

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

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

En Sciences Vétérinaires

Thème :

Détection de gènes codant pour des entérotoxines et de la résistance aux antibiotiques chez des staphylocoques isolés de différentes matrices alimentaires

Présentée par : **ACHEK Rachid**

Soutenue le 03/07/2019 devant le jury :

| | | | |
|---------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|
| Mme. BOUAYAD Leila | Maître de conférences A | Présidente | ENSV-Alger |
| Mr. HAMDY Taha-Mossadak | Professeur | Directeur de thèse | ENSV-Alger |
| Mr. EL-GROUD Rachid | Professeur | Examineur | ISV-Constantine |
| Mme. DIB Amira L | Maître de conférences A | Examinatrice | ISV-Constantine |
| Mr. HOUICHER Abderrahmane | Maître de conférences A | Examineur | Université Laghouat |

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu le tout puissant, de m'avoir guidé vers la science et le savoir et de m'avoir donné courage et volonté pour achever ce modeste travail.

Je tiens à exprimer le témoignage de toute ma gratitude et mes remerciements :

A Monsieur HAMDI Taha-Mossadak

Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger
Pour m'avoir encadré et guidé dans ce travail;
Pour l'aide, les conseils et les encouragements qu'il m'a prodigué ;
Pour sa rigueur et sa disponibilité

Mon respect et mes chaleureux remerciements

A Mme. BOUAYAD Leila

Maître de conférences A, à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger
Qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury d'évaluation de cette thèse.
Merci pour l'intérêt qu'elle a accordé au sujet et pour ses encouragements, sa disponibilité et son écoute.

A Mr EL-GROUD Rachid

Professeur à l'ISV-Constantine
Qui me fait l'honneur d'accepter d'examiner et d'évaluer ce travail
Mes plus sincères remerciements

A Mme DIB Amira L.

Maître de conférences A à l'ISV-Constantine
Pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail
Mes remerciements et respects

A Mr HOUICHER Abderrahmane

Maître de conférences A à l'université de Laghouat
Qu'il soit vivement remercié pour avoir accepté d'examiner ce travail.
Remerciements et hommages respectueux

Au Dr. Zafer CANTEKIN

De la Faculté de Médecine Vétérinaire, de l'Université Mustafa Kemal,
Turquie.

Pour son accueil chaleureux, son aide précieuse, ses encouragements lors et après mon stage.

Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Merci à toute l'équipe du laboratoire Microbiologie.

A Mr NABI Ibrahim

Auquel des remerciements sur papier ne suffiront jamais à traduire ma gratitude envers lui, pour son soutien, son aide et ses encouragements continuels durant toutes les années de réalisation de ce travail.

Aux Dr. Hosny Hassan El-Adawy, Dr Helmut Hotzel, Pr Heinrich Neubauer de l'Institute of Bacterial Infections and Zoonoses (IBIZ), Jena, Allemagne.

Qu'ils trouvent ici mes témoignages et mes reconnaissances pour l'accueil, l'aide et leurs encouragements.

A toutes celles et ceux qui m'ont soutenu et aidé, de près ou de loin, dans l'élaboration de ce modeste travail.

Qu'ils trouvent ici, l'expression de ma reconnaissance

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu le tout puissant, ce travail fut accompli et je le dédie à :

A ma chère mère, pour ses sacrifices, celle qui m'a entourée de son amour et de son affection, je la remercie pour le soutien moral dans les moments les plus difficiles, que Dieu la protège.

A ma belle femme, pour sa tendresse, elle n'a cessé de me soutenir et de m'encourager. Sa présence m'a procuré que de confiance et stabilité. Tu es ma source de bonheur et d'espoir. A toi je dédie ce travail et je te prie de trouver l'expression de mon sincère attachement.

A mon fils : Younes Abdessalam

A ma sœur, à toi je dédie ce travail, tu trouve ici mon témoignage de mon attachement

A toute ma famille

A tous mes amis.

A tous ceux qui ont croisé de près ou de loin mon chemin et qui m'ont permis d'arriver là où je suis.

Rachid

Tables des matières

Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des abréviations
Liste des productions scientifiques
Résumés

| | Page |
|---|-------------|
| Introduction générale | 1 |
| Synthèse bibliographique | |
| Chapitre I : Généralités sur les Staphylocoques | |
| 1. Historique | 4 |
| 2. Habitat | 4 |
| 3. Taxonomie..... | 5 |
| 4. Caractéristiques morphologiques | 5 |
| 5. Caractères culturels | 5 |
| 6. Caractères biochimiques | 6 |
| 7. Pouvoir pathogène..... | 7 |
| 7.1. De l'habitat à la colonisation | 7 |
| 7.2. De la colonisation à l'infection | 7 |
| 7.3. Les infections suppuratives | 9 |
| 7.4. Infections associées à une bactériémie | 10 |
| 7.5. Pathologies toxiques | 10 |
| 7.5.1. Toxi-infections alimentaires | 10 |
| a. Définition | 10 |
| b. Incidence et manifestations cliniques | 10 |
| c. Aliments incriminés et mode de contamination | 12 |
| 7.5.2. Le syndrome d'exfoliation généralisée ou staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) | 13 |
| 7.5.3. Le syndrome de choc toxique staphylococcique..... | 14 |
| Chapitre II : Les entérotoxines staphylococciques | |
| 1. Introduction | 15 |
| 2. Nomenclature | 15 |
| 3. Support génétique..... | 16 |
| 3.1. Îlots de pathogénicité staphylococciques | 16 |
| 3.2. Îlots génomiques mobiles | 17 |
| 3.3. Cluster des gènes des entérotoxines | 17 |
| 3.4. Casette chromosomique staphylococcique(SCC)..... | 15 |
| 3.5. Bactériophages (prophages)..... | 18 |
| 3.6. Plasmides | 18 |
| 4. Structures moléculaires des entérotoxines staphylococciques | 19 |
| 5. Caractéristiques biologiques des entérotoxines staphylococciques | 20 |
| 5.1. Activité émétique | 20 |
| 5.2. Activité superantigénique | 22 |
| 6. Production des entérotoxines staphylococciques..... | 23 |

| | |
|---|----|
| 6.1. Régulation de la production..... | 23 |
| 6.2. Facteurs influençant la production | 24 |
| 7. Les entérotoxines chez les Staphylocoques à coagulase négative | 26 |
| 8. Conclusion..... | 26 |

Chapitre III : Résistance des staphylocoques aux antibiotiques

| | |
|--|----|
| 1. Introduction | 27 |
| 2. Résistance naturelle..... | 28 |
| 3. Résistance acquise | 28 |
| 4. Bactéries multi-résistantes | 31 |
| 5. Résistance aux β -Lactamines | 29 |
| 5.1. Historique..... | 29 |
| 5.2. Mécanismes de résistance | 29 |
| 5.3. Epidémiologie des SARMs..... | 32 |
| 5.3.1. SARMs liés aux infections hospitalières (SARM-H) | 32 |
| 5.3.2. SARMs liés infections communautaires (SARM-C)..... | 33 |
| 5.3.3. SARM-associé au bétail (SARM-AB) | 33 |
| 6. Résistance aux tétracyclines | 34 |
| 7. Résistance aux macrolides–Lincosamides–Streptogramine | 35 |
| 8. Résistance aux aminoglycosides | 36 |
| 9. Résistance aux glycopeptides | 37 |
| 10. Résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques à coagulase négative (SCN)..... | 39 |

Partie pratique

Chapitre IV : Matériel et méthodes

| | |
|---|----|
| 1. Contexte Méthodologique | 40 |
| 2. Méthodologie de travail | 41 |
| 3. Matériels utilisés | 42 |
| 3.1. Echantillonnage..... | 42 |
| 3.1.1. Echantillons alimentaires | 42 |
| 3.1.2. Echantillons biologiques | 43 |
| 3.1.2.1. Réalisation des prélèvements | 43 |
| 3.2. Matériels non biologiques | 44 |
| 4. Recherche et dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive dans les matrices alimentaires | 44 |
| 4.1. Prise d'essai | 44 |
| 4.2. Ensemencement | 45 |
| 4.3. Incubation | 45 |
| 4.4. Sélection des boîtes et interprétation | 45 |
| 4.5. Confirmation du genre (recherche de la coagulase et de la catalase) .. | 46 |
| 4.6. Confirmation de <i>Staphylococcus aureus</i> par le test latex | 47 |
| 4.7. Expression des résultats | 48 |
| 4.7.1. Cas général | 48 |
| 4.7.2. Estimation des petits nombres | 49 |
| 4.8. Méthode de répartition des échantillons selon le taux de contamination..... | 50 |
| 5. Analyse des échantillons d'origine clinique..... | 50 |
| 5.1. Enrichissement et isolement | 50 |
| 5.2. Caractéristiques macroscopiques des colonies | 51 |

| | |
|--|----|
| 5.3. Identification..... | 53 |
| 5.4. Purification des isolats | 53 |
| 6. Etude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques | 54 |
| 6.1. Technique de l'antibiogramme | 54 |
| 6.2. Application des disques d'antibiotiques | 55 |
| 6.3. Méthode de lecture | 55 |
| 7. Détermination de la CMI par bandelettes E-Test | 55 |
| 9. Conservation des isolats (Lyophilisation) | 57 |
| 10. Détection des gènes des entérotoxines, exfoliatines et toxine TSST-1 par Multiplex PCR | 57 |
| 10.1. Extraction et isolement de l'ADN | 58 |
| 10.2. Conditions de la PCR | 58 |
| 10. Détection des gènes de résistance aux antibiotiques (Simplex PCR).... | 60 |
| 11. Analyses Statistiques | 61 |

Chapitre V : Résultats et discussion

Résultats partie 1 :

| | |
|---|----|
| 1. Taux de contamination par les staphylocoques | 64 |
| 2. Taux de contamination par les staphylocoques à coagulase positive..... | 64 |
| 3. Taux de contamination des matrices alimentaires par les <i>S. aureus</i> | 68 |

| | |
|----------------------------------|----|
| Discussion partie 1 | 68 |
|----------------------------------|----|

Résultats partie 2 :

| | |
|---|----|
| 1. Prévalence des gènes codant les entérotoxines staphylococciques, les exfoliatines et la toxine TSST-1..... | 75 |
| 2. Profils génétiques | 78 |

| | |
|----------------------------------|----|
| Discussion partie 2 | 79 |
|----------------------------------|----|

Résultats partie 3 :

| | |
|--|----|
| 1. Sensibilité aux antibiotiques | 86 |
| 2. Détection de gènes de résistance aux antibiotiques (PCR Simplex) | 94 |
| 3. Corrélation entre résistance phénotypique et le support génétique | 96 |

| | |
|----------------------------------|----|
| Discussion partie 3 | 98 |
|----------------------------------|----|

| | |
|--|-----|
| 1. Résistance à l'oxacilline..... | 98 |
| 2. Résistance à la pénicilline..... | 101 |
| 3. Résistance à la gentamicine..... | 101 |
| 4. Résistance à l'érythromycine..... | 103 |
| 5. Résistance à la tétracycline..... | 104 |
| 6. Résistance à la vancomycine | 105 |
| 7. Antibiorésistance des staphylocoques à coagulase négative | 105 |

| | |
|----------------------------------|-----|
| Discussion générale | 106 |
|----------------------------------|-----|

| | |
|--|-----|
| Conclusion et recommandations | 108 |
|--|-----|

Références bibliographiques

Annexes

Publications scientifiques

Liste des Tableaux

| Intitulé | Page |
|--|------|
| Tableau II-1 : Caractéristiques biologiques des entérotoxines staphylococciques | 16 |
| Tableau II-2 . Facteurs influençant la croissance de <i>S.aureus</i> et la production des entérotoxines | 25 |
| Tableau IV.1 : répartition des échantillons selon leur nature | 43 |
| Tableau IV.2 : Recherche de la résistance à l'oxacilline et interprétation des tests (méthode de diffusion des disques) | 55 |
| Tableau IV.3 : Caractéristiques des amorces utilisées dans la réaction PCR Multiplex (Mehrotra et al, 2000) | 60 |
| Tableau IV.4 : Caractéristiques des amorces utilisées dans la réaction PCR Simplex | 62 |
| Tableau V.1 : Taux de culture par les staphylocoques (développement bactérien sur milieu Baird-Parker) | 64 |
| Tableau V.2 : Taux de contamination des différents échantillons par des SCP | 64 |
| Tableau V.3 : Répartition des échantillons analysés selon le taux de contamination par SCP (catégorie S, NS A). | 65 |
| Tableau V.4 : Répartition des isolats de <i>S.aureus</i> selon des échantillons positifs. | 68 |
| Tableau V.5 : Distribution des gènes codant les entérotoxines staphylococciques, les exfoliatines et la toxine TSST-1 pour les isolats alimentaires | 75 |
| Tableau V.6 : Distribution des gènes codant les entérotoxines staphylococciques, les exfoliatines et la toxine TSST-1 pour les isolats cliniques | 76 |
| Tableau V.7 : Profils génétiques des gènes codant les entérotoxines et la toxine TSST-1 pour tous les isolats. | 78 |
| Tableau V.8 . Distribution des taux de résistance aux antibiotiques des isolats de staphylocoques d'origine alimentaire et clinique | 87 |
| Tableau V.9 : Distribution des taux de résistance aux antibiotiques des isolats alimentaires selon la catégorie des échantillons. | 89 |
| Tableau V.10 : Distribution des taux de résistance aux antibiotiques des isolats cliniques selon la catégorie des échantillons | 90 |
| Tableau V.11 : Profils de l'antibiorésistance des isolats alimentaires et cliniques | 91 |
| Tableau V.12 : Distribution des taux de détection des gènes de résistance aux antibiotiques (isolats alimentaires et cliniques) | 95 |
| Tableau V.13 : Corrélation entre la résistance phénotypique (diffusion sur disque) et le support génétique (PCR) pour les isolats alimentaires et cliniques | 97 |

