxitine, qui sont fait systématiquement, en plus du test de screening à l'oxacilline, et la recherche de la PLP-2a (test d'agglutination) qui est le test le plus fiable que nous réservons uniquement aux cas d'interprétation difficiles.

Certains laboratoires se contentent uniquement du disque de céfoxitine pour identifier les SARM, à la fin de notre analyse des 700 souches, avec 291 SARM identifiés, nous avons décidé de comparer la fiabilité de cette méthode.

Sur les 700 antibiogrammes appliqués, 88 souches étaient discordantes : elles présentaient un diamètre céfoxitine ≥ 19 mm (sensible). Parmi celles-ci 61 ont présenté un diamètre d'oxacilline résistant avec un phénotype hétérogène sur milieu MH à 30°C.

Dans les 27 souches restantes des 88 souches, ni le test à l'oxacilline, ni le test à la céfoxitine pour identifier la résistance à la méticilline n'ont pu trancher, mais nous les avons quand même suspectées d'être des MRSA, car elles présentaient une multirésistance aux autres antibiotiques (gen, kan, ery, lin, tet, fuc) qui sont considérés comme des marqueurs accompagnant la méticillionrésistance.

Pour ces souches là nous avons effectué le test de la recherche de la PLP 2a. Sur les 27 tests effectués, 13 ce sont révélés positifs.

Le tableau suivant nous récapitule ces interprétations :

Tableau 16 : Résultats comparatifs de la détection des SARM par la céfoxitine et l'oxacilline

Discordance au niveau de la céfoxitine	Discordance au niveau de l'oxacilline	Total (n=88)
Oui	Non	61
Oui	Oui	27
Non	Oui	0

Ce qui veut dire que sur les 88 cas discordants, où la céfoxitine s'est montrée sensible, 75 souches étaient des SARM, et 14 souches étaient réellement des SASM, donc la céfoxitine a été faussement sensible sur 10,57% des souches.

NB. À noter que le test de screening, n'as pas été concluant pour ces 89 souches.

3-Analyse moléculaire

Sur les 700 souches, 120 ont bénéficié d'une analyse moléculaire, nous les avons choisis totalement au hasard, afin de disposer d'un échantillon représentatif.

Sur les 120 souches, 45 sont d'origine communautaire, et 75 sont nosocomiales, avec 69 patients de sexe masculin pour 51 patients de sexe féminin, quant aux pathologies elles sont variées et représentatives des 700 souches. Ainsi parmi les 120 souches isolées : 87 provenaient d'infections cutanées et des tissus mous, 14 provenaient d'infections ostéoarticulaires et 6 provenaient d'infections respiratoires dont 2 pneumopathies (voire tableau récapitulatif en annexe 10).

Sur ces souches nous avons effectué la recherche moléculaire de 20 toxines, en plus du gène de résistance à la méticilline *mecA* et des gènes de régulation des facteurs de virulence *agr*.

3-1 Prévalence du gène *mecA*

Sur les 120 souches analysées, 61 possèdent le gène *mecA*, ce qui veut dire que 61 souches sont résistantes à la pénicilline, ce résultat a concordé avec la recherche des SARM par les différentes méthodes utilisées dans notre laboratoire.

3-2 Prévalence des souches productrices de la PVL (PVL +)

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la leucocidine de Pantone et Valentine (PVL), fortement impliquée dans les infections à SARM.

Lors de notre analyse, nous avons retrouvé une fréquence de souches productrices de PVL de 51 % (c'est-à-dire 61 sur 120 souches), c'est un taux élevé qui représente plus de la moitié des souches (voir figure 30).

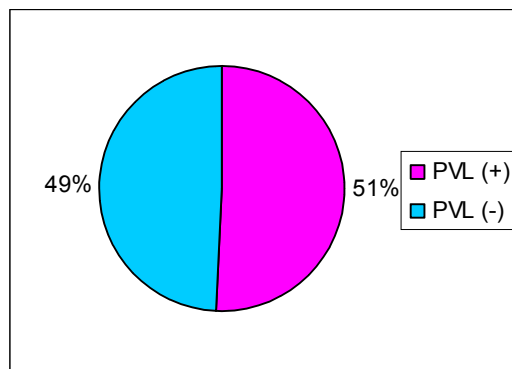


Figure 30 : Fréquence de la toxine PVL

Notre résultat montre un taux de PVL plus bas, que celui déjà publié en Algérie, au CHU Mustapha Bacha d'Alger entre 2003 et 2004 et qui était de 72 %. Ceci est lié au fait que notre échantillon est beaucoup plus important et se rapproche plus de la réalité (L'échantillon de Ramdani et al ne comprenait que 61 souches dont la majorité étaient des SARM) (Ramdani et al. 2006).

Néanmoins le taux que nous avons trouvé (51%) reste important comparativement à celui cité dans la littérature et qui est estimé à moins de 3% (Fleurette 1989 ; Jarraud 2002).

3-3 La fréquence de la toxine PVL en milieu communautaire et nosocomial

La figure suivante illustre la répartition de la toxine PVL dans les infections communautaires et hospitalières (le tableau la représentant est annexe 10)

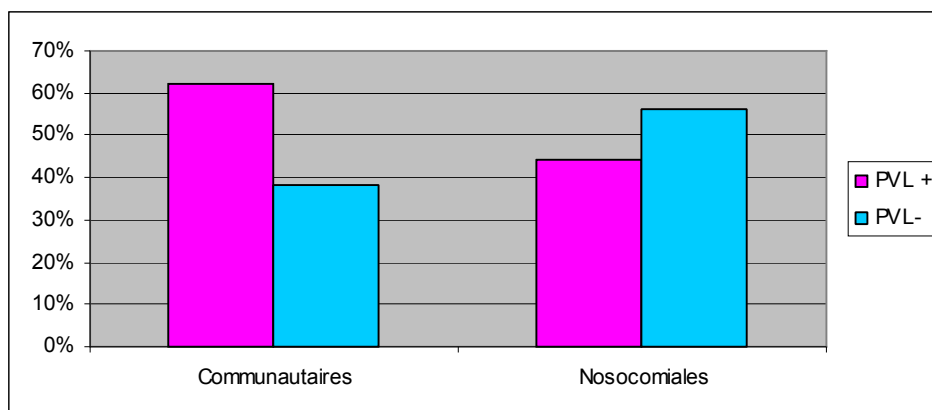


Figure 31 : Répartition de la PVL en milieu nosocomial et communautaire

Nous constatons par cette figure que les souches productrices de la PVL (PVL+) sont plus nombreuses en communauté, ce qui est décrit (Vandenesch et al. 2003). Par contre malgré le fait que les souches non productrices de la PVL (PVL-) soient prédominantes en milieu hospitalier, nous remarquons un fort de taux de PVL dans ce milieu, il doit être attribué aux souches du clone ST 80 qui rappelle le, est disséminé à l'hôpital et y est devenu endémique.

3-4 Prévalence de la toxine PVL en fonction des pathologies

La figure suivante représente la répartition de la toxine PVL en fonction des différentes pathologies, le tableau qui lui correspond est en annexe 10

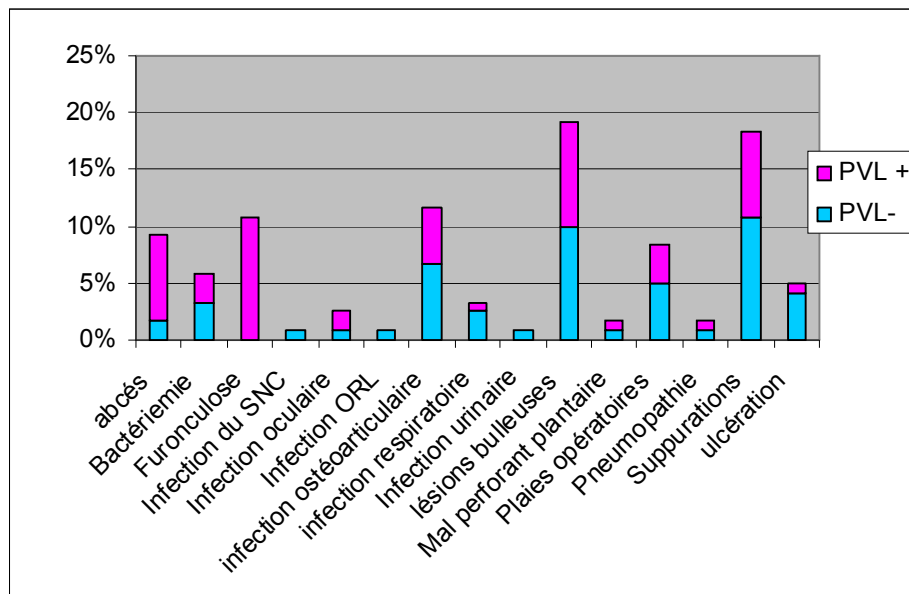


Figure 32 : Répartition de la toxine PVL en fonction des différentes pathologies

Nous remarquons que la PVL est répandue dans la majorité des pathologies, on la trouve dans la totalité des furoncles, elle est prédominante dans les abcès, et est non négligeable dans les infections des pieds diabétiques, les infections ostéoarticulaires, les suppurations et les bactériémies.

Nous l'avons retrouvée également dans une pneumopathie, chez une personne de sexe masculin de 63ans, le profil de résistance de la souche correspondrait au clone ST80 : Pen, oxa, kan, tet, fuc, en plus de la rifampicine.

(La souche est résistante, à la rifampicine, car le patient avait été traité au départ pour une tuberculose). Heureusement chez ce patient, nous n'avons pas constaté de nécrose, uniquement un abcès au niveau du poumon.

La dissémination de la PVL dans différentes infections est un fait inquiétant. En effet les infections profondes telles que les infections ostéoarticulaires et les pneumonies sont graves. La pneumonie nécrosante à un taux de mortalité de 75 % (Gillet et al. 2002), et les infections ostéoarticulaires sont dévastatrices et engendrent de lourdes séquelles (Gillet et al. 2007).

3-5 Répartition de entérotoxines en fonction des pathologies

Le tableau suivant nous présente cette répartition

Tableau 17 : Répartition des entérotoxines en fonction des pathologies

Pathologies	Entérotoxines												Total des pathologies
	SEA	SEB	SEC	SED	SEH	SEK	SEL	SEM	SEO	SEP	SEQ	SER	
Abcès	1	1	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	11
Bactériémies	1	0	1	0	0	0	1	3	3	0	0	0	7
Furunculoses	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	13
Infections du SNC	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
Infections oculaires	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Infections ORL	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
Infections ostéoarticulaires	0	1	1	0	0	2	1	4	4	0	2	0	14
Infections bronchiques	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	4
Infections urinaires	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Lésions bulleuses	5	0	0	0	2	2	0	7	7	1	2	0	23
Infections des pieds diabétiques	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	2	0	2
Plaies opératoires	3	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	10
Pneumopathies	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Suppurations	2	1	2	0	2	2	2	5	5	2	2	0	22
Ulcérations	0	1	0	0	0	0	0	4	4	2	0	0	6
Total	14	5	4	0	6	10	4	31	31	5	10	0	120

Nous remarquons par cette répartition la prédominance de certaines entérotoxines (SE) par rapport à d'autres, c'est le cas notamment des SEM et SEO qui ont été dénombrées 31 fois dans différentes pathologies, arrivent ensuite SEA, SEK et SEL.

Les entérotoxines SED et SER n'ont été retrouvées dans aucune des pathologies.

De plus, il ressort de ce tableau deux couples de toxines SEM, SEO et SEK, SEQ dont la répartition par rapport aux pathologies est totalement identique, cela s'explique par la l'appartenance de ces toxines à un même cluster appelé *egc* pour Enterotoxin Gene Cluster (Jarraud 2001).

On remarque également que certaines pathologies sont associées à un plus grand nombre d'entérotoxines, telles que les lésions bulleuses ou les infections ostéoarticulaires, c'est ce qui explique sans doute la gravité de ces infections, ces toxines étant connues comme ayant une activité superantigénique, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'activer de façon polyclonale les lymphocytes T, entraînant la sécrétion massive de cytokines, il en résulte une intense réaction inflammatoire, le plus souvent accompagnée d'un choc (Gillet et al. 2003 ; Tristan et al. 2004).

3-6 Répartition des autres toxines en fonction des pathologies

Le tableau ci-dessous nous donne la répartition des autres toxines recherchées par rapport aux différentes pathologies :

Tableau 18 : Répartition des exfoliatines, de la toxine du choc staphylococcique, de l'inhibiteur de la différenciation des cellules de l'épiderme (EDIN) et de l'hémolysine β

Pathologies	Exfoliatines			TSST-1	EDIN	Hémolysine β	Leucocidine M	Pathologies sans aucune toxine	Total des pathologies
	ETA	ETB	ETD						
Abcès	0	0	8	2	8	0	0	0	11
Bactériémies	0	0	3	0	3	2	0	0	7
Furonculoses	0	0	13	0	13	1	0	0	13
Infections du SNC	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Infections oculaires	0	0	2	1	2	0	0	1	3
Infections ORL	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Infections ostéoarticulaires	0	0	6	0	7	1	0	3	14
Infections respiratoires	0	0	1	0	1	0	0	1	4
Infections urinaires	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Lésions bulleuses	0	0	10	3	11	2	0	0	23
Infections des pieds diabétiques	0	0	0	1	0	0	0	0	2
Plaies opératoires	0	0	3	0	3	0	0	3	10
Pneumopathies	1	0	1	0	1	0	0	0	2
Suppurations	1	0	10	0	10	0	0	4	22
Ulcérations	0	0	1	7	1	1	0	1	6
Total	2	0	58	14	60	8	0	14	120

Ce qui ressort de ce tableau c'est l'association de deux autres toxines, l'EDIN et l'ETD, avec presque la même répartition par pathologie, ceci est dû aussi à la présence de ces deux toxines sur un même segment chromosomique ou îlot de pathogénicité (Takayuki 2002).

Nous remarquons aussi la forte fréquence de ces deux toxines dans les lésions bulleuses, les furoncles et les abcès, ce qui doit être lié à leur pathogénicité intraépidermique. Ces deux toxines sont également retrouvées au niveau de la souche isolée de la pneumopathie PVL+.

L'ETA n'est présente que dans deux pathologies : une suppuration et une pneumopathie (PVL-), alors que l'ETB et la leucocidine M sont totalement absentes. Rappelons que les

exfoliatines sont responsables du syndrome d'exfoliation généralisé ainsi que d'impétigo bulleux, elles sont aussi superantigéniques (Floret et al. 2000 ; Gillet et al. 2003).

Notons aussi la présence des TSST-1, notamment dans les ulcérations, les infections ostéoarticulaires, et les abcès, ce qui est inquiétant, car le pouvoir superantigénique de cette toxine peut compliquer et aggraver ces pathologies. Comparativement à l'étude de Ramdani et al, nous n'avons retrouvé aucunes TSST-1 chez les nouveaux nés.

3-7 Les profils moléculaires

Compte tenu de l'importance des souches PVL+, nous avons jugé nécessaire d'étudier les profils moléculaires, en séparant les souches productrices de PVL (PVL+) des souches non productrices de PVL (PVL-).

3-7-1 Les profils moléculaires des souches productrices de PVL

Le tableau suivant représente les différents profils moléculaires des souches PVL+

Tableau 19 : Profils moléculaires des souches PVL+

	<i>agr</i>	Gènes de toxines	communautaire	nosocomiale	total
<i>mecA</i> +	3	<i>etd, edin</i>	22	28	50
	3	<i>selm,selo</i>	1	0	1
<i>mecA</i> -	1	<i>etd,edin</i>	1	1	2
	1	<i>selm,selo</i>	1	0	1
	1	<i>selm,selo,seb,etd,edin</i>	1	1	2
	1	<i>selm,selo,seb,etd,edin,hlb</i>	1	0	1
	2	Aucunes toxines	0	1	1
	3	<i>etd edin</i>	0	1	1
	3	<i>sea,seh,selq,selk</i>	0	1	1
4	<i>selm,selo</i>	1	0	1	
Total			28	33	61

Gènes codants les entérotoxines (*sea, seb, sec, sed, selk, selm, seo, selp, selq selr*)

Gène codant l'hémolysine β (*hlb*)

Gènes codant les exfoliatines (*eta,etb,etd*)

Gène codant l'inhibiteur de la différenciation de la cellule épidermale (Epidermal cell differentiation Inhibitor) (*edin*)

Ce qui ressort d'emblée de ce tableau, c'est la haute fréquence du clone *mecA+*, PVL+, *agr 3*, *etd*, *edin*, il est présent dans 82 % des souche PVL+ et est en faveur du clone ST80 (Vandenesch 2003 ; Tristan 2006).

Comme nous l'avons remarqué auparavant, ce clone d'origine communautaire s'est complètement disséminé à l'hôpital, on le trouve ainsi dans 36,84 % des souches nosocomiales. Nous remarquons également l'apparition de souches PVL+ *agr* type 1 et 2 dans les infections nosocomiales, les souches *agr 1* décrites dans la publication algérienne précédente (Ramdani et al. 2006) étaient toutes des PVL-. L'apparition de la PVL dans ces souches (*agr 1* et 2) pourrait être due à la mobilité de la PVL, cette dernière étant codée par un phage (Narita et al. 2001).

Enfin nous remarquons également, l'apparition d'une souche contenant l'*agr 4*, allèle rare décrit en communauté, et qui n'a pas été décrit en Algérie (Ramdani 2006 et al.), ni dans l'étude qu'a mené Tristan en 2006 et qui portait sur la distribution globale des SARM PVL+ dans le monde.

3-7-2 Les profils moléculaires des souches non productrices de PVL

Le tableau suivant représente les différents profils moléculaires des souches PVL-

Tableau 20 : Profils moléculaires des souches PVL –

Gène de résistance à l'oxacilline	Accessory gene regulator <i>agr</i>	Gènes de toxines	Communautaires	Nosocomiales	Total
<i>mecA+</i>	1	Aucunes toxines	0	1	1
		<i>selq,selk</i>	0	4	4
	2	<i>selm,selo</i>	0	2	2
		<i>selm,selo,edin</i> <i>selm,selo,selp</i>	0 0	1 2	1 2
<i>mecA -</i>	1	Aucunes toxines	1	4	5
		<i>hlb,etv1,edin</i>	0	1	1
		<i>sea</i>	1	5	6
		<i>sea,eta</i>	1	0	1
		<i>selm,selo</i>	3	1	4
		<i>selm,selo,etd,edin</i>	1	0	1
		<i>selm,selo,seb,etd,edin,hlb</i>	0	1	1
		<i>selm,selo,sec,sell</i>	3	1	4
		<i>selm,selo,tst</i>	1	1	2
		<i>selm,selo,tst,hlb</i>	0	2	2
	<i>selp</i>	0	3	3	
	2	Aucunes toxines	1	5	6
		<i>eta</i>	1	0	1
		<i>selm,selo</i>	0	2	2
		<i>selm,selo,seb,hlb</i>	1	0	1
	3	aucune toxine	0	1	1
		<i>sea,seh,selq,selk</i>	1	3	4
		<i>seh,sea,selq,selk</i>	1	0	1
		<i>selm,selo,sea,tst</i>	0	1	1
		<i>selm,selo,tst,hlb</i>	1	1	2
	Total			17	42

Gènes codants les entérotoxines (*sea, seb, sec, sed, selk, selm, seo, selp, selq selr*)

Gène codant l'hémolysine β (*hlb*)

Gènes codant les exfoliatines (*eta, etb, etd*)

Gène codant l'inhibiteur de la différenciation de la cellule épidermale (Epidermal cell differentiation Inhibitor) (*edin*)

Ce qui ressort de ce tableau en premier lieu, c'est une plus grande diversité de profils chez les souches PVL-, où l'on n'a pas vraiment un profil particulier qui domine.

Notons cependant la présence de souche *agr* 2 et 1 en communauté, alors que c'est un allèle décrit en général en milieu hospitalier ainsi que la présence de souches *agr* 3 en milieu hospitalier alors qu'il est décrit en communauté (Duprut 2005). Ces souches (*agr* 3 PVL-) devaient être des PVL+ à l'origine et auraient perdu leur gène PVL porté par un phage.

Concernant la répartition de la toxine responsable du choc staphylococcique TSST-1 (codée par le gène *tst*), nous la retrouvons uniquement dans les souches de SARM PVL-. Parmi ces souches, 5 présentent un *agr* de type 1 et les deux autres présentent un *agr* 3. Les SARM, PVL-, *tst* +, *agr* 1 n'ont pas été décrits lors de l'étude de Ramdani en Algérie (Ramdani et al. 2006), ni dans celle de Durand portant sur les clones contenant le gène de la *tst*. Les clones de SARM *tst* + décrits dans cette étude avaient tous un *agr* de type 2 et 3. (Durand et al 2006). Quant aux souches ayant le profil PVL -, *tst* +, *agr* 3 et décrites dans l'étude de Ramdani étaient toutes des SARM (Ramdani et al. 2006).

Par ailleurs nous remarquons également, entre les deux tableaux PVL+ et PVL-, une plus grande diversité chez les souches sensibles à la méticilline (*mec A*-), alors que les souches de SARM (*mecA*+) se regroupent en profils restreints, ce qui suppose une diffusion clonale.

Cependant seule la recherche de type de cassette ainsi que les séquençages des gènes de ménage (ST) pourront confirmer nos suppositions et analyser de façon fine ces souches.