Liste des Figures

| Intitulé | Page |
|---|------|
| Figure I.1: Fréquence de portage de <i>S. aureus</i> par site corporel chez la population générale et les porteurs nasaux | 09 |
| Figure II.1: Les gènes d'entérotoxines portés sur des Îles génomiques mobiles | 17 |
| Figure II.2: Gènes d'entérotoxines portés par les bactériophages et les plasmides chez <i>S. aureus</i> . | 19 |
| Figure II.3 : Classement des toxines superantigéniques selon leurs séquences d'acides aminés. | 20 |
| Figure III.1 : Organisation et localisation chromosomique de la région SCCmec au niveau de l'ADN (le gène <i>mecA</i> et les éléments régulateurs <i>mecI-mecR1</i>) | 31 |
| Figure IV.1 : Diagramme de la méthodologie utilisée | 42 |
| Figure IV.2 : Aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur milieu de Chapman | 52 |
| Figure IV.3 : Aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur gélose nutritive | 52 |
| Figure IV.4 : Observation microscopique des Staphylocoques après coloration de Gram | 53 |
| Figure IV.5 : Détermination de la CMI par la technique des Bandelettes E-Test | 59 |
| Figure V.1 : Taux de prélèvements positifs à <i>Staphylococcus</i> sur milieu Baird-Parker | 64 |
| Figure V.2 : Taux de contamination des différentes matrices alimentaires par des SCP | 65 |
| Figure V.3 : Répartition des échantillons analysés selon le taux de contamination par SCP | 67 |
| Figure V.4: Répartition des isolats de <i>S. aureus</i> des échantillons positifs | 68 |
| Figure V.5 : Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats de PCR des gènes (<i>femA</i> et <i>sec</i>) chez des <i>S. aureus</i> cliniques. Voie M : marqueur de taille de l'ADN (échelle 100 pb). | 76 |
| Figure V.6 : Electrophorèse sur gèle d'agarose des amplifiats de PCR des gènes <i>see</i> chez des isolats SCN d'origine alimentaire. Voie M : marqueur de taille de l'ADN (échelle 100 pb). | 76 |
| Figure V.7 : Electrophorèse sur gèle d'agarose des amplifiats de PCR des gènes (<i>femA</i> et <i>tst</i>) chez des isolats de staphylocoques d'origine clinique. Voie M : marqueur de taille de l'ADN (échelle 100 pb). | 79 |
| Figure V.8 : Distribution des taux de résistance aux antibiotiques des isolats de staphylocoques d'origine alimentaire | 88 |
| Figure V.9 : Distribution des taux de résistance aux antibiotiques des isolats de staphylocoques d'origine clinique | 88 |
| Figure V.10 : Electrophorèse sur gèle d'agarose des amplifiats de PCR des gènes de résistances aux antibiotiques (pénicilline, érythromycine, gentamicine, tétracycline) chez les isolats de staphylocoques | 94 |
| Figure V.11 : Electrophorèse sur gèle d'agarose des amplifiats de PCR du gène <i>mecA</i> (163bp) chez les isolats de staphylocoques. Voie M : marqueur de taille de l'ADN (échelle 100 pb). | 94 |

Liste des abréviations

- ADH : Arginine dihydrolase
- ADN : Acide désoxy-ribo-nucléique
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNt : Acide ribonucléique de transport
- *Aw*: Activity water
- CA-SFM : Comité Français de la Société Française de Microbiologie
- CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute
- CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
- CMI : Concentration minimale inhibitrice
- CPA : Cellules présentatrices d'antigène
- CTS : Choc toxique staphylococcique
- ET : toxines d'exfoliatines
- IL : Interleukine
- INCSS : Le comité international de la nomenclature des superantigènes staphylococciques
- InVS : l'institut de veille sanitaire
- OMS : Organisation mondiale de santé
- Pb : Paires de Bases
- PBP : penicillin-binding proteins
- PCR Polymerase chain reaction
- pH : potentiel hydrogène
- PLP : protéines liant pénicillines
- SAg : les toxines superantigéniques
- SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
- SARV : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine
- SCC : Staphylococcal cassette chromosome
- SCN : Staphylocoques coagulase négative
- SE : entérotoxines staphylococciques
- SEI : Staphylococcal enterotoxin-like
- SFP : Staphylococcal food poisoning
- SSSS : staphylococcal scalded skin syndrome
- TCR : T-Cell antigen Receptor
- TIAC : toxi-infection alimentaire collective
- TNF- α : Tumor necrosis Factor-alpha
- TSST-1: Toxic shock syndrome toxin-1
- UFC : Unités formant colonies

Liste des productions scientifiques

Articles

Achek R, Cantekin Z, Oumouna M, Mahdi A, Hamdi TM. Occurrence of enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin-1 genes in *Staphylococcus aureus* and CoNS isolated from clinical and food samples in Algeria. HVM Bioflux 2018;10(2):85-92.

Achek, R., Hotzel, H., Cantekin, Z., Nabi, I., Hamdi, T. M., Neubauer, H., & El-Adawy, H. (2018). Emerging of antimicrobial resistance in staphylococci isolated from clinical and food samples in Algeria. BMC research notes, 11(1), 663. doi:10.1186/s13104-018-3762-2.

Communications internationales

Orale

Achek R, Cantekin Z, Nabi I, Mahdi A, Hamdi TM. Fréquence des gènes codant les entérotoxines, les exfoliatines et la toxine du choc toxique staphylococcique TSST-1 chez des staphylocoques isolés à partir de différentes matrices alimentaires et des infections humaines. 13èmes Journées Internationales des Sciences Vétérinaires, Sécurité alimentaire, 1-2 Décembre 2018: Enjeux et Stratégies. Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Alger, Algérie.

Posters

Achek R, Solmas H, Cantekin Z, Oumouna M, Mahdi A, El-Adawy H, Nabi I, Hamdi TM, Hotzel H. Distribution of virulence genes and resistance genes in staphylococci from food and human medical samples. 2nd International congress of veterinary bacteriology, 16-19 October 2018, Sherwood Breezes Resort. Lara/Antalya, Turkey.

Achek R, Cantekin Z, Nabi I, Mahdi A, Hamdi Taha-Mossadak. Emergence de l'antibiorésistance chez les staphylocoques isolés à partir des matrices alimentaires et des infections humaines. 13èmes Journées Internationales des Sciences Vétérinaires, Sécurité alimentaire, 1-2 Décembre 2018: Enjeux et Stratégies. Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Alger, Algérie.

Résumé

L'objectif de cette étude est de déterminer l'occurrence des gènes codant diverses toxines chez des isolats de *Staphylococcus*. L'antibiorésistance phénotypique avec exploration des supports génétiques de la résistance à certains antibiotiques a été également réalisé.

Une Multiplex PCR a été utilisée pour vérifier la présence de 8 gènes codant les entérotoxines staphylococciques classiques (SE) (*sea* à *see*), les exfoliatines (*eta*, *etb*) et la toxine TSST-1 (*tst*). La sensibilité aux antibiotiques des isolats a été réalisée par la méthode de diffusion de disque sur gélose. Une PCR simplex a été utilisée pour détecter les gènes *mecA*, *blaZ*, *aacA-aphD*, *ermA*, *ermC*, *tetK* et *tetM* codant la résistance à certains antibiotiques. Au total 96 isolats de *Staphylococcus* ont été testés, 51 isolats d'origine alimentaire réparties en 24 *S. aureus* et 27 staphylocoques à coagulase négative (SCN). Quarante-cinq isolats de staphylocoques ont été récoltés à partir des prélèvements des infections hospitalières et communautaires dans deux régions d'Algérie (Médéa et Ain Defla). Nos résultats montrent que 52,94% des isolats alimentaires possédaient au moins un gène codant pour les SE; où *S. aureus* semble être plus entérotoxigène que SCN (68,18% vs 41,37%) et le gène *sed* (19; 70,37%) était le plus fréquemment détecté. Pour les isolats d'origine clinique, seulement 13%(6) des isolats de *S. aureus* possédaient au moins un gène codant les SE. Cependant, 55,55% des isolats d'origine clinique (*S. aureus* ou SCN) portaient le gène *tst*. Les résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques montrent que tous les isolats de *S. aureus* d'origine alimentaire étaient résistants à la pénicilline et 45,83% étaient résistantes à la tétracycline. Les taux de résistance des isolats d'origine clinique étaient de 86,7% ; 48,9% et 37,8% pour la pénicilline, la tétracycline et l'érythromycine, respectivement. Les résultats des CMI ont permis de confirmer 8 isolats comme des SARMs (un isolat alimentaire et 7 isolats cliniques). La multi-résistance a été observée chez 22%(11/50) et 58,14%(25/43) des isolats alimentaires et cliniques, respectivement. À l'exception du gène *ermA*, les gènes *tetM/K*, *blaZ*, *aacA-aphD*, *ermC* et *mecA* ont été détectés chez les isolats alimentaires et cliniques avec des taux variables. Cette étude a révélé une fréquence élevée des gènes codant les SE et fourni un aperçu de l'état actuel de la résistance des staphylocoques aux antibiotiques. En perspective, d'autres enquêtes et programmes de surveillance à plus grande échelle devraient être menées.

Mots clé: *Staphylococcus aureus*; Entérotoxines; PCR; Antibiorésistance, SARM.

Abstract

The aim of this study was to determine the occurrence of toxin-genes carried by staphylococci isolates; we have also evaluated the phenotypic antimicrobial resistance and investigate the antimicrobial resistance-associated genes carriage of the isolates.

The multiplex PCR assay was used for screening of 8 genes coding for classical enterotoxins (SEs) (*sea* to *see*), exfoliative toxins (*eta*, *etb*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*). Antimicrobial susceptibility testing was performed using agar disc diffusion method, and the genes coding for antimicrobial resistance (*mecA*, *blaZ*, *aacA-aphD*, *ermA*, *ermC*, *tetK* and *tetM*) were detected by Simplex PCR. Fifty-one isolates originating food samples allocated into 24 *S. aureus* and 27 coagulase-negative staphylococci (CoNS). Forty-five staphylococci isolates were collected from samples of hospital and community-acquired infection cases at two distinct provinces in Algeria (Médéa and Ain Defla). Our results show that 52,94% of food isolates possessed at least one of SEs genes. *S. aureus* appears to be potentially enterotoxigenic than CoNS (68,18% vs 41,37%) and the *sed* gene (19;70,37%) was the most frequently detected. In clinical isolates, only 13%(6) of *S. aureus* harboured at least one SEs genes. However, 55,55% of clinical isolates (*S. aureus* or CoNS) possessed the *tst* gene. All food *S. aureus* isolates were resistant to penicillin and 45,83% were resistant to tetracycline. The resistance rates of clinical staphylococci isolates were 86,7%, 48,9% and 37,8% to penicillin, tetracycline, erythromycin, respectively. Based on MIC values, 8 isolates were confirmed as MRSA (one food isolate and 7 clinical isolates). The multidrug-resistance was observed among 22%(11/50) and 58,14%(25/43) of food and clinical staphylococci isolates, respectively. Except for *ermA* gene, the *tetM/K*, *blaZ*, *aacA-aphD*, *ermC* and *mecA* genes were detected in food and clinical isolates with variables rates. This study showed high frequency of SEs genes in food isolates and provided insight the current status of antimicrobial resistance of staphylococci isolated from food and clinical samples in this area. Further studies at a larger scale, and surveillance plans should be set up to assess staphylococcal risk.