3-7-3 Profils de résistance des souches : PVL +, *agr* 3, *mecA* + et leur répartition

Le tableau suivant représente les profils de résistance des souches : PVL +, *agr* 3, *mecA*+ (profil moléculaire le plus fréquent) et leur répartition en communauté et en milieu hospitalier

Tableau 21 : Profils de résistance des souches PVL +, *agr* 3, *mecA* + et leur répartition

Profils toxiniques	Profils de résistance	Communautaire	Nosocomial	Total
<i>etd, edin</i>	pen,oxa,kan,tet,fuc	12	7	19
	pen,oxa,kan	2	3	5
	pen,oxa,kan,ofx,fuc	0	3	3
	pen,oxa,gen,kan,ery,lin,pri,ofx,fuc	0	2	2
	pen,oxa,gen,kan,ery,lin,pri,ofx,tet,fuc	0	2	2
	pen,oxa,kan,ery,lin	0	2	2
	pen,oxa,kan,ery,tet,fuc	3	1	4
	pen,oxa,kan,fuc	1	1	2
	pen,oxa,gen,kan,ofx,fuc	0	1	1
	oxa,kan,gen,ery,lin,pri,ofx,tet,fuc	0	1	1
	pen, oxa,kan,ery	1	0	1
	pen,oxa,kan,ery,fuc	0	1	1
	pen,oxa,kan,ery,lin,ofx,tet	0	1	1
	pen,oxa,kan,ery,lin,pri,ofx,fuc	0	1	1
	pen,oxa,kan,ery,lin,pri,ofx,tet,fuc	1	0	1
	pen,oxa,kan,ery,tet	1	0	1
	pen,oxa,kan,sxt,fuc	0	1	1
	pen,oxa,kan,tet,fuc,rif	1	0	1
	pen,tet,rif	0	1	1
<i>selm,selo</i>	pen,oxa,fuc	1	0	1
Total		23	28	51

Nous remarquons que le profil de résistance le plus fréquent des souches PVL +, *agr* 3, *mecA* +, que ce soit dans le milieu communautaire ou nosocomial est le profil : pen, oxa, kan, tet, fuc, ce qui conforte notre hypothèse dans l'identification du clone ST 80.

Par ailleurs, nous remarquons encore une fois, une diversité des profils de résistance chez les souches nosocomiales lesquelles sont pour la plupart multirésistantes.

4-L'Etude de portage nasal

L'étude s'est faite au niveau du service de dermatologie, service où nous avons recensé le taux le plus élevé de *S. aureus* et de SARM.

Cette étude a pour but de limiter la dissémination des SARM à partir de sujets porteurs sains.

Nous avons récolté au total 86 prélèvements, dont 34 patients déjà hospitalisés, 38 patients prélevés à l'admission, 7 gardes malades et 7 membres du personnel soignant, principalement des médecins et infirmiers. Sur les 86 personnes prélevées, 55 sont de sexe féminin et 31 sont de sexe masculin, quant à la médiane d'âge elle est de 36 ans.

4-1 Fréquence des porteurs de *S.aureus*

La figure suivante nous représente la fréquence des porteurs de *S.aureus* et des non porteurs

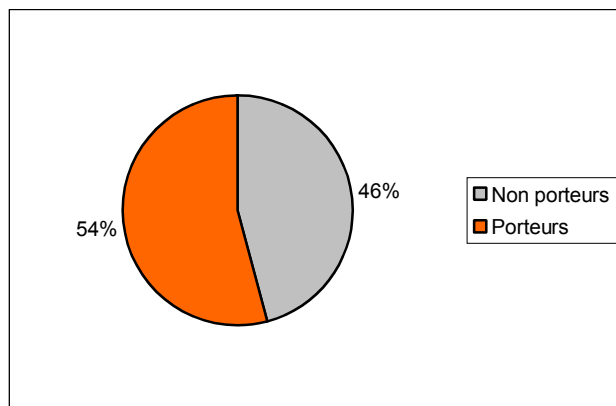


Figure 33 : Fréquence des porteurs de *S. aureus* et des non porteurs (n=86)

Sur les 86 personnes prélevées, 47 personnes sont porteuses de *S.aureus* (SASM et SARM confondus), soit un taux de 54% et 39 sont non porteuses.

Parmi ces 86 personnes, le taux de porteur de SARM est de 30.23 %.

Malgré le fait qu'on ait ciblé un service où *S. aureus* est à l'état épidémique, le taux de porteurs de *S. aureus* reste très important, il représente plus de la moitié des souches. Si l'on compare à la littérature, ce taux ne dépasse pas les 24%, 23%, et 45% dans chacun des hôpitaux d'Atlanta, Taiwan, et d' Abidjan respectivement. (Hidron et al.2005 ; Huang et al. 2007 ; Akoua Koffi et al.2004)

4-2 Fréquence des *S.aureus* et des SARM parmi les porteurs

Sur les 47 porteurs, nous avons isolé 56 souches de *S.aureus* car certains porteurs présentaient à la fois deux souches différentes.

La figure suivante nous représente le taux des SARM parmi les *S.aureus* isolés

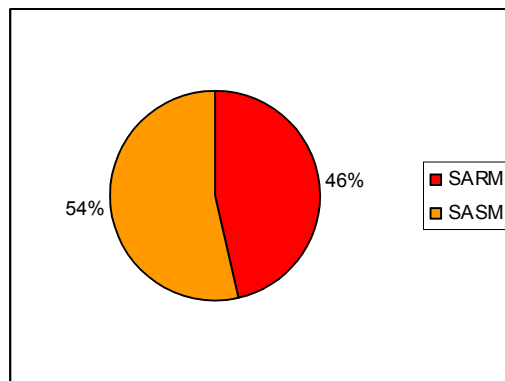


Figure 34: Fréquence des SARM parmi les *S.aureus* isolés (n=56)

Sur ces 56 souches isolées, nous avons identifié 26 SARM, soit un taux de 46 %. Comparant aux mêmes études sus citées, le taux de SARM avoisine les 7.3%, 7.3%, et 38.7% dans les hôpitaux d'Atlanta, Taiwan, et d' Abidjan respectivement. (Hidron et al. 2005 ; Huang et al. 2007 ; Akoua Koffi et al.2004).

Notre étude montre globalement une forte prévalence de portage de SASM et de SARM par rapport aux données de la littérature, ce qui s'explique par le fait que nous nous sommes limités à un seul service, lequel par ailleurs est un service à haut risque d'acquisition de SARM.

4-3 Fréquence de *S.aureus* et de SARM dans chaque population porteuse

Le tableau suivant résume les différents taux de portage dans chaque population

Tableau 22 : Fréquence de *S.aureus* et de SARM dans chaque population porteuse

Souches isolées	Patients hospitalisés (n=24)	Patients à l'admission (n=17)	Gardes malades (n=6)	Personnel soignant (n=2)	Total
<i>S.aureus</i>	15	13	1	1	30
SARM	11	9	5	1	26
Total souches isolées	26 souches	22souches	6 souches	2 souches	56*

*Le total des souches isolées est de 56 car parmi les 46 porteurs identifiés, 9 dont 2 patients hospitalisés, 5 patients à l'admission et 2 gardes malade avaient 2 souches différentes de *S.aureus*

Le taux de *S.aureus* le plus élevé se situe chez les patients hospitalisés, ce qui est normal, par contre nous remarquons un fort taux de *S.aureus* et notamment de SARM chez les patients admis, ce qui constitue un risque potentiel pour la diffusion des souches communautaires à l'hôpital. Ces patients devraient être isolés et décolonisés.

Concernant les patients déjà hospitalisés et colonisés, nous avons recensé 26 *S. aureus* provenant de 24 patients, ces patients ont une durée d'hospitalisation différente. Ainsi parmi ces patients :

- 11 étaient hospitalisés depuis une semaine au maximum
- 5 étaient hospitalisés depuis un mois au maximum
- Et 8 étaient hospitalisés depuis 6 à 8 mois

Nous constatons aussi un nombre important de SARM chez les gardes malades, cette population aussi constitue un risque, car elle va contribuer à disséminer ces souches hors de l'hôpital.

La taille de l'échantillon étant trop restreinte, nous ne pouvons, nous avancer vers une interprétation plus précise.

4-4 Portage de *S. aureus* en fonction du sexe et des tranches d'âges

Sur les 55 personnes de sexe féminin prélevées au départ, 24 sont porteuses de *S.aureus* soit un taux de 43,63%.

Chez le sexe masculin, sur les 31 personnes prélevées au départ, 23 sont porteuses de *S.aureus*, soit 74,19%, ce qui nous donne un taux plus élevé chez les hommes, ceci pourrait s'expliquer par le fait que la plupart des patients prélevés pendant leur hospitalisation sont de sexe masculin.

En ce qui concerne les tranches d'âges, le tableau suivant nous représente leur répartition

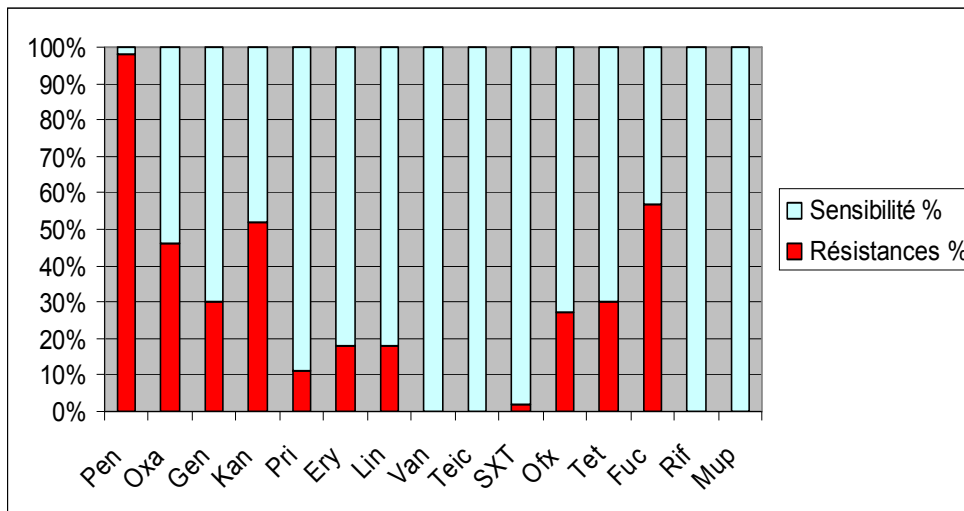
Tableau 23 : Répartition des tranches d'âges chez les personnes porteuses de *S.aureus*

tranches d'âges	Total
01-10	3
11-20	4
21-30	11
31-40	12
41-50	4
51-60	7
61-70	3
71-80	3
Total	47

Nous remarquons que toutes les tranches d'âges sont représentées dans ce tableau avec une fréquence plus importante chez les personnes adultes situés entre 21 et 40 ans.

4-5 Résistance globales des souches de *S. aureus* isolées

La figure suivante représente la résistance globale aux antibiotiques des souches de *S.aureus* isolées chez les porteurs (le tableau représentant la figure est en annexe 10).



Abréviations : Pen : pénicilline ; Oxa : oxacilline ; Gen : Gentamicine ; Kan : Kanamycine ; Pri :Pristinamycine ; Ery :Erythromycine ; Lin :Lincomycine ; Van : Vancomycine ; Tei: Teicoplanine ; Sxt:Cotrimoxazole ; Ofx :Ofloxacine ; Tet :Tetracycline ; Fuc : Acide fucidique ; Rif :rifampicine ; Mup :Mupirocine

Figure 35 : Représentation de la résistance globale des souches isolées

La résistance à la pénicilline représente les 98% des souches, alors que la résistance à l’oxacilline est de 46%, on remarque aussi, un taux de résistance élevé pour la kanamycine et l’acide fucidique avec des taux respectifs de 52 et 57 %. Nous ne notons aucune résistance pour la vancomycine, la teicoplanine et la mupirocin.

4-6 Profils de résistance des souches de *S. aureus* et leur répartition dans les différentes populations de portage.

Le tableau suivant nous représente ces différents profils

Tableau 24 : Présentation des profils de résistance et leur répartition par rapport à la Population étudiée.

profils de résistance	Gardes malades	Patients	Patients à l'admission	personnel soignant	Total
Pen	1	9	5	0	15
pen,fuc	0	1	7	1	9
pen,oxa,gen,kan,ofx,fuc	1	4	3	0	8
pen,oxa,kan,ery,tet,fuc	2	0	1	0	3
pen,oxa,kan,tet,fuc	1	0	2	0	3
pen,oxa,gen,kan,lin,pri,ofx,fuc	0	2	0	0	2
pen, gen,kan,lin,tet	0	1	0	0	1
pen,gen,kan,lin,pri	0	1	0	0	1
pen,kan	0	1	0	0	1
pen,kan,tet	0	1	0	0	1
pen,oxa,ery,tet,fuc	0	0	0	1	1
pen,oxa,gen,kan,ery,lin,pri,ofx,fuc	0	1	0	0	1
pen,oxa,gen,kan,ery,lin,pri,ofx,tet	1	0	0	0	1
pen,oxa,gen,kan,ery,lin,pri,tet,fuc	0	1	0	0	1
pen,oxa,gen,kan,lin,sxt,tet	0	1	0	0	1
pen,oxa,gen,kan,ofx,tet,fuc	0	0	1	0	1
pen,oxa,kan,ery,lin,ofx,fuc	0	0	1	0	1
pen,oxa,kan,ery,lin,tet,fuc	0	0	1	0	1
pen,oxa,kan,ery,tet	0	1	0	0	1
pen,oxa,kan,ofx,tet,fuc	0	1	0	0	1
pen,tet	0	1	0	0	1
Sensible	0	0	1	0	1
Total	6	26	22	2	56

Le profil le plus fréquent est celui de la résistance à la pénicilline uniquement. En général les souches sensibles sont plus rencontrées chez les patients à l'admission

Notons que deux membres du personnel soignant ainsi que 6 gardes malades sont porteurs de SARM et de SARM et de souches de SARM multirésistantes, ce qui constitue un réservoir "imperceptible" pour la dissémination de ces souches.

Ce qui ressort également de ce tableau, c'est la diversité et la multirésistance des SARM, on remarque aussi qu'on les retrouve avec un nombre important chez les patients à l'admission.

Le tableau suivant nous présente la répartition des souches selon la durée d'hospitalisation chez les patients déjà admis

Tableau 25 : Profils de résistances des patients selon leur durée d'hospitalisation

Durée d'hospitalisation	Profils de résistance	Total
Une semaine au maximum	pen,oxa,kan,ofx,tet,fuc	1
	pen,oxa,kan,ery,tet	1
	pen,fuc	1
	pen,tet	1
	pen	3
	pen, kan, tet	1
	pen	1
	pen,oxa,gen,kan,ofx,fuc	1
	pen,kan	1
Un mois au maximum	pen	2
	pen,oxa,gen,kan,ofx,fuc	1
	pen,oxa,gen,kan,ery,lin,pri,tet,fuc	1
	pen,oxa,gen,kan,lin,pri,ofx,fuc	1
Entre 2 et 8 mois	pen,oxa,gen,kan,ofx,fuc	2
	pen	3
	pen, gen,kan,lin,tet	1
	pen,oxa,gen,kan,lin,pri,ofx,fuc	1
	pen,oxa,gen,kan,lin,sxt,tet	1
	pen,oxa,gen,kan,ery,lin,pri,ofx,fuc	1
	pen,gen,kan,lin,pri	1
Total		26

De ce tableau, nous remarquons que le plus grand nombre des souches multirésistantes proviennent de patients hospitalisés dont la durée d'hospitalisation a dépassé le mois. C'est le cas notamment des souches ayant les profils suivants : pen,oxa,gen,kan,ery,lin,pri,ofx,fuc ; pen,oxa,gen,kan,lin,pri,ofx,fuc, elles ont été isolées chez des patients hospitalisés depuis 2 mois. Cependant certains patients étant seulement hospitalisés pendant une semaine au maximum sont porteurs de souches multirésistantes, l'origine de ces souches reste à être déterminée étant donné que ces patients n'ont pas été prélevés à l'admission.

D'une façon globale, ce qui ressort de cette étude c'est l'inquiétant taux de SARM en milieu hospitalier que ce soit chez les patients hospitalisés, à l'admission ou chez les gardes malades, c'est sans doute ce qui expliquerait cette dissémination de souches communautaires vers l'hôpital et vice versa.

Une étude moléculaire s'impose sur ces souches de portage afin d'identifier leur origine de façon précise ainsi que le taux de PVL.

4-7 Les mesures préventives

Par ces résultats communiqués aux cliniciens, des réunions de travail an coordination avec le service de l'épidémiologie ont été effectuées pour une réflexion quant aux mesures à prendre pour le personnel, notamment :

- Formation d'un infirmier hygiénistes (en cours).
- Promouvoir le lavage des mains avec mise à disposition de solution hydroalcoolique.
- L'observance des règles d'hygiènes et d'asepsie.
- Décoloniser et isoler les porteurs.

Conclusion

Conclusion

Au terme de nos différents travaux, nous avons pu relever plusieurs aspects importants concernant la résistance, l'épidémiologie et le portage de *S.aureus*. Parmi ces points nous retenons la présence d'une forte fréquence de *S. aureus* et de SARM dans les deux milieux communautaires et hospitaliers. Une forte prévalence de souches productrices de PVL (51 %) a été retrouvée, de plus nous avons recensé un fort taux d'association entre la résistance à la méticilline et la PVL (42,5%), ce qui représente un risque potentiel de complications par des infections profondes (os, poumon) difficiles à traiter.

Par ailleurs deux nouveaux profils jamais décrits en Algérie sont apparus : un profil communautaire *agr* de type 4, et des profils *agr* 1 et 2 chez des souches productrices de PVL.

Nous avons également constaté une dissémination des SARM communautaires vers le milieu hospitalier et une dissémination des SARM-H vers la communauté ce qui démontre une circulation de *S.aureus* entre les deux milieux.

La dissémination des SARM-H vers la communauté, serait due en grande partie à l'abaissement des barrières qui existaient auparavant entre les deux milieux (développement des soins à domicile, chirurgie ambulatoire, raccourcissement de la durée d'hospitalisation, développement des cliniques privées...etc.).

De ce fait, la mise en place d'une politique raisonnée doit être menée au niveau de l'hôpital et de la communauté pour essayer de limiter cette transmission épidémique des SARM.

Cette politique passe par la mise en place d'un certain nombre de mesures préventives, lesquelles sont :

1- En communauté, de sensibiliser les patients infectés ou porteurs du germe (importants réservoir de SARM-C) en leur rappelant les règles d'hygiène de base :

- Lavage des mains et du corps avec un savon antiseptique.
- Ne pas partager son linge personnel (serviettes, draps, sous-vêtements) et le laver à une température supérieure à 60°C.
- Nettoyage régulier des surfaces à l'eau de javel diluée à 1%.

- Couvrir si possible les lésions infectées et éviter de les manipuler hors des soins, avec une décontamination par un antibiotique local (mupirocine) des sites colonisés s'il s'agit de porteurs sains.

2- En milieu hospitalier, de mettre en place en urgence un programme de dépistage au niveau des services à haut risque, ce dépistage doit cibler les patients au moment de leur admission, avec un isolement des patients porteurs considérés comme réservoir potentiel de ces infections.

Il est nécessaire également de dépister le personnel soignant qui peut être considéré comme réservoir mais aussi comme vecteur de la transmission.

Il est aussi important de réduire l'utilisation des antibiotiques afin de diminuer la pression de sélection des SARM et d'instaurer des mesures d'hygiène strictes (lavage des mains après chaque geste, changer de gants après toute manipulation...), ainsi que la décontamination de tout l'environnement du malade afin d'éviter toute contamination croisée (porte, chambre ou box, dossier médical, poignet de porte...etc.),

Enfin, un système de communication doit être mis en place entre les différents services en cas de transfert ou de déplacement du patient infecté ou porteur de *S. aureus*, ainsi qu'avec le laboratoire de microbiologie qui doit signaler la présence de ces SARM et discuter d'un traitement antibiotique adéquat avec le clinicien afin d'éviter tout abus et de limiter ces multirésistances.

Une étude moléculaire (type de cassette *SCCmec*, ST (séquence type), recherche du gène de la PVL) serait nécessaire sur les souches isolées à partir de portage afin de comprendre la circulation des souches.

De plus, une étude menée dans la communauté hors de l'hôpital permettra de d'appréhender les facteurs de risques favorisant les infections avec des souches SARM, PVL+ hautement virulentes

Références bibliographiques

Bibliographie

Akoua Koffi, C., N. Guessend, et al. (2004). "La méticillino-résistance de *Staphylococcus aureus* isolés à Abidjan (1998-2001), un nouveau problème en milieu hospitalier" Médecine et maladies infectieuses **34**: 132-136.

Akoua Koffi, C., K. Dje, et al. (2004). "Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among health care personnel in Abidjan (Cote d'Ivoire)" Dakar Med **49**(1): 70-74

Arbuthnott, J. P., D. C. Coleman, et al. (1990). "Staphylococcal toxins in human disease." Soc Appl Bacteriol Symp Ser **19**: 101S-107S.

Avril, J-L (2000). "Les staphylocoques" Bactériologie clinique :p 6-29, Edition ellipse

Baba Moussa, L., A. Sanni et al. (1999). "Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la production de leucotoxine par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées en Afrique de l'Ouest" Médecine et maladies infectieuses Infect **29**: 689-696.

Batch, P., P. Berche (1988). "Les staphylocoques" Bactériologie **29**: 267-275.

Barber, M (1961). "Methicilline-resistance staphylococci." Journal of Clinical Pathology **319**: 385-393.

Barbier Frebourg, N (2001). "Résistance des Staphylocoques à la méticilline." Feuille de biologie **42**(241): 15-22.

Berger Bächli, B (1997). " Résistance aux bêta-lactamines. " Médecine et Maladies Infectieuses **27**: 195S-200S.