Key words: *Staphylococcus aureus*; enterotoxins; PCR; antimicrobial resistance, MRSA.

الملخص

إن الهدف من هذه الدراسة يتمحور حول تحديد نسبة تواجد الجينات التي ترمز لمختلف السموم لدى عزلات بكتيريا المكورات العنقودية. موازاة مع ذلك ، تم معاينة المقاومة الظاهرية للمضادات الحيوية مع استكشاف السند الجيني لها. تم استخدام تقنية PCR Multiplex للتحقق من وجود 8 جينات ترمز لمختلف السموم المعوية التقليدية (*sea-see*) (SE) ، سم الإكسبولياتين (*eta* , *etb*) ، والتي ترمز لسم TSST-1 (*tst*) . تم دراسة حساسية السلالات معزولة للمضادات الحيوية بواسطة طريقة انتشار المضاد الحيوي على هلام الأفار . و تم استخدام simplex PCR للكشف عن بعض جينات المقاومة للمضادات الحيوية (*mecA* ، *blaZ* ، *aacA-aphD* ، *ermA* ، *ermC* ، *tetK* و *tetM* .

إجمالاً تم عزل 96 سلالة من المكورات العنقودية ، منها 51 سلالة عزلت من العينات الغذائية (24 سلالة من المكورات العنقودية الذهبية (*S. aureus*) و 27 سلالة من المكورات العنقودية غير المخثرة للبالازما (SCN) وتم عزل 45 من سلالة المكورات العنقودية من عينات مأخوذة من إصابات لمرضى بالمستشفى وأخرى من المجتمعات المحلية بمنطقتي المدينة وعين الدفلة الجزائريتين.

أظهرت نتائج بحثنا أن 52.94% من السلالات الغذائية تحتوي على جينة واحدة على الأقل لـ SE ؛ حيث يبدو أن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية أكثر سمومية من SCN (68.18% مقابل 41.37%) وكان الجين *sed* الأكثر تواجداً (19% ، 70.37%). في ما يخص السلالات السريرية ، 13% (6) فقط من المكورات العنقودية الذهبية تحمل على الأقل جينة ترميز واحدة لـ SE . مع ذلك ، فإن 55.55% من السلالات السريرية (*S. aureus* أو SCN) تحمل الجين *tst* .

أظهرت نتائج دراسة حساسية السلالات المعزولة للمضادات الحيوية أن جميع بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية و التي عزلت من العينات الغذائية كانت مقاومة للبنسلين و 45.83% منها كانت مقاومة للتيترايسيكليين في حين أن معدلات مقاومة السلالات السريرية تشير لـ 86.7% ، 48.9% و 37.8% لكل من البنسلين ، التتراسيكليين وإريثروميسين ، على التوالي. النتائج بينت كذلك أن 8 سلالات تعتبر من MRSA (سلالة واحدة من عينة غذائية و 7 سلالات سريرية). لوحظ اكتساب مقاومة متعددة للمضادات الحيوية في 22% (50/11) و 58.14% (43/25) من السلالات الغذائية والسريرية ، على التوالي. باستثناء جين *ermA* ، تم اكتشاف جينات *ermC* ، *aacA-aphD* ، *blaZ* ، *tetM / K* و *mecA* في السلالات التي عزلت من العينات الغذائية و السلالات السريرية بمعدلات مختلفة.

كشفت أخيراً هذه الدراسة عن وجود نسبة عالية للجينات التي ترمز إلى SE وقدمت نظرة ثاقبة على الحالة الراهنة لمقاومة المكورات العنقودية للمضادات الحيوية. من منظور استشرافي ، فإنه من الضروري القيام بدراسات استقصائية وبرامج رصد أخرى في هذا الموضوع.

الكلمات المفتاحية : المكورات العنقودية الذهبية، السموم المعوية، PCR ، مقاومة المضادات الحيوية، MRSA.

Introduction générale

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires et commensales de la peau, des muqueuses et des orifices naturels de l'homme et des animaux (Monecke et *al.*, 2011). Ces bactéries représentent l'une des sources majeures de contamination des denrées alimentaires (Kluytmans et *al.*, 1997; Von Eiff et *al.*, 2001).

Chez l'homme, les infections dues aux staphylocoques sont liées à son potentiel de production de différents facteurs de virulence, comme les exfoliatines et la toxine de choc staphylococcique TSST-1 et les entérotoxines, ces dernières sont responsables des toxi-infections alimentaires staphylococciques (Pesavento et *al.*, 2007; Argudin et *al.*, 2010 ; Hennekinne et *al.*, 2010).

Les staphylocoques à coagulase positive (SCP) spécialement *Staphylococcus aureus* sont considérés comme les plus pathogènes et sont largement impliqués dans les infections et les toxi-infections alimentaires (Hennekinne et *al.*, 2010). Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) ont été souvent marginalisés et considérés comme des contaminants (Kloos et Schleifer, 1975). Des études récentes ont montré que les SCN sont des réservoirs de gènes codant diverses toxines comme les entérotoxines et la toxine de syndrome de choc staphylococcique TSST-1 (da Cunha et *al.*, 2007; Ławrynowicz-Paciorek et *al.*, 2007 ; Zell et *al.*, 2008; Vasconcelos et *al.*, 2011; Batista et *al.*, 2013). Les SCN sont également impliqués dans diverses infections humaines et animales (Kloos and Bannerman, 1995; Otto, 2009; Dubois et *al.*, 2010).

La toxi-infection staphylococcique est déclenchée suite à la consommation d'aliments contaminés par les entérotoxines staphylococciques. Les symptômes (vomissements, diarrhées et des coliques abdominales) apparaissent rapidement après une période ne dépassant pas les 6h après ingestion de l'aliment contaminé (Le Loir et *al.*, 2003; Normanno et *al.*, 2007 ; Seo et Bohach, 2007). Les entérotoxines staphylococciques (A, B, C, D, E) sont des exoprotéines thermostables, résistantes à la pepsine, sécrétées et préformées dans la matrice alimentaire avant consommation (Omoe et *al.*, 2002).

Les gènes codant des entérotoxines staphylococciques sont portées par différents éléments génétiques mobiles comme des prophages (gènes *sea* et *see*); des plasmides (gènes *seb*, *sec*, *sed* et *etb*) et des îlots de pathogénicité staphylococciques (gène *sec*) (Balaban et

Rasooly, 2000; Dinges et *al.*, 2000; Le Loir et *al.*, 2003; Argudin et *al.*, 2010; Grumann et *al.*, 2014).

Le portage de ces gènes sur des éléments génétiques mobiles (îlots de pathogénicité et des transposons) facilite les transferts horizontaux de gènes entre les souches de staphylocoques, ce qui pourrait supposer un lien entre les souches de contamination alimentaire et celles retrouvés en pathologie clinique (Becker et *al.*, 2003; Chiang et *al.*, 2008; Argudin et *al.*, 2010; Grumann et *al.*, 2014).

En Algérie, le contrôle sanitaire des aliments repose uniquement sur des techniques de routine basées sur la recherche et le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive sur milieu Baird-Parker. Ces méthodes ne garantissent pas la salubrité des aliments consommés, car la majorité des traitements thermiques appliqués dans l'industrie alimentaire ou dans la vie domestique, éliminent les cellules bactériennes mais pas les entérotoxines thermostables éventuellement présentes dans les matrices alimentaires. Il est à noter également que les textes réglementaires relatifs à la sécurité microbiologique des aliments ne recommandent aucune méthode immunologique pour la détection des entérotoxines staphylococciques.

Dans un autre contexte, l'émergence de résistances des staphylocoques aux antibiotiques est devenu un problème majeur de santé publique (Kennedy et *al.*, 2008), tant par la virulence de la bactérie que par l'émergence de souches multirésistantes. *S. aureus* résistante à la méthicilline (SARM) commence à acquérir des résistances à de nouvelles familles d'antibiotiques comme la clindamycine, les tétracyclines, les macrolides, le linezolid et particulièrement la mupirocine et la vancomycine (Zhang et *al.*, 2004).

A l'échelle nationale, la problématique de l'antibiorésistance des staphylocoques responsables des infections humaines et animales a été étudiée par différents travaux (Ramdani-Bouguessa et *al.*, 2006; Rebiahi et *al.*, 2011; Ouchenane et *al.*, 2011). A l'inverse, l'antibiorésistance des souches de staphylocoques isolées à partir de matrices alimentaires est très peu élucidée. Plusieurs études ont signalées que les staphylocoques d'origine alimentaire pourraient être l'origine de transfert de l'antibiorésistance par la manipulation et l'ingestion d'aliments contaminés par des souches résistantes (Khan et *al.*, 2000; Pesavento et *al.*, 2007 ; Pereira et *al.*, 2009).

À la lumière des observations développées ci-dessus, nous avons entrepris cette étude avec trois objectifs :

Le premier objectif fixé est l'évaluation du taux de contamination de différentes matrices alimentaires par les staphylocoques à coagulase positive, ainsi que l'isolement des staphylocoques à partir de divers prélèvements biologiques provenant d'infections humaines.

Le second objectif vise à déterminer la fréquence des gènes codant les entérotoxines staphylococciques (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* et *see*), les exfoliatives (*eta*, *etb*) et la toxine TSST-1 (*tst*) dans les isolats identifiés par une méthode PCR Multiplex.

Le troisième objectif est l'étude des profils de l'antibiorésistance des isolats à un panel d'antibiotiques ; et la recherche des gènes codant pour les facteurs de l'antibiorésistance chez les isolats par la méthode PCR Simplex.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les staphylocoques

1. Historique

En 1879, ce germe a été observé dans des pus de furoncle et d'ostéomyélite par Luis Pasteur comme étant "un organisme unique, formé de petits points sphériques, réunis par couple, rarement par quatre, mais très fréquemment associés en petits amas"(Breche et *al.*, 1988; Spicer, 2003)

En 1880, le chirurgien écossais Alexander Ogston a isolé les staphylocoques du pus humain: le nom donné à cette bactérie est dérivé de *staphylle* (grappe de raisin) et *kokkos* (coque) parce que les bactéries ressemblaient en grappes de raisins lorsqu'elles sont observées au microscope (Licitra, 2013).

En 1886, deux souches de *Staphylococcus* ont été isolées en culture pure par Anton J. Rosenbach, un chirurgien allemand (Rosenbach, 1884). L'une s'agissait de *Staphylococcus aureus*, ainsi nommé en raison de la couleur des colonies pigmentées (*aureus* signifie couleur or en latin). Dans les années 1920, il a été reconnu que la présence de coagulase (une enzyme qui coagule le plasma) était associée à la pathogénicité, et le test de diagnostic (coagulase) a été développé à la fin des années 1930.

2. Habitat

Les staphylocoques résistent aux conditions hostiles de l'environnement, comme la dessiccation (ils survivent plusieurs mois dans des produits desséchés), aux variations de température (ils résistent 2 h à 55°C, voir 1 h à 60°C), au choc osmotique (salinité de l'eau) et résistent encore mieux en milieux albumineux. Ils sont largement disséminés dans l'environnement, retrouvés dans le sol, les poussières (l'air), l'eau et dans certains produits alimentaires (Breche et *al.*, 1988). Ces caractéristiques expliquent en partie les difficultés pour l'éradiquer des environnements hospitaliers ou agro-alimentaires.

Les staphylocoques appartiennent à la flore commensale normale des animaux à sang chaud, principalement les mammifères (terrestres et marins), mais aussi les oiseaux (Boumar-Kechih et *al.*, 2018). Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches peuvent varier en fonction de l'espèce hôte et conduire à classer les souches en écovars ou biotypes. Six biotypes associés aux différents hôtes, humain, aviaire/porcin, ovin/caprin, lièvre, chien et pigeon ont été décrits (Isigidi et *al.*, 1990). Un biotype abattoir associé aux produits carnés et au personnel des unités de production de produits carnés a été également caractérisé (Hennekinne et *al.*, 2003). Néanmoins un grand nombre de souches ne peut pas être associé à un hôte particulier (souches dites non spécifique d'hôte).

Le réservoir écologique des souches de staphylocoques est le nez humain; cependant, la peau, les muqueuses, les cheveux peuvent également être colonisés. Dans la bouche, il coloniserait préférentiellement la surface des dents (Harvy et Gilmour, 2000; Smith et *al.*, 2001). Chez les vaches, ils seraient localisé principalement au niveau du mufler et des trayons (Roberson et *al.*, 1994; Bounar-Kechih et *al.*, 2018).

3. Taxonomie

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

4. Caractéristiques morphologiques

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif de forme sphérique de 0,8 à 1µ de diamètre; les cellules perdent leur affinité tinctoriale et peuvent devenir à Gram variable au cours de la lyse ou de la dégénérescence (veilles cellules) (Couture, 1990).

Ils sont immobiles, non sporulés, ils possèdent des capsules, mais les souches peuvent perdre leur capsule après culture (Pellerin et *al.*, 2010).

La division cellulaire peut se faire sur plusieurs plans, ce qui donne lieu à des arrangements cellulaires variés: la division dans les trois plans de l'espace n'aboutit pas à la séparation complète des cellules filles. Au microscope optique, les staphylocoques se trouvent, isolés ou groupés en diplocoques ou le plus souvent en amas plan de plusieurs éléments (du grec staphylo, grappe de raisin) (Steinberg et *al.*, 1996).

5. Caractères cultureux

Certaines espèces de staphylocoques sont capables de croître dans des conditions hostiles (exemple : en bouillon hypersalé à 7% de NaCl). Ce caractère est parfois mis à profit dans l'utilisation de milieux sélectifs (milieu de Chapman) pour les isoler.

S. aureus présente une bonne croissance sur milieux usuels en 18-24h à 37°C (culture entre 10 et 45°C).

Sur gélose ordinaire, les colonies de *S.aureus* sont lisses, d'un diamètre de 1 à 3 mm, arrondies, bombées, opaques, parfois colorées (pigment jaune à jaune-orange, pour *S. aureus*). En gélose profonde, la croissance est observée sur toute la hauteur du tube signant le caractère aéro-anaérobie facultatif. Une seule sous-espèce est anaérobie stricte (*S. aureus* subsp. *anaerobius*). Au bouillon, la culture de *S.aureus* forme un trouble uniforme abondant, parfois un dépôt et un voile en surface (Pellerin et *al.*, 2010).

6. Caractères biochimiques

De nombreuses études ont permis de dresser des profils métaboliques pour la plupart des espèces de *Staphylococcus*. Les principaux caractères biochimiques pris en compte sont la production de catalase, la capacité à métaboliser les sucres et la production d'arginine dihydrolase (ADH) (Pellerin et *al.*, 2010).

Parmi les caractères permettant de distinguer les staphylocoques potentiellement pathogènes des staphylocoques opportunistes, il y a la production d'une staphylocoagulase libre. La coagulase (produit du gène *coa*) est une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte. La trombine ainsi activée transforme le fibrinogène en fibrine. C'est la base du test de la coagulase en tube (Brun et *al.*, 2003).

La recherche de la staphylocoagulase est le test essentiel qui permet de distinguer les souches potentiellement pathogènes, car la staphylocoagulase joue un rôle fondamental dans le pouvoir pathogène des *Staphylococcus*, en leur permettant de lutter contre les anticorps opsonisants et la phagocytose par les leucocytes (granulocytes neutrophiles) (Verdier et *al.*, 2007).

Trois espèces sont importantes en pathologie humaine et animale: *S. aureus*, *S. intermedius* et *S. hyicus*. D'autres espèces sont plus rarement isolées comme *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. pseudointermedius* (Pellerin et *al.*, 2010).

7. Pouvoir pathogène

7.1. De l'habitat à la colonisation

Les staphylocoques sont des bactéries de la flore commensale cutanée et muqueuse des mammifères et des oiseaux (Williams, 1963). Chez l'homme, les staphylocoques font partie de la flore résidente cutanée. Cependant, l'habitat préférentiel de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale. Il existe 3 statuts de portage nasal de *S. aureus*, environ 20% de la population est porteuse de manière permanente (porteurs persistants), environ 60% sont porteurs de manière intermittente, avec des souches qui varient au cours du temps, et 20% ne sont pratiquement jamais porteurs (Williams, 1963). La densité du portage est comprise entre 10^3 et 10^4 bactérie/cm². Les patients porteurs au niveau nasal sont fréquemment colonisés sur la peau (en particulier sur les plaies cutanées, les escarres) (Heikkila et Saris, 2003).

S. aureus survie pendant des mois sur n'importe quel type de surface, la main est le principal vecteur pour la transmission de *S. aureus* des surfaces vers le nez « Nose picking» (Crossley, 1997; Wertheim et al., 2006). Les sites extra-nasaux qui peuvent héberger les *S.aureus* comprennent la peau, le périnée et le pharynx, le tractus gastro-intestinal (Williams, 1963), le vagin (Guinan et al., 1982) et les aisselles (Dancer et al., 1991) (figure I.1).

Le portage de staphylocoques est fréquent sur la peau et les muqueuses des animaux (Williams, 1963), la transmission s'opérant par contact direct ou indirect de la peau non intacte ou des muqueuses avec des sièges anatomiques infectés, des plaies suppurantes ou des sécrétions respiratoires, toute personne effectuant un soin sur animal infecté est exposé (Liu et al., 2005). Un risque existe également pour le personnel de laboratoire manipulant des prélèvements infectés (OMS, 2005).

7.2. De la colonisation à l'infection :

Les staphylocoques sont des bactéries commensales ne provoquant normalement pas de maladie, mais le portage nasal est fortement associé à l'infection; bien que, seulement une petite minorité de porteurs tombera malade d'une infection à *S. aureus* (Brown et al., 2013).

Le réservoir nasal assure la continuité de la transmission, en contaminant sans cesse les mains. Il existe une relation entre portage nasal et portage cutané, la décolonisation du portage nasal entraîne une décolonisation cutanée. La contamination est essentiellement interhumaine directe, un contact cutané de personne à personne avec un individu porteur d'une infection cutanée non ou mal protégée représente le mode de transmission le plus prépondérant (Lepelletier et Lucet, 2013).

Le germe peut se transmettre par l'intermédiaire d'un fomite (objet contaminé susceptible de transmettre le germe). Il existe également, une diffusion par voie aérienne, chez des patients porteurs de staphylocoques et atteints de pathologies rhino-sinusiennes. La promiscuité constitue ainsi un environnement favorable expliquant la survenue fréquente de cas groupés d'infection cutanée à *S. aureus* en milieu familial et hospitalier (80% la proportion de porteurs sains au sein du personnel soignant) (Carré, 2008).

La colonisation nasale constitue un facteur de risque important de survenue d'une infection cutanée, de nombreuses études réalisées chez des patients hospitalisés ont montré que les patients porteurs (colonisation nasale) de *S. aureus* avaient plus de risque de développer une infection à *S. aureus* que les autres patients (Zimakoff et al., 1992; Madan et al., 2002).

Les analyses moléculaires suggèrent que l'hôte habituel de *S. aureus* est l'homme (Ng et al., 2009). Néanmoins, la santé des humains et des animaux sont étroitement interdépendantes et de nombreuses maladies humaines sont partagées avec les animaux et vice versa. L'épidémiologie moléculaire suggère que *S. aureus* est passé de l'homme au bétail dans le passé mais plus rarement transféré des espèces du bétail aux humains (Shepherd et al., 2013).

Le premier cas de passage des humains au bétail a eu lieu il y a environ 5500 ans, coïncidant avec l'expansion de la domestication du bétail. Actuellement, au moins 13 passages des humains aux animaux et deux passages de populations animales aux humains ont été recensés (Shepherd et al., 2013).

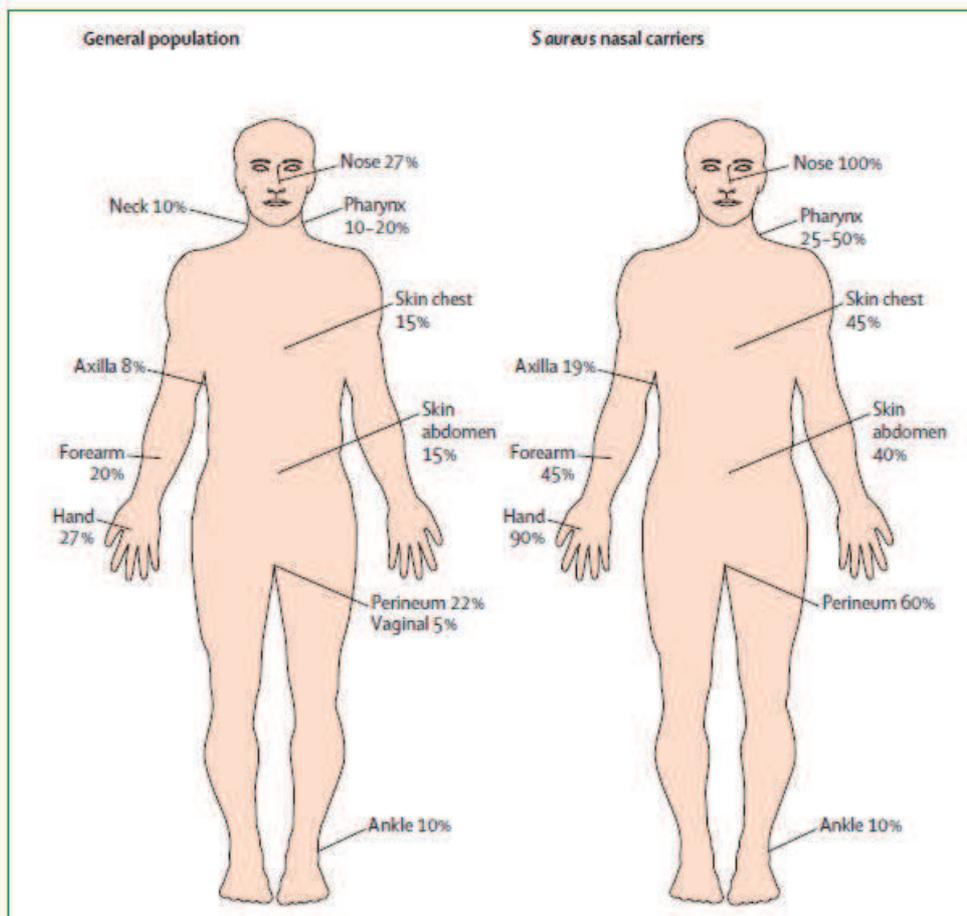


Figure I.1: Fréquence de portage de *S. aureus* par site corporel chez la population générale et les porteurs nasaux (Wertheim et al., 2005).

7.3. Les infections suppuratives

L'espèce *S. aureus* est le premier pathogène responsable d'infections cutanées primaires et secondaires (Tan et al., 1998). Parmi les infections primaires, les furoncles représentent la majorité des cas, les furunculoses pouvant évoluer vers l'anthrax staphylococcique et enfin les impétigos (Frazee et al., 2005). Les infections secondaires surviennent lors d'altérations cutanées conduisant à des ulcères et dermatites (Tan et al., 1998). Les infections cutanées primaires touchent autant l'adulte que l'enfant, à la différence des secondaires, plus fréquentes chez les sujets d'âge supérieur à 18 ans (Sugeng et al., 1999).

S. aureus peut être à l'origine d'infections cutanées s'étendant aux tissus mous sous-jacents (ou hypoderme), ces infections sont généralement des érysipèles, fasciite nécrosante et la pyomyosite (Lee et al., 2005; Robert et Chambers, 2005).

7.4. Les infections associées à une bactériémie

S. aureus est la seconde bactérie communautaire isolée d'hémoculture, représentant 20 à 25% du nombre total de flacons présentant une croissance bactérienne. Ces bactériémies surviennent principalement chez des patients ayant des facteurs prédisposants, tels qu'une colonisation à *S.aureus*, la toxicomanie, le diabète, l'hémodialyse, la présence d'un cathéter central, pathologies hépatiques (Mitchel et Howden, 2005). Les principales pathologies associées à une bactériémie à *S.aureus* sont l'endocardite infectieuse, le sepsis et le choc septique et purpura fulminans (Lowy, 1998; Murray, 2005).

7.5. Pathologies toxiques

7.5.1. Toxi-infections alimentaires

a. Définition :

D'une façon générale, une toxi-infection alimentaire collective ou TIAC correspond à l'apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (Delmas et *al.*, 2006). Une toxi-infection alimentaire causée par les staphylocoques est une intoxication alimentaire causée par une ou plusieurs entérotoxines produites principalement par *S. aureus*. Elle survient suite à l'ingestion de toxines préformées dans les aliments contaminés par un nombre suffisant de *S. aureus* (Le Loir et *al.*, 2003, Schelin et *al.*, 2011).