Bergone-Bérézin, E (2000). "Résistance et nouvelles stratégies antibiotiques les problèmes des Staphylocoques" La presse médicale **37** : 2018-2021

Bes, M., Y. Brun (2002). "*Staphylococcus* : Actualités taxonomiques et identification." Revue Française des laboratoires

Borg, M. A, M de Kraker (2007). "Prevalence of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries" Journal of Antimicrobial Chemotherapy **60**:1310-1315

Choi, C. S., C. S. Yin, et al. (2006). "Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthy adults" Journal Microbiology Immunology Infections **39**:458-464

Dagnra, A. Y., A. Hounkpati and M. Prince- David (2001). "Fort pourcentage de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline au CHU de Lomé (Togo)" Médecine et maladies infectieuses **31** : 14-18

- Daum, R. S., T. Ito, et al.** (2002). "A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic background." Journal Infectious Diseases **186** (9): 1344-1347.
- Dinges, M.M., P.M. Orwin, et al.** (2000). "Exotoxins of *Staphylococcus aureus*." Clinical Microbiology reviews **13** (1): p 16-34
- Dufour, P., S. Jarraud** (2000). " Polymorphisme du système de régulation des exoprotéines chez *Staphylococcus aureus*" Médecines et maladies infectieuses**30**: 739-744.
- Duprut, F., A. Tristan, et al.** (2005). "*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline d'origine communautaire" Médecines et maladies infectieuses**35**: S38-S40.
- Durand, G., M. Bes et al.** (2006). "Detection of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones Containing the Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene Responsible for Hospital- and Community-Acquired Infection in France " Journal of Clinical Microbiology **44** (3): 847-853
- Eveillard, M., F. X. Lesure et al.** (2002). "Portage, acquisition et transmission de *S.aureus* résistant à la méticilline en milieu communautaire. Conséquence en terme de politique de prévention et d'antibiothérapie" Médecine et maladie infectieuse **32**: 717-724.
- Fleurette, J., L. Le Minor, M. Veron** (1989). " Staphylocoques et Microcoques" Bactériologie médicale 2^{ème} édition chap 38: p773-P794, Edition Flammarion.
- Fleurette, J., J. Freney, et al.** (1995). Les flores microbiennes commensales de la peau et des muqueuses. Antisepsie et désinfection. Paris
- Floret, D., G. Lina** (2000). "Les toxines staphylococciques et leurs pathologies chez l'enfant." La lettre de l'infectiologue **15**(9) : 406-407.
- Garnier, F., A. Tristan, et al.** (2006). "Pneumonia and New Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone." Emerging Infectious Diseases **12**(3) : 498-499
- Gillet, Y., B. Issartel, et al.** (2002). "Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying the gene for the Panto- Valentine leukocidin and highly-lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patient." Lancet **359**:753-759
- Gillet, Y., G. Lina, J. Etienne.** (2003). "Syndrome toxiques staphylococcique en pédiatrie." http://www.gfrup.com/gfrup/Syndrome_toxinique_staph.htm
- Gillet, Y., B. Dohin, et al.** (2007). "Infections ostéoarticulaires à staphylocoques dorés sécréteurs de la leucocidine de Panton-Valentine." Archives de pédiatrie **14** : S102-S107.
- Haley, C.C., D. Mittal, et al.** (2007). "Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection or Colonization Present at Hospital Admission: Multivariable Risk Factors Screening To Increase Efficiency of Surveillance Culturing " Journal of Clinical Microbiology **45** (9): p 3031-3038.

Hidron, A.I., E.V. Kourbatova, et al. (2005). "Risk Factors for colonization with Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Patients Admitted to Urban Hospital: Emergence of Community-Associated MRSA Nasal Carriage" Clinical Infectious Diseases **41**:(159-166).

Huang, Y-C., K-P. Hwang, et al. (2007). "Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization among Taiwanese Children in 2005 and 2006." Journal of Clinical Microbiology **45** (12): p3992-3995.

Hiramatsu, K., L. Cui, et al. (2001). "The emergence and evolution of methicilline-resistant *Staphylococcus aureus*." Trends Microbiol **9**(10): 486-493.

Ito, T. and K. Hiramatsu (1998). "Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* " Yonsei Med J **39** (6): 526-533.

Ito, T., Y. Katamaya, et al. (2001). "Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* " Antimicrobial Agent and Chemotherapy **45**(5): 1323-1336.

Ito, T., X.X. Ma, et al. (2004). " Novel Type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*." Antimicrobial Agent and Chemotherapy **48**(7): 2637-2651.

Jarraud, S., M.A. Peyrat, et al. (2001). "*egc*, A Highly Prevalent Operon of Enterotoxin Gene, Forms a Putative Nursery of Superantigens in *Staphylococcus aureus*." The American Association of Immunologists **166**: 669-677.

Jarraud, S., G. Lina, et al. (2002). "Epidémiologie des infections toxémiques à staphylocoques doré." Ann Fr Anesth Réanim **21** : 370-374.

Jarraud, S., C. Mougel, et al. (2002). "Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease" Infect Immun **70**(2): 631-641.

Katamaya, Y., T. Ito, et al. (2000). "A new class of genetic element, *Staphylococcus aureus* cassette chromosomes *mec*, encodes methicilline resistance in *Staphylococcus aureus*." Antimicrobial Agent and Chemotherapy **44**(6): 1549-1555.

Kikuchi, K., N. Takahashi, et al. (2003). "Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease in neonatal and perinatal wards." Journal of Clinical Microbiology **41**:3001-3006.

Kondo, Y., T. Ito, et al. (2006). "Combination of multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr* and Major Difference in Junkyard Regions" Antimicrobial Agent and Chemotherapy **51**(1): p 264-274

Le Gallou, F. and H. Richet, J. Etienne, F.W .Goldstein (1996)."Mode de transmission de *S.aureus* résistant à la méticilline." Les Staphylocoques dorés résistants à la méticilline, Aspects fondamentaux et cliniques p 15-23, Edition RPR Bellon

Marrack, P. and J. Kappler (1990). "The staphylococcal enterotoxins and their relatives." Science **248**(4959): 1066.

Mastouri, M., M. Nour et al. (2006)."Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline : détection des premières souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides en Tunisie " pathologie Biologie **54** : 33-36

Mesli, Y., L. Armand-Lefevre et al. (2006)."Portage nasal de *Staphylococcus aureus* à Tlemcen (Algérie)" Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI), Poster N° 432/71p

Moreillon, P.H., J. Etienne, F.W .Goldstein (1996)."Peptidoglycane et protéines de liaison à la pénicilline chez *S.aureus* résistant à la méticilline." Les Staphylocoques dorés résistants à la méticilline, Aspects fondamentaux et cliniques p 15-23, Edition RPR Bellon

Naimi, T. S., K. H. LeDell et al. (2003)."Comparison of Community-and Health Care-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection" JAMA **290**(22): 2976-2984.

Narita, S., J. Kaneko et al. (2001). "Phage conversion of Panton-Vlentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* : molecular analysis of a PVL-converting phage" Gene **268** :195-206

Nguyen Van, J.C., M.D. Kitzis et al. (2006)."Détection de la colonisation nasale de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline : Etude prospective comparant l'amplification génique temps réel vs les milieux chromogènes sélectifs" Pathologie Biologie **54** :285-292.

Nour, M., M. Mastouri et M. Ben Nejma. (2005). " Le staphylocoque doré résistant à la méticilline : émergence et base moléculaire de la résistance." pathologie Biologie **53** : 334-340

O'Brien, F.G., J.W. Pearman et al. (1999)."Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak" Journal of Clinical Microbiology **37**: 2858-2862

Oliveira, D. C. and H.de Lencastre (2002)."Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistan *Staphylococcus aureus*" Antimicrobial Agents and Chemotherapy **46**(7): 2155-2161.

Oliveira, D et al. (2001). "Molecular of pandemic clones" Microbiology And Resistance **7**(4):349-361

Rahal, K et al. (2005)." Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale" 4^{ème} édition p : 13, 25 et 104.

Rahal, K et al. (2005 et 2006). "Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques" 7^{ème} rapport d'évaluation (Whonet).

Rahal, K et al. (2005 et 2006). "Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques" 8^{ème} rapport d'évaluation (Whonet).

Ramdani-Bouguessa, N., M. Bes et al. (2006). "Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Resistant to Multiples Antibiotics and Carrying the Panton-Valentine Leukocidin Genes in an Algiers Hospital" Antimicrobial Agent and Chemotherapy **50** (3): p1-3.

Reverdy, M.E., H. Meugnier et al. (2003). "Epidemiologie des SARM en France, "Résistance aux antibiotique et infection nosocomiale, Surveillance des maladie infectieuse" Rapport du CNR de France 2003

Shore, A., A. S. Rossney, et al. (2005). "Seven novel variants of the Staphylococcal Chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **49**(5):2070-2083.

Sola, C., P. Cortes, et al. (2006). "Evolution and molécular characterization of méthicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Epidemic and Sporadic Clones in Cordoba Argentina" Journal of Clinical Microbiologiy **44**(1): p 192-200.

Stapleton, P.D. and P.W Taylor (2002). "Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* mechanisme and modulation" Science Progress **85**(1): 57-72.

Takayuki, Y., K. Nishifuji, et al. (2002). " Identification of *Staphylococcus aureus* etd Pathogenicity Island Wich Encodes a Novel Exfoliative Toxin, ETD, and EDIN-B." Infection and Immunity **70**(10): p5835-5845.

Tristan, A., A. Y. Dagnra et al. (2004). "Les nouveaux visages de *Staphylococcus aureus*." La lettre de l'infectiologie (**5**) : 153- 157.

Tristan, A., M. Bes et al. (2006) "Global Distribution of Panton-Valentine Leukocidin- positive Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*"Emerging Infectious Diseases **13** (4) : 594-600.

Tristan, A., T. Ferry et al. (2007). "Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*" journal of Hospital Infection **65**(S2): 105-109

VandenBergh, M. F., E. P. Yzerman, al. (1999). "Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state." Journal of Clinical microbiology **37** (10): 3133-3140

Van der Mee-Marquet, N., G.Lina, et al. (2003)"Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain containing the TSST-1 gene in Europe: an alert for neonatologist." Journal of Clinical Microbiology. **41**: 4883-4884.

Vandenesch, F, J. Etienne, F.W .Goldstein (1996)."Génétique, régulation et expression de la résistance à la méticilline chez *S.aureus*" Les Staphylocoques dorés résistants à la méticilline, Aspects fondamentaux et cliniques : p 15-23

Vandenesch, F, T. Naimi et al. (2003)."Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence" Emerging Infectious Diseases **9** (8): 978-994.

Weber, J. T (2005)."Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*" Clinical Infection Diseases **41**: S269-272

Wertheim, H. F., D.C.Melles, et al. (2005)."The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections." Lancet Infectious Diseases **5**(12): 751-762.

Williams, R. E. (1961). "Carriage of *Staphylococci* in the newborn. A Comparison of infants born at home with those born in hospital." Lancet **2**: 173-175.

Williams, R. E. (1963). "Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance." Bacteriology Review **27**: 56-71.

Annexes

Annexe 1 : La composition des milieux de culture utilisés

1 Gélose nutritive (GN)

Milieu universel pour la culture, croissance, et la numération des germes peu exigeants dans les eaux, les boissons et produits biologiques.

Composition type (g/l)

-Peptone	10
-Extrait de viande	3
-Extrait de levure	3
-Chlorure de sodium	5
-Agar	18

Préparation

Dissoudre 39g de la poudre gélose nutritive dans un litre d'eau distillé ; autoclaver 15 min à 121°C ; pH=7,3+/-0,2.

2 Gélose au sang frais (GSF)

Milieu enrichi au sang frais, pour la culture des germes exigeants

Préparation

Préparer une gélose nutritive et lui rajouter à une température qui avoisine les 40 °C, 5% de sang de mouton ou sang de cheval ou à défaut du sang humain.