Le diagnostic d'une toxi-infection staphylococcique ne peut être confirmé que lorsqu'au moins un des paramètres énoncés ci-dessous est vérifié :

- Le dénombrement de *S. aureus* dans l'aliment suspecté est supérieur à 10^5 UFC/g.
- Détection des entérotoxines staphylococciques dans la matrice alimentaire.
- Isolement à partir des fèces des malades et la matrice alimentaire d'une souche de *S. aureus* de même lysotype (Bryan et *al.*, 1997).

b. Incidence et manifestations cliniques :

La toxi-infection alimentaire causée par les staphylocoques est une maladie à symptomatologie d'appariation rapide. La période d'incubation et la sévérité des symptômes observés dépendent de la quantité d'entérotoxines ingérées et de la sensibilité

de chaque individu (Harvey et Gilmour, 2000). Les premiers symptômes, nausées suivies de vomissements caractéristiques incoercibles, apparaissent dans les 30 minutes à huit heures (trois heures en moyenne) après ingestion de l'aliment contaminé (Scallan et *al.*, 2011; Doyle et *al.*, 2012). D'autres symptômes peuvent être observés comme des douleurs abdominales, des diarrhées, vertiges, frissons et faiblesse générale. Lors de cas plus sévère, des maux de tête, une prostration et une hypotension ont été rapportées. Les symptômes régressent spontanément sans avoir recours à un traitement spécifique dans les 18 à 24 heures. La déshydratation due aux vomissements et aux diarrhées peut provoquer un état de choc, la mortalité reste exceptionnelle, atteignant les individus les plus sensibles (nourrissons et personnes âgées) (Bergdoll, 1979).

Bien que les TIAC soient des maladies à déclaration obligatoire, l'incidence réelle des TIAC à staphylocoques reste difficile à évaluer avec précision. En fait, la maladie étant d'appariation rapide avec rétablissement en un à deux jours, la consultation médicale et la déclaration ne s'impose pas dans la majorité des cas. Cependant, de nombreux auteurs considèrent que les TIAC à staphylocoques sont une cause majeure de maladies alimentaires au niveau mondial (Balaban et Rasooly, 2000 ; Jablonski et Bohach, 2001 ; Omoe et *al.*, 2002).

Selon les données obtenues du système de surveillance des maladies d'origine alimentaire entre 1998-2008, sur les 1229 cas de TIAC alimentaires causées par *S. aureus*, *C. perfringens*, et *B. cereus* aux États-Unis, *S. aureus* représentait près de 40% (Bennett et *al.*, 2013). En France, l'institut de veille sanitaire (InVS) a recensé 5847 foyers de TIAC dans la période 1996-2005, dont les 1100 (19%) sont causées par *S. aureus* (InVS, 2012). Ainsi les staphylocoques représentent la deuxième cause de TIAC en France, et également la première cause de TIAC impliquant le lait et les produits laitiers (Delmas et *al.*, 2006).

En Algérie, bien que les TIAC soient des maladies à déclaration obligatoire (arrêté N° 179/MS/CAB du 17/11/90 fixant la liste de maladies à déclaration obligatoire et les modifications de notification et la circulaire N° 1126/MS/DP/SDPG du 17/11/90 relative au système de surveillance des maladies transmissibles), le taux réel des TIAC est certainement supérieur à celui annoncé par les autorités compétentes. Le taux d'incidence des toxi-infections alimentaires collectives est stationnaire avec 15,67 cas pour 100.000 habitants (INSP, 2015). Les agents détectés dans les TIAC, étaient *Salmonella* sp,

Listeria monocytogenes, *Clostridium perfringens* et *S. aureus* avec 60% des TIAC dont l'agent causal est inconnu (Mouffok, 2011).

c. Aliments incriminés et mode de contamination

Cinq conditions sont requises pour que survienne une TIAC à staphylocoque, une source de staphylocoques producteurs d'entérotoxines, un moyen de transmission à l'aliment, un aliment favorable, une température favorable pour la multiplication bactérienne et à la toxinogénèse et une ingestion de toxines en quantité suffisante (Hennekinne et De Buyser, 2010).

La contamination des aliments peut être d'origine humaine, animale ou environnementale. Les *S.aureus* étant fréquemment présent sur la peau et les muqueuses de l'homme et les animaux à sang chaud, ces derniers constituent les deux principaux réservoirs de ce germe (Le Loir et *al.*, 2003; Schelin et *al.*, 2011).

La production des entérotoxines A à E par les souches de *S. aureus* est variable en fonction de l'origine alimentaire ou non des souches testées. Le pourcentage des souches productrices des entérotoxines A à E varie de 30 à 60% pour les souches d'origine humaine et 60 à 80% pour les souches ovine ou caprine et 0 à 15 % pour les souches d'origine bovine et aviaire (Genigeorgis, 1989; Rosec et *al.*, 1997).

La présence de *S.aureus* dans les aliments peut avoir deux origines principales :

- Dans le cas des denrées crues d'origine animale (viandes, lait), elle peut résulter d'une contamination primaire de l'aliment. Ainsi la contamination du lait cru peut être dû à la présence dans un troupeau d'animaux présentant des mammites à *S. aureus*. Les carcasses des mammifères ou de volailles peuvent être contaminées au moment de l'abattage à partir de différentes sources comme le portage de *S. aureus* au niveau du pelage ou plumage, de la peau de la mamelle, des narines des animaux, des muqueuses génitales ou des infections cutanées (abcès) (Kerouanton et *al.*, 2007).
- La contamination peut être d'origine humaine lors de la fabrication ou la préparation domestique des aliments, dans ce cas les souches *S.aureus* peuvent provenir d'un portage sain sur la peau et les muqueuses ou d'infections staphylococciques (plaies infectées, sinusites, angines, rhinopharyngites) (Kerouanton et *al.*, 2007).
- La contamination peut provenir de l'environnement (surfaces d'ateliers de fabrication, ou des ustensiles mal nettoyés) (Doyle et *al.*, 2012; Hennekinne et *al.*, 2012).

Pour devenir toxique l'aliment doit constituer un milieu favorable à la croissance et à la toxinogénèse, ces aliments soient riches en protéines, d'un pH voisin de la neutralité et ne renferment pas de flore inhibitrice, les aliments les plus souvent incriminés dans les TIAC à staphylocoques sont :

- Les viandes, volailles, jambon cuits et tranchés, salades composées y compris salades au riz ou de légumes, gâteaux à la crème, plats cuisinés manipulés après cuisson (Doyle *et al.*, 2012; Bennett *et al.*, 2013).
- Les aliments fermentés à acidification lente, comme le fromage et le salami.
- Les produits séchés ou à teneur en eau réduite, comme le lait en poudre, les pâtes et les poisons séchés.
- Le lait et les produits laitiers (De Buyser *et al.*, 2001 ; Delmas *et al.*, 2006).

L'entérotoxine SEA est la toxine la plus souvent responsable des toxi-infections due aux staphylocoques suivi par l'entérotoxine SED (Balaban et Rasooly, 2000 ; Kerouanton *et al.*, 2007). La dose de l'entérotoxine à ingérer pour provoquer des symptômes reste mal définie (Anonyme, 2003). Cependant plusieurs études ont tenté d'évaluer la dose minimale à ingérer pour déclencher une TIAC. Mossel *et al.* (1995) ont rapporté une dose émétique de 50 à 200 ng de toxines par kilogramme de poids corporel, ils concluent qu'un homme doit ingérer entre 10 et 20 µg de toxines staphylococciques pour provoquer la TIAC.

7.5.2. Le syndrome d'exfoliation généralisée ou staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) :

Il s'agit d'un syndrome touchant le nouveau-né, l'enfant de moins de 5 ans et plus rarement les adultes. Le SSSS est provoqué par les toxines épidermolytiques nommées les exfoliatines. Les exfoliatines sont à l'origine aussi de l'impétigo bulleux staphylococcique. Actuellement, quatre exfoliatines (ET) ont été décrites ; ETA, ETB, ETC et ETD. En pathologie humaine, principalement ETA et ETB et moins fréquemment ETD (Yamaski *et al.*, 2005).

Le mécanisme d'action de ces toxines protéiques au niveau de l'épiderme n'est pas complètement élucidé. Ces toxines à tropisme membranaire agissent par clivage intra-épidermique de la desmogléine-1, une protéine impliquée dans les jonctions intercellulaires type desmosomes et présente uniquement dans l'organisme au niveau de la couche cornée de l'épiderme (Amagai *et al.*, 2000). Le clivage intra-épidermique entre le *stratum*

spinosum (couche épineuse) et le *stratum granulosum* (couche granuleuse) des kératinocytes, provoquant l'apparition de lésions bulleuses.

7.5.3. Le syndrome de choc toxique staphylococcique

Le choc toxique staphylococcique (CTS) est devenu célèbre dans les années 1980 où de nombreux cas ont été associés à l'utilisation de tampons super absorbants durant la période menstruelle (Lowy, 1998). Cette pathologie est liée à l'action d'une famille de toxines regroupées sous le nom de superantigènes. Il se caractérise par la symptomatologie suivante : hypotension, syndrome de fuite capillaire, œdème généralisé, vasodilatation, dysfonction myocardique, détresse respiratoire aiguë et défaillance multiples d'organes. Les symptômes précoces se traduisent par des diarrhées et des vomissements dus aux effets de la toxine sur le système gastro-intestinal. La plupart des manifestations cliniques sont dues aux activités superantigéniques des toxines telles que la toxine de choc toxique staphylococcique (TSST-1) (McCormick et *al.*, 2001).

Chapitre II

Les entérotoxines staphylococciques

1. Introduction

S. aureus cause différents types d'infections comme les toxi-infections alimentaires et le syndrome de choc toxique staphylococcique. La pathogénie des maladies causées par *S.aureus* est multifactorielle et reliée à plusieurs facteurs de virulence. Les entérotoxines staphylococciques (SEs) et les entérotoxines dites Staphylococcal enterotoxin-like (SELs) sont les facteurs de virulence responsables des toxi-infections alimentaires. Les SEs et les SELs partagent certaines propriétés structurelles et biologiques communes et sont codées par des gènes portés par divers éléments génétiques accessoires.

2. Nomenclature

S. aureus produit une grande variété «superfamille» de SEs. Ces toxines sont des protéines simples composées d'environ 261 acides aminés et présentent une taille moléculaire de 19-29 kD (Tableau II-1). Depuis la première caractérisation de l'entérotoxine staphylococcique A (SEA) en 1959 par Casman et Bergdoll, cinq entérotoxines (SEA à SEE) ont été découvertes avec des différences antigéniques (Bergdoll et *al.*, 1959; Balaban et Rasooly, 2000).

L'entérotoxine staphylococcique C (SEC) a été divisée en trois sous-types antigéniques, SEC1, SEC2, et SEC3 (Balaban et Rasooly, 2000). Todd et *al.* (1978) ont rapporté qu'une toxine induit le syndrome de choc toxique staphylococcique suite à une infection par *S.aureus*, cette toxine a été nommée entérotoxine staphylococcique F (SEF). Mais, SEF n'a pas d'activité émétique, plus tard cette toxine a été classée comme toxine de choc toxique staphylococcique TSST-1.

Après l'année 2001, plusieurs types de nouvelles entérotoxines et d'autres SELs ont été découvertes (Omoe et *al.*, 2003; Thomas et *al.*, 2007; Ono et *al.*, 2008; Wilson et *al.*, 2011). Actuellement, un total de 23 SEs et SELs différentes sont décrites. Ces toxines incluent les types de SEA à SEE, SEG à SET, et les entérotoxines staphylococciques SE/U à SE/Y.

Le comité international de la nomenclature des superantigènes staphylococciques (INCSS) propose une nomenclature standardisée pour les toxines nouvellement découvertes (Lina et *al.*, 2004; Thomas et *al.*, 2007). Pour nommer une toxine comme entérotoxine staphylococcique, l'INCSS se base sur la capacité de celle-ci à causer des toxi-infections alimentaires, pour cela, l'activité émétique de la toxine doit être prouvée par une

administration orale chez les primates. Si l'activité émétique était négative ou n'a pu être vérifiée, cette toxine devait être dénommée comme "SEL".

Tableau II-1 : Caractéristiques biologiques des entérotoxines staphylococciques

| SEs | Longueur en acides aminés (aa) | Poids moléculaire (kDa) | Activité Superantigénique | Activité émétique | | Support génétique |
|------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|--|-------------------------------------|
| | | | | Singe ^b | Rat de maison ^c (<i>Suncus murinus</i>) | |
| SEA | 233 | 27.1 | + | 5 (ED ₅₀) | 0.3 | Prophage |
| SEB | 239 | 28.4 | + | 5 (ED ₅₀) | 10 | Chromosome, SaPI3, plasmide (pZA10) |
| SEC1 | 239 | 27.5 | + | 5 (ED ₅₀) | NE ^d | SaPI |
| SEC2 | 239 | 27.6 | + | 5 (ED ₅₀) | 1000 | SaPI |
| SEC3 | 239 | 27.6 | + | 5 (ED ₅₀) | NE | SaPI |
| SED | 233 | 26.9 | + | 5 (ED ₅₀) | 40 | Plasmide (pIB485) |
| SEE | 230 | 26.4 | + | 10–20 (ED ₅₀) | 10 | Prophage (Hypothetical location) |

+, Réaction positive. *a* µg/animal. *b* administration orale. *c* administration intrapéritonéale. *d* Non examiné.