3 Gélose CHAPMAN

Milieu sélectif permettant l'isolement et l'enrichissement des Staphylocoques pathogènes dans les produits biologiques en microbiologie.

Composition type (g/l)

-Extrait de viande	3
-Extrait de levure	3
-Tryptone	5
-Peptone bactériologique	10
-Chlorure de sodium	70
-Mannitol	10
-Rouge de phénol	0,05
-Agar	18

Préparation

Dissoudre 119,05 g de la poudre Chapman dans un litre d'eau distillée ; autoclaver 15 min à 121°C ; couler en boîte de Pétri. Les boîtes sont limpides et de couleur rouge ; pH=7,4(+/- 0,1)

Emploie et Interprétation

Ensemencer massivement la boîte en surface avec l'échantillon à cause de la forte action inhibitrice du milieu. Incuber 24 à 48h à 37°C.

Colonies	Micro-organismes
Avec un halo jaune lumineux, forte croissance	Mannitol positif : <i>Staphylococcus aureus</i> ou autre <i>Staphylococcus</i> Mannitol + tel que <i>S. saprophyticus</i>
Petites et sans virage de couleur	Mannitol négatif : SCN

4 Gélose MUELLER HINTON

Milieu non sélectif pour l'étude de la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes envers les antibiotiques et les sulfamides.

IL constitue également en excellent milieu de base pour la fabrication de gélose au sang.

Composition type (g/l)

-Extrait de viande	3
-Hydrolysate acide de caséine	17,5
-Amidon	1,5
-Agar	16

Préparation

Dissoudre 38 g/L ; autoclaver 15 min à 121°C ; pH=7,3.

5 Gélose MUELLER HINTON additionnée de 4% de NaCl

Milieu hypersalé pour la détection de la résistance intrinsèque hétérogène de *Staphylococcus aureus* au β lactamines.

Composition type (g/l)

-Extrait de viande	3
-Hydrolysate acide de caséine	17,5
-Amidon	1,5
-Chlorure de sodium	40
-Agar	16

Préparation

Dissoudre 78g/l dans un litre d'eau distillée ; autoclaver 15min à 121°C, pH=7,4+/-0,2.

Emploie et interprétation

IL est conseillé de tester la résistance à l'oxacilline exclusivement et d'incuber à 37°C.

La présence de colonies isolées à l'intérieur de la zone d'inhibition permet de déceler ce type de résistance même si le diamètre d'inhibition est analogue à celui des souches sensibles.

6 GÉLOSE P

Utilisée pour l'étude des staphylocoques par le Centre National de Référence des Toxémies à Staphylocoques. Elle permet de distinguer les différents morphotypes des colonies.

Composition

- Bacto Peptone
- Extrait de levure
- Chlorure de sodium
- Bacto Agar
- Glucose anhydre
- Eau distillée versol

Préparation

Chauffer 10 litres d'eau distillée, incorporer 100 g de poudre de BactoPeptone, 50 g d'extrait de levure, 50 g de Chlorure de sodium, 10 g de Glucose et 170 g de Bacto Agar ou qsp 10 litres en fonction de l'agar utilisé et remuer jusqu'à complète dissolution, porter à ébullition une à deux minutes.

Vérifier le pH (bandelette papier pH), celui-ci doit être compris entre 7 et 7,2. Sinon ajuster avec de la soude 10 N.

Répartir en flacons de 1 litre (volume non précis) Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

Conservation

Les flacons sont conservés 1 an maximum à température ambiante

Annexe 2 :

1-Questionnaire des infections à *S.aureus*

LABORATOIRE CENTRAL DE MICROBIOLOGIE
CHU MUSTAPHA

FICHE DE RENSEIGNEMENT (SOUCHE COMMUNAUTAIRE MRSA)

Numéro :	Date de prélèvement :
Nom :	Age :
Prénom :	Sexe :
Adresse :	
Provenance :	siège :
Date d'hospitalisation :	
Type de prélèvement :	
Antibiothérapie en cours :	antibiothérapie instaurée :

Tableau clinique :
Atteintes associées :

Hospitalisation dans l'année :

- 1 Dialyse :
- 2 Chirurgie :
- 3 Contact avec sujets hospitalisés, colonisés ou infectés :

Notion d'infections récurrentes :
Antibiothérapie récente : (<1an) :
Cathétérisme ou autre matériel :
Pathologie chronique grave : diabète, cancer, insuffisance rénale.

Toxicomanie intraveineuse : contact avec personnel médical :

Cas familiaux :

Autres observations :

2- Questionnaire du portage nasal

LABORATOIRE CENTRAL DE MICROBIOLOGIE
CHU MUSTAPHA

FICHE DE RENSEIGNEMENT (Portage à *S.aureus*)

N° soucier :	Date de prélèvement :
Nom :	sexe :
Prénom :	age :
Adresse :	profession :-médecin
Tel :	-infirmier
Provenance :	-patient
Date d'hospitalisation :	-garde malade
Date de la dernière hospitalisation	-personnel d'hygiène

Tableau clinique ou motif d'hospitalisation :

Etat à l'admission (plaie infectée...)

Antibiothérapie en cours :

Traitement reçu :

Antécédents d'infection à *S.aureus*

Type d'infection : -communautaire
-nosocomiale

As t il subit une Chirurgie :

Est il entré en contact avec des sujets hospitalisés ou personnel hospitalier :

Est il entré en Contact avec des sujets colonisés ou infectés :

As t il une voie d'abord : cathétérisme ou autre matériel :

Pathologie chronique : diabète, cancer, insuffisance rénale précisez :

As t il une notion d'hospitalisation remontant à moins d'un an :

Nombre de personne vivant sous le même toit

Type d'habitation

Fumeur :

Toxicomanie intraveineuse :

Notion de suppurations cutanées dans l'entourage

Autres observations :

Annexe 3 : Composition de la galerie API ID 32 TAPH et tableau de lecture

					Résultats	
					Négatif	Positif
1.0	<u>URE</u>	Urée	1.12	UREase	Jaune	Orange Rouge-violet
1.1	<u>ADH</u>	L-arginine	0.76	Arginine Dihydrolase	jaune	Orange-rouge
1.2	<u>ODC</u>	L-ornithine		Ornithine DéCarboxylase		
1.3	<u>ESC</u>	Esculine Citrate de fer	0.224 0.032	Hydrolyse (ESCuline)	Incolore-gris pâle	Brun-noir
1.4	GLU	D-glucose	0.56	Fermentation glucose	Rouge Rouge- orangé	Jaune Jaune-orangé
1.5	FRU	D-fructose	0.56	Fermentation fructose		
1.6	MNE	D-mannose	0.56	Fermentation mannose		
1.7	MAL	D-maltose	0.56	Fermentation maltose		
1.8	LAC	D-lactose	0.56	Fermentation lactose		
1.9	TRE	D-tréhalose	0.56			
1.A	MAN	D-mannitol	0.56	Fermentation tréhalose		
1.B	RAF	D-raffinose	0.56	Fermentation mannitol		
1.C	RIB	D-ribose	0.56	Fermentation raffinose		
1.D	CEL	D-cellobiose	0.56	Fermentation ribose Fermentation cellobiose		
1.E 1.F	Cupules vides					
0.0	NIT	Potassium nitrate	0.054	Réduction nitrates	incolore	Rose pâle
0.1	VP	Sodium pyruvate	0.475	Production d'acétoine (Voges Proskauer)	incolore	Rose- Rouge
0.2	β GAL	2-naphtyl- β D- galactopyranoside	0.0364	β Galactosidase	Incolore Pourpre pâle Orange pâle	pourpre
0.3	ArgA	L-arginine β - naphtylamide	0.0172	Arginine Arylamidase	Incolore orange pâle	Orange
0.4	PAL	2-naphtyl phosphate	0.0123	Phosphatase Alcaline	Incolore Pourpre pâle Orange pâle	Pourpre
0.5	PyrA	Acide pyroglutamique- β - naphtylamide	0.0128	Pyrrolidonyl Arylamidase	Incolore orange pâle	Orange
0.6	NOVO	Novobiocine	0.0018	Résistance Novobiocine	Rouge Rouge- Orangé	Jaun Jaune- Orangé
0.7	SAC	D-saccharose	0.56	Fermentation saccharose		
0.8	NAG	N-acétyl-glucosamine	0.56	Fermentation N-Acétyl Glucosamine		
0.9	TUR	D-turanose		Fermentation turanose		
0.A	ARA	L-arabinose	0.56 0.56	Fermentation arabinose		
0.B	β GUR	4-nitrophényl- β D- glucuronide	0.0158	β Glucuronidase		
0.C 0.D 0.E 0.F	Cupules vides					

Annexe 4 : les valeurs critiques des diamètres zones d'inhibition de l'antibiogramme selon le CLSI (clinical and laboratory standards institute)

		Diamètres critiques (mm)		
		Résistant	Intermédiaire	Sensible
<u>β-lactamines :</u>				
Pénicilline	10 UI	≤28	---	≥29
Oxacilline*	5μg			≥20
Cefoxitine	30μg	≤19	---	≥20
<u>Aminosides :</u>				
Gentamicine	10μg	≤12	13-14	≥15
Kanamycine	30μg	≤14	15-16	≥17
<u>Macrolides :</u>				
Erytromycine	15μg	≤13	14-22	≥23
Lincosamine*	2μg	≤14	15-20	≥21
Pristinamicine*	15μg	< 19	---	≥22
<u>Glycopeptides :</u>				
Vancomycine	30μg	----	---	≥15
Teicoplanine	30μg	≤10	15-17	≥14
<u>Quinolones :</u>				
Ofloxacine	5μg	≤14		≥18
<u>Autres :</u>				
Cotrimoxazole		≤10	11-15	≥16
Rifampicine	15μg	≤16	17-19	≥20
Tétracycline	30μg	≤14	15-18	≥19
Fosfomycine	30μg	≤12	13-17	≥18
Acide fucidique*	10μg	<15	---	>22
Mupirocin	5 μg	<13	---	≥14

* ces zones critiques correspondent aux valeurs de la SFM : société Française de microbiologie.

Annexe 5 :

1- Préparation du milieu MH à 4 % de NaCl + 6 µg d'oxacilline

La préparation de la solution d'oxacilline à 6µg /ml se fait de la manière suivante :

Nous diluons 6mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1g) dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis nous faisons une dilution au dixième. Nous répartissons la solution obtenue à raison de 2ml par tube ; ainsi conditionnées ces solutions peuvent être conservées à -20°C pendant une semaine, au bout de laquelle elles doivent être renouvelées.

Ensuite, nous mettons 2ml de cette solution dans une boîte de 90mm de diamètre, auquel nous ajoutons 18ml de gélose Mueller Hinton additionnée de 4% de NaCl, puis nous mélangeons en faisant des mouvements rotatoires.

2- 1- Préparation des milieux Chapman et GSF à 4 µg/ml d'oxacilline

La préparation de la solution d'oxacilline à 4µg /ml dans les deux milieux Chapman ou GSF se fait de la même :

Nous diluons 4mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1g) dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis nous faisons une dilution au dixième. Nous répartissons la solution obtenue à raison de 25ml dans un flacon de 225 ml de gélose Chapman ou de gélose au sang en surfusion à 45°C

Ensuite, nous coulons ces géloses dans des boîtes de pétri.