3. Support génétique

Les gènes codant les entérotoxines staphylococciques et les entérotoxines staphylococciques apparentées (SEs) sont portés sur des éléments génétiques mobiles, inclus dans des îlots de pathogénicité (SaPIs), des îlots génomiques (vSa), des prophages, et des plasmides.

3.1. Îlots de pathogénicité staphylococciques (SaPI)

Les SaPI sont des îlots de pathogénicité mobiles dont la taille varie de 15 à 17 kilobases (kb), à l'exception de SaPI_{bov2} (27 kb) et d'une SaPI hautement dégénérée (3,14 kb) présente dans certains génomes séquencés (Lindsay *et al.*, 1998; Tallent *et al.*, 2007).

La séquence nucléotidique complète est connue pour 20 SaPI, et certains d'entre eux portent des gènes codant pour un ou plusieurs SEs (figure II-1). Ainsi, *sek* et *seq* sont trouvés avec *tst* dans SaPI1; *sel* et *sec* sont trouvés dans SaPI_{bov1}; *seb*, *seq* et *sek* ont été rapportés dans SaPI3 (Novick et Subedi, 2007).

3.2. Îlots génomiques mobiles (ν Sa)

Les îlots génomiques ν Sa n'appartiennent ni aux prophages ni aux éléments de cassette chromosomique staphylococcique (SCC) qui sont exclusivement présents chez *S. aureus*. Ces îlots sont insérées à des locus spécifiques dans le chromosome et sont associés à des recombinases d'ADN intactes ou rémanentes (Baba et al., 2008).

Les deux îlots génomiques majeurs ν Sa α et ν Sa β , sont présents dans tous les génomes de *S. aureus*. Les deux îlots ν Sa α et ν Sa β contiennent des grappes de gènes codant pour des facteurs de virulence, le ν Sa β porte le gène *egc* (*enterotoxin gene cluster*) qui comprend un nombre variable de gènes *se* ou *sel* formant un opéron (figure II-1).

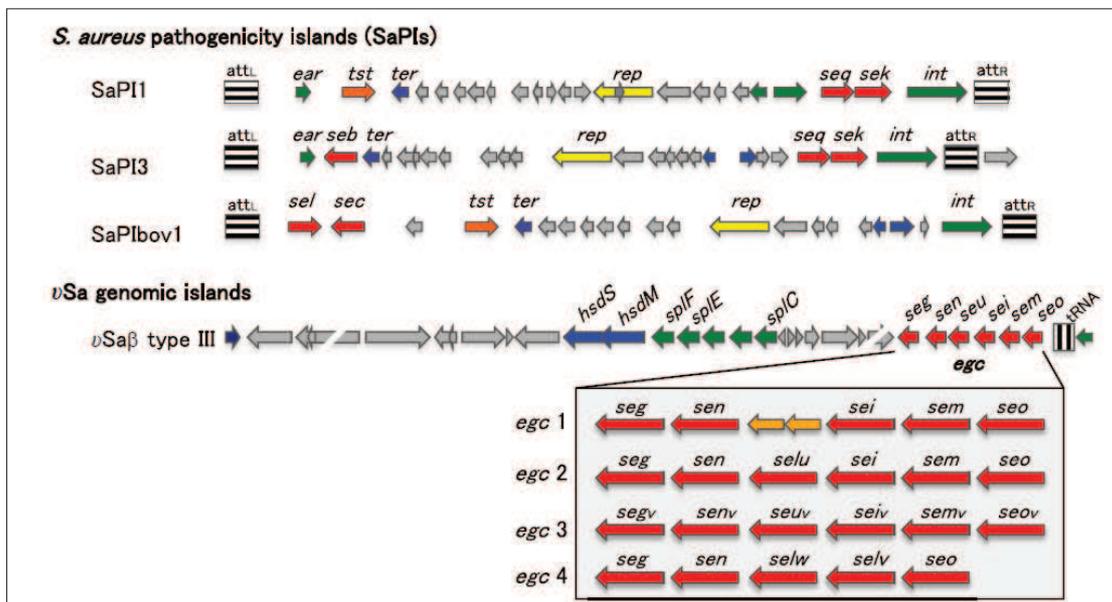


Figure II-1: Les gènes d'entérotoxines portés sur des îlots génomiques mobiles

3.3. Cluster des gènes des entérotoxines (*egc*)

L'*enterotoxin gene cluster* (*egc*) est organisé comme un opéron avec plusieurs variantes. Le premier *egc* (*egc1*) se compose de cinq gènes (*seg*, *sei*, *sem*, *sen* et *seo*) et de deux pseudogènes (ϕ ent1 et ϕ ent2) (Monday et Bohach, 2001). La deuxième variante *egc* (*egc2*) contient un gène *sel* supplémentaire (*selu*) (Letertre et al., 2003).

Les variantes alléliques de chacun des gènes *egc2* compose le cluster *egc3* (Letertre et al., 2003; Collery et al., 2009), et deux nouveaux gènes *sel* (*selv*, *selw*) sont présents en *egc4* (Thomas et al., 2006). Ce locus joue probablement le rôle de pépinière pour les gènes codants les entérotoxines staphylococciques. Des phénomènes de duplication et de

recombinaison à partir d'un même gène ancestral peuvent en effet être à l'origine de nouvelles toxines (Letertre et *al.*, 2003 ; Thomas et *al.*, 2006).

3.4. Cassette chromosomique staphylococcique (SCC)

Les SCC sont de grandes pièces d'ADN qui s'insèrent dans le gène *orfX* de *S. aureus*. Elles portent le gène *mecA* codant pour la résistance à la méthicilline (*SCCmec*) (Lindsay, 2010). Les SCC peuvent également transporter d'autres gènes de virulence ; ainsi, le gène *seh* a été trouvé à proximité de l'élément *SCCmec* type IV de *S. aureus* MW2, cet élément *SCCmec* est différent de celui portant le gène *mecA*.

3.5. Bactériophages (prophages)

Les gènes codant les SEs peuvent être portés par des bactériophages (prophages) (Coleman et *al.*, 1989). Les bactériophages sont classés en familles selon la séquence du gène et selon le type de l'intégrase, qui détermine le site d'intégration dans le génome (Lindsay et Holden, 2004).

Les phages qui portent les gènes *sea*, *sek*, *sep*, et *seq* appartiennent à la famille des virus bactériens tempérés portant une queue des *Siphoviridae* (Coleman et *al.*, 1989). Trois gènes (*sea*, *selk*, et *selq*) sont portés par les phages ϕ Sa3ms et ϕ Sa3mw, cependant un seul gène (*sea* ou *sep*) est porté par les phages ϕ Mu3A, ϕ Sa3a, et d'autres phages (Figure II-2).

Quand un phage s'intègre au chromosome, il devient un prophage stable et se réplique avec le reste du génome, en étant transféré verticalement aux cellules bactériennes filles, l'intégration de ces phages dans le chromosome de *S. aureus* se produit par un événement de recombinaison site-spécifique entre le site *attP* dans le génome du phage et le site *attB* situé dans le gène de la β -hémolysine dans le chromosome bactérien (Coleman et *al.*, 1989).

3.6. Plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires, ils peuvent véhiculer des déterminants de la résistance et de la virulence par transfert génétique horizontal. Chez *S. aureus*, deux types de plasmides portant des gènes des entérotoxines ont été caractérisés, le pIB485 et pF5 (Omoe et *al.*, 2003; Ono et *al.*, 2008). Le type pIB485 porte les gènes *sed*, *selj* et *ser* (Ono et *al.*, 2008; Goerke et *al.*, 2009). Deux nouveaux gènes (*ses* et *set*) codant

des entérotoxines ont été détectés dans le plasmides pF5 (Omoe et *al.*, 2003; Ono et *al.*, 2008).

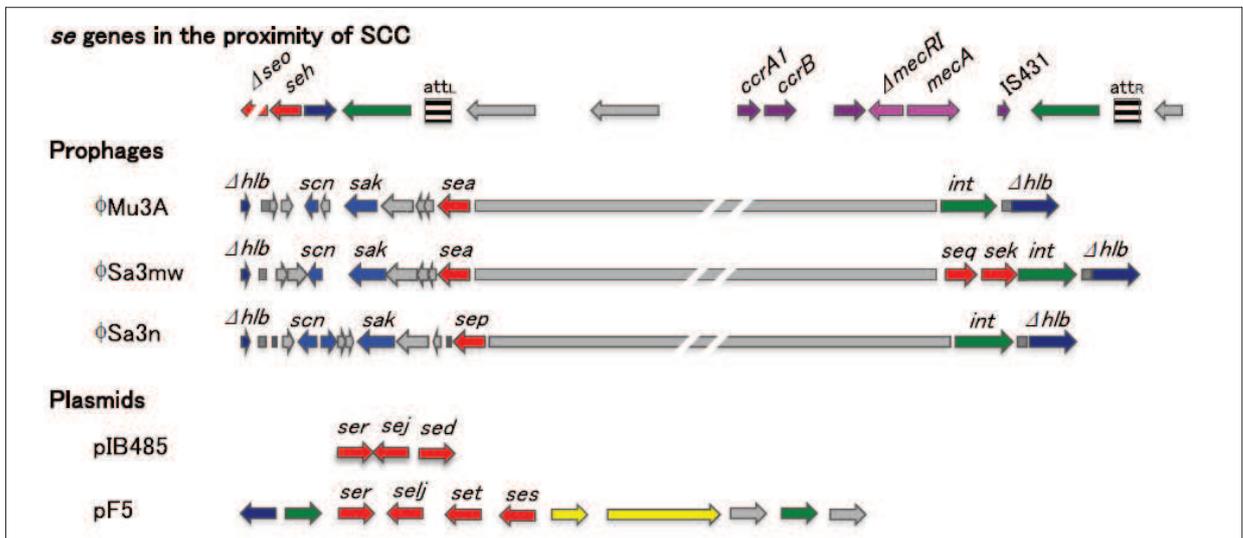


Figure II-2: Gènes d'entérotoxines portés par les bactériophages et les plasmides chez *S.aureus*.

4. Structures moléculaires des entérotoxines staphylococciques

Les SEs et les SE/s sont des protéines globulaires à chaîne unique, avec des poids moléculaires allant de 19 à 29 kDa. Ces toxines possèdent une structure semblable, bien que les séquences primaires des protéines soient différentes. L'examen des séquences alignées montre que les SEs et les SE/s possèdent plusieurs segments linéaires des acides aminés semblables aux autres toxines superantigéniques (McCormick et *al.*, 2001). Selon l'homologie des séquences de nucléotides et des acides aminés, les toxines superantigéniques (SAG) peuvent être classées en cinq groupes (Figure II-3).

- Groupe I comprend la toxine TSST-1, et l'entérotoxine SE/X (Mitchell et *al.*, 2000 ; Wilson et *al.*, 2011). Elles sont dépourvues d'activité émétique (McCormick et *al.*, 2001).
- Le groupe II (groupe SEB) inclut SEB, SEC, SEG, SE/U, et SE/W (Fitzgerald et *al.*, 2003). Ces toxines sont dotées d'activité émétique et contiennent la structure de base des SAg, plus une boucle de cystine qui a une séquence variante de 10 à 19 acides aminés (Schlievert et *al.*, 2000).
- Le groupe III (groupe SEA) inclut SEA, SED, SEE, SEH, SE/I, SEN, et SEP. Parmi les différents types des entérotoxines : SEA, SEE, SEP et SEJ partagent la plus forte

homologie de séquences d'acides aminés allant de 65% à 83%. Elles contiennent une boucle de cystine comme le groupe II-SAg, mais la boucle est toujours longue de neuf acides aminés (Fitzgerald et *al.*, 2003; Spaulding et *al.*, 2013).

- Le groupe IV est produit par les streptocoques, mais pas par *S. aureus*. Les SAg du groupe IV n'ont pas la boucle de cystine requise pour l'activité émétique.
- Le groupe V (groupe SEI) est le dernier groupe décrit et contient beaucoup de SAg récemment découverts comme SEI, SEK, SEL, SEM, SEQ, SET et SEV (Orwin et *al.*, 2001, 2002, 2003).

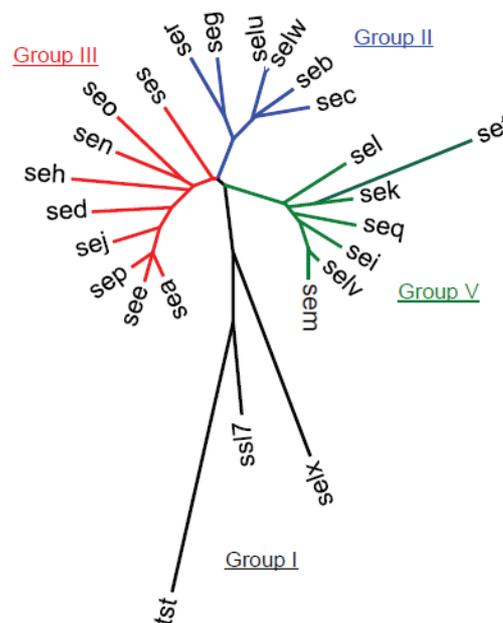


Figure II-3 : Classement des toxines superantigéniques selon leurs séquences d'acides aminés.

5. Caractéristiques biologiques des entérotoxines staphylococciques

5.1. Activité émétique

Les SE et les SE/s partagent des propriétés biochimiques et structurales communes et sont remarquablement thermostables. La virulence de ces toxines ne peut être diminuée que progressivement par l'ébullition prolongée ou l'autoclavage. Elles sont très stables et résistantes à la plupart des enzymes protéolytiques, et conservent ainsi leur activité dans le tube digestif après ingestion.

Des études ont signalé que l'entérotoxine SEA a montré une résistance marquée au traitement thermique, à la digestion par la pepsine et à la trypsine. Malgré que

l'entérotoxine SEA ait été dégradée en fragments plus petits, elle a conservé ces propriétés superantigéniques et son activité émétique, indiquant que les aliments contaminés par des entérotoxines, même s'ils étaient cuits, peuvent également provoquer des toxi-infections alimentaires (Li et al., 2011).

Bien que les manifestations cliniques soient connues, la physiopathologie des symptômes et les mécanismes des vomissements induits par les SEs ne sont que partiellement compris. Le manque de progrès dans l'étude des mécanismes de l'activité émétique des SEs peut être partiellement attribué au manque de modèle animal. Les singes ont été considérés comme des modèles animaux de choix, mais leur utilisation dans l'étude des SEs est limitée par le coût élevé, la disponibilité des animaux et l'éthique. D'autres animaux tels que la souris, le rat, le lapin et le chat sont moins sensibles et leurs réponses aux SEs ne sont pas spécifiques (Hu et al., 1999).

La grande Pachyure ou Musaraigne des maisons (*Suncus murinus*) est une espèce de mammifères insectivores de la famille des Soricidae, elle a été utilisée comme modèle animal pour l'étude de l'activité émétique de l'entérotoxines SEA (Hu et al., 1999).

Certaines études suggèrent que les SEs agissent directement sur l'épithélium intestinal et sur le nerf vague provoquant une stimulation des centres émétiques et du transit intestinal (Arbuthnott et al., 1990). La quantité de SE capable de provoquer les symptômes de toxi-infections alimentaires par les staphylocoques varie en fonction des sensibilités individuelles et du type de SEs. Les doses émétiques (ED50) de SEA-SEE chez le singe varient entre 5 et 20 µg par animal (Bergdoll, 1988) mais les humains sont réputés être plus sensibles.

Les entérotoxines SEA, SEE et SEI ont montré une activité émétique plus élevée par rapport aux autres entérotoxines. Les entérotoxines SEB, SEC2, SED, SEG et SEH ont également induit des réponses émétiques dans le modèle animal, mais avec des doses relativement élevées (Hu et al., 2003). Plus récemment, les activités émétiques de entérotoxines SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP et SEQ ont été évaluées chez les singes, ces SEs testées ont induit des réactions émétiques chez des singes à une dose de 100 µg / kg (Omoe et al., 2013). Celles-ci suggèrent que les nouvelles SEs pourraient également jouer un rôle dans les toxi-infections alimentaires.

5.2. Activité superantigénique

Les entérotoxines staphylococciques appartiennent à une famille de toxines pyrogènes présentes chez les staphylocoques et les streptocoques. Ces toxines pyrogènes comprennent les entérotoxines staphylococciques A à R (SEA-SER) et la toxine TSST-1, les exfoliatines A et B et les toxines pyrogènes streptococciques (Fraser et Proft, 2008).

Ces toxines sont dotées d'une activité superantigénique, qui résulte de l'interaction directe des SEs avec les cellules T réceptrices d'antigènes (TCR pour T-Cell antigen Receptor) et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ces toxines bactériennes sont appelées «superantigènes» en raison de leur puissance à stimuler les lymphocytes T à des concentrations minimales en picomolaires (Choi et *al.*, 1989). Contrairement aux antigènes classiques, ces exotoxines contournent le mécanisme conventionnel de traitement des antigènes, se lient à l'extérieur d'une rainure de liaison peptidique des molécules de classe II du CMH sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et les régions V β spécifiques des récepteurs des lymphocytes T (TCR), pour activer les lymphocytes T (Marrack et Kappler, 1990).

La double affinité des superantigènes staphylococciques pour les molécules du CMH classe II et les chaînes spécifiques TCR V β permet à ces toxines de perturber le système immunitaire et d'induire une production massive des cytokines inflammatoires, de chimiokines, de facteur tissulaire et d'enzymes lytiques (Mattsson et *al.*, 2003).

Les quantités importantes des cytokines inflammatoires, le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), et l'interleukine 1 (IL-1) conjointement avec d'autres cytokines et chimiokines déclenchent la fièvre, l'hypotension et le choc (Krakauer et *al.*, 1998). L'IL-2 provenant des lymphocytes T activés par le superantigène, provoque une vasodilatation et contribue à la fuite vasculaire et à l'œdème (Vial et Descotes, 1995).

L'entérotoxine SEB ou la toxine TSST-1 sont capables d'induire plusieurs facteurs d'inflammation y compris les chimiokines, IL-8, laprotéine (MCP-1) chimiotactique des monocytes, la protéine inflammatoire des macrophages 1 α (MIP-1 α), ces facteurs vont diriger la migration de leucocytes, neutrophiles et cellules dendritiques aux sites de lésion tissulaire (Krakauer, 1999).

6. Production des entérotoxines staphylococciques

6.1. Régulation de la production

Les entérotoxines classiques SEA et SEE sont codées par des gènes portés sur des bactériophages. Le gène *sea* est porté par un bactériophage de la famille des phages tempérés (Betley et Mekalanos, 1985). Le bactériophage est inséré dans le chromosome bactérien comme un prophage et se comporte comme une partie du génome bactérien. Cependant, sous l'action d'un stress environnemental, telles que les conditions de conservation des aliments, le prophage peut être induit à répliquer son génome et libérer un nouveau bactériophage (Wallin-Carlquist et *al.*, 2010). Il a été démontré que la transcription du gène *sea* est liée au cycle de vie du prophage codant l'entérotoxine SEA contrairement aux autres gènes (*seb*, *sec* et *sed*) portés par d'autres éléments non phagiques (Sumbly et Waldor, 2003).

L'entérotoxine SEE est la toxine la plus proche de SEA, ayant 90% de similarité en acides aminés (Fraser et Proft, 2008). Le gène *see* est situé sur un prophage défectueux, contrairement au phage portant le gène *sea*, l'expression du gène *see* n'est pas affectée par la croissance bactérienne (Derzelle et *al.*, 2009).

Les gènes *seb*, *sec* et *sed*, sont sous le contrôle d'un gène régulateur accessoire (*agr*), ce système agit en combinaison avec le système *sar* (staphylococcal accessory regulator) (Cheung et *al.*, 1992).

Malgré que les gènes codant les entérotoxines staphylococciques sont portés par différents éléments génétiques mobiles, l'expression des gènes *seb*, *sec* et *sed* est induite au cours de la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire de croissance bactérienne (Derzelle et *al.*, 2009).

Le locus *agr* génère deux différents transcrits, RNAII et RNAIII, pilotés par les promoteurs P2 et P3, respectivement. À mesure que la cellule croît, le niveau intracellulaire de l'ARN III augmente en raison du circuit d'autorégulation de système *agr*, conduisant à une transcription accrue des facteurs de virulence tels que les entérotoxines (Dunman et *al.*, 2001). La perte du signal de système *agr* de transduction entraîne une perte substantielle du niveau de transcription de gène *seb*, *sec* et *sed* correspondant à la production des entérotoxines SEB, SEC et SED (Bayles et Iandolo, 1989).

6.2. Facteurs influençant la production

La toxi-infection alimentaire causée par les staphylocoques est souvent associée à la croissance des staphylocoques dans des aliments riches en protéines tels que la viande et les produits laitiers (De Buyser et *al.*, 2001). Ces produits sont des matrices très complexes en comparaison avec les bouillons utilisés en laboratoire, ces différences se résument en contenu microbien, teneur en sel, pH, disponibilité des nutriments, disponibilité de l'oxygène et la température (Valero et *al.*, 2009). Généralement, la croissance de staphylocoques est nécessaire pour la production des entérotoxines, bien que la production des entérotoxines n'accompagne pas toujours la croissance bactérienne (Wallin-Carlquist et *al.*, 2010).

Plusieurs études ont été réalisées pour identifier les paramètres clés pour prévenir ou stimuler la production des entérotoxines dans les milieux de culture dans les laboratoires et dans divers matrices alimentaires, et un réseau multiforme de facteurs environnementaux et génétiques semble réguler la production des entérotoxines (Wallin-Carlquist et *al.*, 2010). Certains de ces facteurs sont résumés dans le tableau II-2 (Schelin et *al.*, 2011).

Tableau II-2 : Facteurs influençant la croissance de *S.aureus* et la production des entérotoxines (Schelin et *al.*, 2011).

| Facteur | croissance optimale | limites de croissance | Optimum de production des entérotoxines | limites de production des entérotoxines | Entérotoxine concerné | effet (s) sur la production d'entérotoxine | Exemples de produits alimentaires |
|---------------------------|---------------------|-----------------------|---|---|--------------------------------|--|--|
| Température | 35–41°C | 6–48°C | 34–40°C | 10–46°C | SEA, SEB, SEC, SED | La température affecter la synthèse de l'entérotoxine plus que croissance bactérienne. | Lait Jambon, ovoproduits |
| pH | 6–7 | 4–10 | 7–8 | 5–9.6 | SEA, SEB, SEC, SED, SEE | Plus haute tolérance sous aérobie par rapport à conditions de croissance anaérobies. Acide lactique inhibe la formation de toxines. Régulation par <i>agr</i> système (SEC) | Jambon Saucisse |
| <i>a_w</i> | 0.99 | 0.83 ≥ 0.99 | 0.99 | 0.86 ≥ 0.99 | SEA, SEB, SEC, SEH | SEB et SEC sont plus sensibles que SEA et SEH. production SEH à un <i>a_w</i> : 0.97 > 1 > 0.95 | Viande bœuf et porc salé, Bacon, crevettes Saucisse |
| NaCl | 0% | 0–20% | 0% | <12% | SEA, SEB, SEC | Augmentation de la température limite la production de SEA. Faible osmolarité augmente la production de l'entérotoxine La production de SEB semble plus fortement inhibée que la croissance. | Jambon Saucisse |
| Oxygène | Aerobic | Anaerobic aerobic | Aerobic | Anaerobic aerobic | SEA, SEB, SEC, SEH | Augmente le rendement de SEB jusqu'à 10 fois. 10% d'oxygène dissous est optimal pour la production de SEB. | Jambon, Crevette Saucisse |
| Potentiel rédox | >+200 mV | ≥200 to >+200 mv | >+200 mV | ≥100 to >+200 mv | - | - | - |
| <i>Lactococcus lactis</i> | - | - | - | - | <i>sec, sel(sek, seg, seh)</i> | Réduit fortement la transcription de <i>sec</i> et <i>sel</i> et légèrement <i>sek, seg, seh</i> | fromage |
| | - | - | - | -- | <i>sea</i> | Peut favoriser l'entretien de la <i>sea</i> pendant la phase stationnaire. | - |

7. Les entérotoxines chez les staphylocoques à coagulase négative

Actuellement, le potentiel entérotoxigène des espèces de groupe staphylocoques à coagulase négative (SCN) reste peu concluant (Le Loir et *al.*, 2003; Doyle et *al.*, 2012; Podkowik et *al.*, 2013; Becker et *al.*, 2014). Des études utilisant la PCR et le séquençage du génome entier ont détecté des gènes codant les entérotoxines chez certaines espèces des SCN, mais peu d'études ont démontré la capacité de ces espèces à produire des entérotoxines (Le Loir et *al.*, 2003; Park et *al.*, 2011; Doyle et *al.*, 2012; Podkowik et *al.*, 2013).