Annexe 6 : la répartition des huit PCR

La première PCR regroupe la recherche des gènes *gyr* et *mec A*.

La deuxième PCR regroupe les quatre allèles des gènes *agr*.

La troisième PCR appelé PCR 1 regroupe les gènes *LukM*, *seh*, *sem*, *tst*.

La quatrième PCR appelé PCR 2 regroupe les gènes *etb*, *sed*, *selr*, *sec*, *eta*.

La cinquième PCR appelé PCR 3 regroupe les gènes *sea*, *pvl*, *hib*, *selp*.

La sixième PCR appelé PCR 4 regroupe les gènes *seb*, *etv1*, *selq*.

La septième PCR appelé PCR 5 regroupe les gènes *etd*, *sel*, *seo*.

La huitième PCR appelé PCR 6 regroupe les gènes *edin*, *esk*.

Annexe 7: Les amorces utilisées

Multiplex	Toxine	Gène	Nom amorce	Séquence	taille amorce	taille fragment [bp]
mecA / Gyrase						
R-OXA		<i>mecA</i>	mecA-1	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	22n	533
			mecA-2	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	22n	
Gyrase S.aureus		<i>gyr</i>	gyr-1	AGT ACA TCG TCG TAT ACT ATA TGG	24n	280
			gyr-2	ATC ACG TAA CAG TTC AAG TGT G	22n	

AGR	PAN 1 AGR	<i>agr 1</i>	Pan 1 agr	5' ATG CAC ATG GTG CAC ATG C.....3'		
	AGR 1	<i>agr 1</i>	agr 1	5' GTC ACA AGT ACT ATA AGC TGC GAT 3'	24n	440
	AGR 2	<i>agr 2</i>	agr 2	5' TAT TAC TAA TTG AAA AGT GGC CAT AGC 3'	27n	550
	AGR 3	<i>agr 3</i>	agr 3	5' GTA ATG TAA TAG CTT GTA TAA TAA TAC CCA G 3'	31n	300
	AGR 4	<i>agr 4</i>	agr 4	5' CGA TAA TGC CGT AAT ACC CG 3'	20n	650

PCR1	Luk-M	<i>lukM</i>	lukM-1	TGG ATG TTA CCT ATG CAA CCT AC	23n	780
			lukM-2	GTT CGT TTC CAT ATA ATG AAT CAC TAC	27n	
	SEH	<i>seh</i>	seh-1	CAA TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG	24n	376
			seh-2	CAT CTA CCC AAA CAT TAG GAC C	22n	
	SEM	<i>sem</i>	sem-1	CTA TTA ATC TTT GGG TTA ATG GAG AAC	27n	324
			sem-2	TTC AGT TTC GAC AGT TTT GTT GTC AT	26n	
	TSST-1	<i>tst</i>	tst-1	TTC ACT ATT TGT AAA AGT GTC AGA CCC ACT	30n	180
			tst-2	TAC TAA TGA ATT TTT TTA TCG TAA GCC CTT	30n	

PCR2	ETB	<i>etb</i>	etb-1	CAG ATA AAG AGC TTT ATA CAC ACA TTA C	28n	612
			etb-2	AGT GAA CTT ATC TTT CTA TTG AAA AAC ACT C	31n	
	SED	<i>sed</i>	sed-1	GAA TTA AGT AGT ACC GCG CTA AAT AAT ATG	30n	492
			sed-2	GCT GTA TTT TTC CTC CGA GAG T	22n	
	SER	<i>ser</i>	ser-1	AGC GGT AAT AGC AGA AAA TG	20n	363
			ser-2	TCT TGT ACC GTA ACC GTT TT	20n	
	SEC	<i>sec</i>	sec-1	CTT GTA TGT ATG GAG GAA TAA CAA AAC ATG	30n	275
			sec-2	CAT ATC ATA CCA AAA AGT ATT GCC GT	26n	
	ETA	<i>eta</i>	eta-1	ACT GTA GGA GCT AGT GCA TTT GT	23n	190
			eta-2	TGG ATA CTT TTG TCT ATC TTT TTC ATC AAC	30n	

PCR3	SEA	<i>sea</i>	sea-1	GAA AAA AGT CTG AAT TGC AGG GAA CA	26n	560
			sea-2	CAA ATA AAT CGT AAT TAA CCG AAG GTT C	28n	
	PVL	<i>lukSF-PV</i>	pvl-1	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A	31n	433
			pvl-2	GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC	27n	
	HLB	<i>hlb</i>	hlb-1	GTG CAC TTA CTG ACA ATA GTG C	22n	309
			hlb-2	GTT GAT GAG TAG CTA CCT TCA GT	23n	
	SEP	<i>sep</i>	sep-1	GAA TTG CAG GGA ACT GCT	18n	182
			sep-2	GGC GGT GTC TTT TGA AC	17n	

PCR4	SEB	<i>seb</i>	seb-1	ATT CTA TTA AGG ACA CTA AGT TAG GGA	27n	404
			seb-2	ATC CCG TTT C AT AAG GCG AGT	21n	
	SEQ	<i>seq</i>	seq-1	ACC TGA AAA GCT TCA AGG A	19n	204
			seq-2	CGC CAA CGT AAT TCC AC	17n	

PCR5	ETD	<i>etd</i>	etd-1	CAA ACT ATC ATG TAT CAA GGA TGG	24n	358
			etd-2	CCA GAA TTT CCC GAC TCA G	19n	
	SEL	<i>sel</i>	sel-1	GCG ATG TAG GTC CAG GAA AC	20n	235
			sel-2	CAT ATA TAG TAC GAG AGT TAG AAC CAT A	28n	
	SEO	<i>seo</i>	seo-1	AGT TTG TGT AAG AAG TCA AGT GTA GA	26n	180
			seo-2	ATC TTT AAA TTC AGC AGA TAT TCC ATC TAA C	31n	

PCR6	EDINB	<i>edinb</i>	EDINB-1	GAC TTA GTT GAA GCT ACT AAA TGG GG	26n	560
			EDINB-2	CAG CAT ATT CTG TCC CTC TAG G	22n	
	EDINAC	<i>edinac</i>	EDINAC-1	GAT TTA GAT GAG GCA ACT AAA TGG GG	28n	
	EDINAC	<i>edinac</i>	EDINAC-2	CAG CGT ATT CTG TGC CTC TAG G	22n	
	SEK	<i>sek</i>	SEK-1	ATG CCA GCG CTC AAG GC	17n	234
	SEK	<i>sek</i>	SEK-2	AGA TTC ATT TGA AAA TTG TAG TTG ATT AGC T	31n	
	SEK	<i>sek</i>	SEK-3	TGC CAG CGC TCA AGG TG	17n	

Annexe 8: Mélanges réactionnels (MIX)

Mix pour amplification des gènes *mec A* et *gyr A* ; PCR double à 1X

Réactifs utilisés au cours de l'amplification :	Quantité en µl pour un essai
Tampon 10 X sans MgCl ₂	4
MgCl ₂ 50 mM	4
Amorces solution emploi à 2 pico moles / µl	P1 : 2 P4 : 2
DNTP	4
Eau PPI	15
Taq polymérase	0,3

Mix pour amplification des gènes *agr1/2/3/4* ; PCR multiplex à 1X

Réactifs utilisés au cours de l'amplification :	Quantité en µl pour un essai
Tampon 10 X sans MgCl ₂	5
MgCl ₂ 50 mM	4
Amorces : Agr 1 , Agr 2, Agr 3, Agr 4 , Pan agr	P1 à 2 P5
DNTP	4
Eau PPI	22
Taq polymérase	0,4 ou 0,5 selon les lots

Mix pour amplification des gènes *luk M/seh/sem/tst* ; PCR N°1, multiplex à 1X

Réactifs utilisés au cours de l'amplification :	Quantité en µl pour un essai
Tampon 10 X sans MgCl ₂	4
MgCl ₂ 50 mM	4
Amorces	Chaque amorce 1,5
DNTP	4
Eau PPI	11
Taq polymérase	0,4

Mix pour amplification des gènes *etb/sed/ser/sec/eta* ; ; PCR N°2, multiplex à 1X

Réactifs utilisés au cours de l'amplification :	Quantité en µl pour un essai
Tampon 10 X sans MgCl ₂	5
MgCl ₂ 50 mM	5
Amorces	Chaque amorce 1,5
DNTP	5
Eau PPI	15
Taq polymérase	0,4

Mix pour amplification des gènes *sea/pvl/hib/selp* ; PCR N°3, multiplex à 1X

utilisés au cours de l'amplification :	Quantité en µl pour un essai
Tampon 10 X sans MgCl ₂	5
MgCl ₂ 50 mM	5
Amorces	Chaque amorce 1,5
DNTP	4
Eau PPI	19
Taq polymérase	0,4 ou 0,5

Mix pour amplification des gènes *seb/etv/selq* ; PCR N°4, multiplex à 1X

Réactifs utilisés au cours de l'amplification :	Quantité en µl pour un essai
Tampon 10 X sans MgCl ₂	4
MgCl ₂ 50 mM	4
Amorces	Chaque amorce 1,5
DNTP	4
Eau PPI	24
Taq polymérase	0,4

Mix pour amplification des gènes : *etd/sel/seo* ; PCR N°5, multiplex à 1X

Réactifs utilisés au cours de l'amplification :	Quantité en µl pour un essai
Tampon 10 X sans MgCl ₂	4
MgCl ₂ 50 mM	3
Amorces	1,5
DNTP	4
Eau PPI	15
Taq polymérase	0,3

Mix pour amplification des gène: *edin A, B, C/sek* ; PCR N°6, multiplex à 1X

Réactifs utilisés au cours de l'amplification :	Quantité en µl pour un essai
Tampon 10 X sans MgCl ₂	4
MgCl ₂ 50 mM	4
Amorces	P1 à P7 1,5
DNTP	4
Eau PPI	13
Taq polymérase	0,3

Annexe 9 : Références des réactifs utilisés pour la PCR

- **ADN Polymérase ou EUROBLUETAQ**, c'est une ADN polymérase thermostable colorée de haute performance, livrée prête à l'emploi avec du **Tampon de réaction** à 10X **sans MgCl₂** et une **solution de MgCl₂** à 50mM (EUROBIO GAETAQ0264D).
- **Agarose standard** qualité biologie moléculaire 500 g (EUROBIO REF GEPAGA07-65)
- **DNTP**, ce sont les désoxyribonucléotides à 25 Mm chacun, le réactif est livrée en solution à 100 mM et est ensuite dilué au 1/20 dans de l'eau ppi. (EUROBIO REF GAEPCR11-5D)
- **Lysostaphine**, c'est une enzyme lytique spécifique aux staphylocoques, elle est livrée en poudre à 5 ou 15 mg et est solubilisée à 2 mg/ml. (SIGMA L 7386)
- **Phénol/ Chloroforme/ Alcool iso-amylque** reçu prêt à l'emploi ou à préparer (50 :48 :2) volume pour 100 ml (EUROBIO GEXPHE05-01).
- **Protéinase K**, c'est une enzyme de la famille des sérines protéases, à large spectre d'action, elle digère les protéines pour donner des petits peptides et acides aminés. Elle est livrée en solution à 20 mg/ml prête à l'emploi. (BIOFIDAL REF 6X03021)
- **TRIS EDTA (TE) pH 7**: composé de 10ml de Tris base 1M, de 2 ml de EDTA 0,5M et de 1000ml d'eau distillée, le tout autoclavé 10 min à 110°C
- **TBE (Tampon Tris Borate EDTA)**, livré à 10X, utilisé à 0,5X (EUROBIO REF GEPTBE00-08)
- **Syber Safe™ DNA Gel Strain** agent complexant, livré prêt à l'emploi. (INVITROGEN REF S33102)
- **Loading dye 6X** c'est le traceur reçu prêt à l'emploi (FERMENTAS REF #R0611)

Annexe 10

Tableau représentant la figure 26 :

Fréquence des *S.aureus* résistants et sensibles à la méticilline (MRSA, MSSA) dans la communauté et en milieu hospitalier.

Résistance à la méticilline	Communautaire		Nosocomial		Total	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
SASM	237	65%	172	51%	409	58%
SARM	128	35%	163	49%	291	42%
Total	365	100%	335	100%	700	100%

Tableau représentant la Figure 27 :

Répartition des SARM par service

Services	SARM	
	Nombres	Pourcentages
Dermatologie	85	47%
Orthopédie	15	8%
Diabétologie	15	8%
Chirurgie infantile	13	7%
Néonatalogie	11	6%
Neurochirurgie	7	4%
Chirurgie	5	3%
Pédiatrie	5	3%
Réanimation	5	3%
Urgences	4	2%
Pneumologie	3	2%
Gynécologie	3	2%
Ophthalmologie	3	2%
Gastrologie	2	1%
Médecine interne	2	1%
Cardiologie	1	1%
ORL	1	1%
Service des détenus	1	1%
Total	180	100%

Tableaux représentant la figure28 :

Résistance globale des *S.aureus* (n=700) par rapport aux antibiotiques

Antibiotiques testés	Résistance (en nombre)	Résistance (en pourcentage)	Sensibilité (en pourcentage)
Penicilline G	673	96%	4%
Oxacilline	293	42%	58%
Céfoxitine	205	29%	71%
Gentamicine	66	9%	91%
Kanamycine	324	46%	54%
Pristinamycine	31	4%	96%
Erythromycine	141	20%	80%
Lincomycine	76	11%	89%
Vancomycine	0	0%	100%
Teicoplanine	0	0%	100%
Cotrimoxazole	25	4%	96%
Ofloxacin	70	10%	90%
Tétracycline	288	41%	59%
Acide fusidique	277	40%	60%
Rifampine	11	2%	98%
Total	700	100%	0%

Résistance des *S.aureus* communautaires (n=365) par rapport aux antibiotiques

Antibiotiques testés	Résistance (en nombre)	Résistance (en pourcentage)	Sensibilité (en pourcentage)
Penicilline G	350	96%	4%
Oxacilline	129	35%	65%
Céfoxitine	81	22%	78%
Gentamicine	7	2%	98%
Kanamycine	144	39%	61%
Pristinamycine	3	1%	99%
Erythromycine	67	18%	82%
Lincomycine	20	5%	95%
Vancomycine	0	0%	100%
Teicoplanine	0	0%	100%
Cotrimoxazole	3	1%	99%
Ofloxacin	6	2%	98%
Tétracycline	152	42%	58%
Acide fusidique	130	36%	64%
Rifampine	4	1%	99%

Résistance des *S.aureus* hospitaliers (n=335) par rapport aux antibiotiques

Antibiotiques testés	Résistance (en nombre)	Résistance (en pourcentage)	Sensibilité (en pourcentage)
Penicilline G	323	96%	4%
Oxacilline	164	49%	51%
Céfoxitine	124	37%	63%
Gentamicine	59	18%	82%
Kanamycine	180	54%	46%
Pristinamycine	28	8%	92%
Erythromycine	74	22%	78%
Lincomycine	56	17%	83%
Vancomycine	0	0%	100%
Teicoplanine	0	0%	100%
Cotrimoxazole	22	7%	93%
Ofloxacine	64	19%	81%
Tétracycline	136	41%	59%
Acide fusidique	147	44%	56%
Rifampine	7	2%	98%

Tableau représentant la figure 29:

Profils de résistance des SARM les plus fréquents et leur répartition dans les milieux hospitaliers (n=163) et communautaires (n=128)

Profils de résistance des SARM les plus fréquents	Communautaire		Nosocomial		Total	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
pen,oxa,kan,tet,fuc	56	44%	42	26%	98	34%
pen,oxa,kan,ery,tet,fuc	26	20%	8	5%	34	12%
pen,oxa,kan	10	8%	8	5%	18	6%
pen,oxa,gen,kan,ofx,fuc	2	2%	11	7%	13	4%
pen,oxa,gen,kan,ery,lin,pri,ofx,fuc	1	1%	11	7%	12	4%
pen,oxa,kan,tet	5	4%	6	4%	11	4%
pen,oxa,kan,fuc	5	4%	3	2%	8	3%
pen,oxa,kan,ofx,fuc	0	0%	6	4%	6	2%
pen,oxa,gen,kan,ery,lin,pri,ofx,tet,fuc	0	0%	6	4%	6	2%
pen,oxa,kan,ery,lin,ofx,fuc	1	1%	5	3%	6	2%
pen,oxa,kan,ery	3	2%	2	1%	5	2%
pen,oxa,kan,ery,fuc	4	3%	1	1%	5	2%
pen,oxa,kan,ery,lin,tet,fuc	4	3%	1	1%	5	2%
Total	128	100%	163	100%	291	100%

Tableau récapitulatif des pathologies représentant les 120 souches ayant bénéficié de l'étude moléculaire

Pathologies	Communautaires		Nosocomiales		Totale	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
lésions bulleuses	6	5%	17	14%	23	19%
Suppurations	8	7%	14	12%	22	18%
Furonculose	12	10%	1	1%	13	11%
abcès	9	8%	2	2%	11	9%
Plaies opératoires	0	0%	10	8%	10	8%
ulcération	1	1%	5	4%	6	5%
Mal perforant plantaire	0	0%	2	2%	2	2%
Bactériémie	1	1%	6	5%	7	6%
infection ostéoarticulaire	3	3%	11	9%	14	12%
infection respiratoire	1	1%	3	3%	4	3%
Pneumopathie	2	2%	0	0%	2	2%
Infection oculaire	0	0%	3	3%	3	3%
Infection ORL	1	1%	0	0%	1	1%
Infection du SNC	0	0%	1	1%	1	1%
Infection urinaire	1	1%	0	0%	1	1%
Total	45	38%	75	63%	120	100%

Tableau représentant la figure 31 :

La fréquence de la toxine PVL dans les deux milieux, communautaire et nosocomial

	Communautaire		Nosocomiale		Total	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
PVL +	28	62%	33	44%	61	51%
PVL -	17	38%	42	56%	59	49%
Total	45	100%	75	100%	120	100%

Tableau représentant la figure 32 :

La répartition de la toxine PVL en fonction des différentes pathologies

Pathologies	PVL -		PVL +		Total	
	Nombre	pourcentage	Nombre	pourcentage	Nombre	pourcentage
Abcés	2	2%	9	8%	11	9%
Bactériemies	4	3%	3	3%	7	6%
Furonculoses	0	0%	13	11%	13	11%
Infections du SNC	1	1%	0	0%	1	1%
Infections oculaires	1	1%	2	2%	3	3%
Infections ORL	1	1%	0	0%	1	1%
Infections ostéoarticulaires	8	7%	6	5%	14	12%
Infections bronchiques	3	3%	1	1%	4	3%
Infections urinaires	1	1%	0	0%	1	1%
Lésions bulleuses	12	10%	11	9%	23	19%
Infections pieds diabétiques	1	1%	1	1%	2	2%
Plaies opératoires	6	5%	4	3%	10	8%
Pneumopathies	1	1%	1	1%	2	2%
Suppurations	13	11%	9	8%	22	18%
Ulcérations	5	4%	1	1%	6	5%
Total	59	49%	61	51%	120	100%

Tableau représentant la figure 35 : Représentation globale de la résistance des souches isolées de portage nasal

Antibiotiques testés	Résistance (en nombre)	Résistance (en pourcentage)	Sensibilité (en pourcentage)
Penicilline G	55	98%	2%
Oxacilline	26	46%	54%
Gentamicine	17	30%	70%
Kanamycine	29	52%	48%
Pristinamycine	6	11%	89%
Erythromycine	10	18%	82%
Lincomycine	10	18%	82%
Vancomycine	0	0%	100%
Teicoplanine	0	0%	100%
Cotrimoxazole	1	2%	98%
Ofloxacin	15	27%	73%
Tétracycline	17	30%	70%
Acide fusidique	32	57%	43%
Rifampine	0	0%	100%
Mupirocine	0	0%	100%

Résumé

Résumé

Staphylococcus aureus est l'un des principaux agents étiologiques des infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que des syndromes liés à l'action des toxines.

Ces deux dernières décennies, *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) a augmenté en fréquence en tant qu'agent d'infection nosocomiale dans bon nombre de régions du monde. Des études épidémiologiques moléculaires récentes ont établi que la résistance à la méticilline est acquise par *S. aureus* en procédant par l'intégration d'un îlot important de résistance génomique appelée cassette chromosomique mec du staphylocoque (SCCmec).

De plus, depuis la fin des années 1990, nous assistons à l'émergence de SARM d'origine communautaire (SARM-C) chez des sujets jeunes sans facteurs de risque. Ces SARM-C contiennent les gènes de la leucocodine de Pantone- Valentine (toxine dermonécrotique) et occasionnent des infections cutanées suppuratives et profondes graves telles que la pneumonie nécrosante. Il apparaît aussi que ces SARM associés à la PVL sont hautement endémiques en Algérie, de ce fait la probabilité d'un tel type d'infection (pneumonies nécrosantes), faible jusqu'à présent, s'accroît considérablement.

Par ailleurs, le portage nasal constitue l'un des principaux facteurs de transmission de ces infections à *S.aureus*, et à SARM, de ce fait afin de limiter cette transmission dans la communauté ainsi qu'à l'hôpital, il est nécessaire d'identifier la totalité du réservoir des SARM, ce qui implique des dépistages dans la communauté mais aussi dans le milieu hospitalier incluant le dépistage des patients dès l'admission à l'hôpital ainsi que le dépistage du personnel soignant.

Notre étude s'est focalisée sur les thématiques suivantes : (i) déterminer la fréquence des infections communautaires et nosocomiales à *S.aureus* ; (ii) comparer sur le plan moléculaire les souches communautaires et les souches nosocomiales ; (iii) déterminer le portage de *S.aureus* et de SARM en milieu hospitalier, dans un service de haute fréquence chez les patients à l'admission et parmi le personnel soignant.

Mots clés : *S.aureus*, SARM, PVL, communautaire, nosocomiale, portage.