Park et *al.* (2011) ont examiné les profils génétiques des entérotoxines de 263 souches de SCN isolées à partir des mammites bovines et ont déterminé par multiplex PCR qu'environ 31% des isolats (11 espèces différentes), portaient un ou plusieurs gènes codants les entérotoxines (Park et *al.*, 2011). Les gènes codant les entérotoxines SEB, SE/N et SE/Q étaient prédominants chez *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri* subsp. *carnaticus*, *S. simulans*, *S. succinus* et *S. xylosus* (Park et *al.*, 2011).

Rosec et Gigaud (2002) ont examiné 332 souches de staphylocoques d'origine alimentaire, ils n'ont pas détecté des gènes codant les SEs classiques (SEA-SEE) et les entérotoxines nouvelles (SEG-SEJ). Néanmoins, Bautista et *al.* (1988) ont utilisé un test ELISA pour détecter les entérotoxines classiques SEA, SEC et SED chez 124 souches des espèces de SCN (*S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* et *S. haemolyticus*) isolées à partir du lait de brebis, ils ont trouvé que 78 souches produisaient les entérotoxines A, B, C ou D. Cependant, il y a eu un rapport indiquant qu'une espèce staphylococcique (*S. intermedius*) autre que *S. aureus* est responsable d'un foyer de toxi-infection alimentaire (Khambaty et *al.*, 1994; Becker et *al.*, 2001).

8. Conclusion

La famille des SEs et des SE/s continue de croître. La question la plus intéressante est de se demander pourquoi *S. aureus* possède des toxines génétiquement et antigéniquement distinctes, et extrêmement puissantes. Les SEs et SE/s fonctionnent toutes les deux comme des toxines gastro-intestinales puissantes et des toxines superantigéniques. Il est clair que ces toxines représentent un facteur de virulence unique et bien adapté, bien que la fonction évolutive de ces toxines et le cycle de vie de *S. aureus* ne soit toujours pas totalement éclairci. La poursuite des efforts pour comprendre la biologie complexe et la relation entre les différentes fonctions de la famille des SEs répondra sans doute à beaucoup de ces questions (Williams et *al.*, 2000).

Chapitre III

Résistance des staphylocoques aux antibiotiques

1. Introduction

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes peut être définie microbiologiquement ou cliniquement. La résistance microbiologique est la présence d'un mécanisme de résistance génétiquement déterminé (acquis ou muté), catégorisant la bactérie pathogène comme résistante ou sensible sur la base d'un aspect phénotypique suite à l'application d'un test de laboratoire. La résistance clinique est un niveau d'activité antimicrobienne qui est corrélée avec une forte probabilité d'échec thérapeutique; en d'autres termes, traiter un malade avec un médicament auquel il a été testé sensible, donne un meilleur résultat que celui qui est traité avec un médicament auquel l'agent pathogène a été testé résistant (MacGowan, 2008).

La résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique. L'utilisation massive des antibiotiques au début des années 80 a contribué de façon significative à une amplification majeure et rapide du phénomène de résistance. Les mécanismes de résistance des bactéries ne sont pas apparus suite à l'utilisation des antibiotiques, ils existaient bien avant afin de permettre à celles-ci de survivre en présence d'antimicrobiens environnementaux. Cependant leur introduction a favorisé la pression sélective pour certaines résistances (Davies et Davies, 2010).

Les souches de *S. aureus* ne se retrouvent pas seulement sur la peau ou les muqueuses de l'homme et les animaux, elles vivent dans un environnement polymicrobien et sont en contact étroit avec d'autres bactéries. *S. aureus* peut également être échangé entre l'homme et / ou les animaux, soit par contact direct, soit par inhalation d'aérosols et de poussières contenant des *S. aureus*, ou par manipulation ou ingestion d'aliments contaminés par *S. aureus* (Schwarz et al., 2017). Les travaux sur la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques ont révélé que :

- Les souches de *S. aureus* peuvent agir en tant que donneur et récepteur de gènes de résistance aux antibiotiques par transfert génétique.
- De nombreux gènes de résistance retrouvés chez *S. aureus* sont portés sur des éléments génétiques mobiles.
- L'acquisition de nouveaux gènes de résistance par *S. aureus* est un processus continu résultant d'une interaction avec d'autres bactéries (Kadlec et al., 2012).

2. Résistance naturelle

La résistance naturelle d'une bactérie à un antibiotique est une caractéristique propre à une espèce bactérienne, qui est partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle délimite le spectre naturel de l'antibiotique et constitue une aide à l'identification taxonomique, elle se traduit habituellement par des CMI supérieures à la valeur critique basse de concentration de l'antibiotique concerné (CA-SFM, 2009).

Par exemple, les bêta-lactamines agissent sur les parois, or les mycoplasmes ne possèdent pas de paroi, ils sont donc naturellement résistants à ces antibiotiques (Fenollar, 2016).

3. Résistance acquise

La résistance acquise se produit lorsque des bactéries naturellement sensibles gagnent les gènes codant un mécanisme de résistance par mutation ou par transfert de matériel génétique des bactéries de même espèce ou une espèce différente.

Les gènes de résistance aux antimicrobiens sont portés et véhiculés par des éléments génétiques mobiles; qui sont soit des plasmides ou des transposons (séquences mobiles de l'ADN qui peuvent passer à des positions différentes dans le génome). Lorsque des antibiotiques sont fréquemment utilisés, cela exerce une pression de sélection en faveur des bactéries possédant des mécanismes de résistance qui sont capables de transmettre les gènes de résistance à d'autres bactéries (Gaudy et Buxeraud, 2005 ; Costelloe et *al.*, 2010). Par exemple, la cible d'un antibiotique peut être altérée suite à une seule modification génétique : Lorsqu'une mutation ponctuelle survient sur un seul acide aminé de l'ADN gyrase ou la topoisomérase IV, la cible des quinolones est altérée (Wax et *al.*, 2008).

4. Bactéries multi-résistantes

Il apparaît que la définition de la multirésistance est une tâche difficile, et un concept qui varie selon les utilisateurs. Les deux sens les plus communément acceptés de la multirésistance bactérienne tournent autour des bactéries qui sont résistantes aux nombreux antibiotiques. La définition tenant compte des deux types de résistance naturelle et acquise (Lina et Cattoir, 2014).

La définition de la multirésistance doit être bioclinique, il s'agit de bactéries qui ne sont sensibles qu'à un petit nombre (entre 0 et 3) de familles ou sous-familles d'antibiotiques utilisables en clinique avec une probabilité de forte efficacité thérapeutique. Le choix de la

notion de familles ou sous-familles d'antibiotiques plutôt que celui de molécules antibiotiques repose sur des raisons évidentes de sensibilité/résistance croisée des bactéries au sein d'une même famille d'antibiotiques (Andrernont, 1997; Waters et *al.*, 2011).

5. Résistance aux β -Lactamines

5.1. Historique

Depuis l'introduction des antibiotiques en utilisation clinique durant les années 1940, les microorganismes sont montrés une capacité remarquable à se protéger en développant une résistance aux antibiotiques. En 1942, la résistance à la pénicilline a été signalée chez *S. aureus* après seulement quelques mois d'essais cliniques de cet antibiotique (Bradley, 1992). En 1953, l'utilisation de la pénicilline était très répandue en thérapeutique des infections staphylococciques, et 64% à 80% des isolats de *S. aureus* étaient déjà résistants à la pénicilline. A cette époque, des cas de résistance à la tétracycline, à l'érythromycine et à d'autres classes d'antibiotiques commençaient à émerger (Bradley, 1992). Depuis 1960, les staphylocoques résistants aux antibiotiques sont devenus une problématique majeure des infections nosocomiales dans le monde (Wise et *al.*, 1989). Dans les années 1970, la résistance à la pénicilline était également répandue chez les isolats de *S. aureus* communautaires. A cette époque, les taux de *S. aureus* résistants à la pénicilline étaient à peu près les mêmes pour les isolats hospitaliers et communautaires (Chambers, 2001).

La méthicilline, un β -lactame efficace contre les souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline, est devenue largement disponible en 1960. Comme le développement de la résistance à la pénicilline, moins d'un an après son introduction, *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) a été signalé au Royaume-Uni (Hiramatsu, 1998). Plus tard, des rapports ont signalé l'apparition des SARMs aux États-Unis (Bulger, 1967), avec la première éclosion en 1968 (Barrett et *al.*, 1968). Ces SARMs étaient résistants à toute la classe des β -lactames. De nos jours, les SARMs sont omniprésents dans les hôpitaux, la communauté, les animaux de compagnie et les animaux d'élevage (Weese et *al.*, 2006; Wulf et Voss, 2008).

5.2. Mécanismes de résistance

Les bêta-lactamines inhibent l'activité de la transpeptidase et des autres enzymes qui catalysent la formation des liaisons entre les polymères glycopeptidiques de la paroi bactérienne (Finch et *al.*, 2003). Ces enzymes sont appelés "protéines liants les

pénicillines” (PLPs) ou “penicillin-binding proteins” (PBPs). La liaison des β -lactamines aux PLPs inhibe la réaction de transpeptidation de celle-ci, ce qui entraîne un arrêt de la biosynthèse de la paroi conduisant à la mort de la bactérie (Prescott et *al.*, 2000). Les bêta-lactamines sont bactéricides, mais causent seulement la lyse des cellules bactériennes en croissance. L'efficacité des différentes bêta-lactamines dépend de l'affinité des différentes PLPs envers ces antibiotiques, de la quantité de PLPs, de la quantité de peptidoglycane présent (Prescott et *al.*, 2000).

Deux mécanismes différents expliquent la résistance des *S. aureus* aux β -lactamines: le premier résulte de l'inactivation enzymatique (hydrolyse de l'anneau bêta-lactame) par une β -lactamase codée par le gène *blaZ*, qui confère une résistance aux pénicillines sauf les isoxazolyl-pénicillines. Le support génétique de la résistance aux β -lactamines (*blaZ*) s'organise comme un opéron, l'opéron *blaZ-blaI-blaR1* a été identifié sur le transposon Tn552 (Rowland et Dyke, 1989). Ce transposon complet ou seulement des parties ont été détectés sur des plasmides et dans l'ADN chromosomique de souches de *S. aureus* isolées de l'homme et des animaux (Jensen et Lyon, 2009). L'opéron *blaZ* était également présent en tant que support de résistance aux β -lactamines dans de nombreux SARMs isolés des animaux, tels que les chevaux (Walther et *al.*, 2009), les ânes, les moutons (Gharsa et *al.*, 2012), les poulets et les dindons (Monecke et *al.*, 2012).

Le deuxième mécanisme de résistance résulte d'un remplacement du site cible par les produits du gène *mecA* ou *mecC* (anciennement connu sous le nom de *mecA_{LGA251}*). Les gènes *mecA* et *mecC* codant pour une protéine PLPs modifiée (PLP2a), (également appelée PLP'), cette protéine confère une résistance à toutes les β -lactamines et leurs dérivés y compris la résistance des *S. aureus* à la méthicilline (SARM). *S. aureus* exprime nativement quatre autres PLPs, appelées PLP1, 2, 3 et 4, qui sont tous sensibles aux antibiotiques β -lactamines (Hiramatsu, 1995). Chez les SARMs, la PBP2a est soit constitutionnellement présente ou induite lorsque la bactérie est en présence d'une bêta-lactamine. La PBP2a, ayant une faible affinité pour les bêta-lactamines, n'est pas affectée par ces antibiotiques et permet ainsi à la bactérie de continuer la biosynthèse de sa paroi (Gilmore et *al.*, 2008).

Les deux gènes *mec* (*mecA* et *mecC*) sont portés sur un élément génétique mobile, îlot génétique appelé "Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*" (SCC*mec*). La SCC*mec* est une séquence d'ADN de 21 à 67kb qui est toujours située près de l'origine de réplication du chromosome de la bactérie (Chambers, 1999) (figure III-1). Au moins 13 sous-types de

SCC*mec* divers ont été décrits chez les souches SARMS isolées chez l'homme et les animaux (IWG-SCC, 2009). Le gène *mecA* est porté par plus de 90% des SARMS (Hiramatsu, 1995). Le gène *mecA* code pour la PLP2a de 78 kD de poids moléculaire, cela se produit chez les SARMS et même chez les staphylocoques à coagulase négative (SCN) résistants à la méthicilline (Kobayashi et al., 1995).

A l'instar de gène *mecA* qui code pour une PLP2a, le gène *mecC* code pour une PLP2c possédant-elle aussi une faible affinité pour l'ensemble des bêta-lactamines, le gène *mecC* était initialement retrouvé chez *S. aureus* isolés de l'homme et des bovins (García-Álvarez et al., 2011, Laurent et al., 2012). Plus tard différentes études ont détecté ce gène chez des *S. aureus* isolés des chats en Norvège (Medhus et al., 2013), de chien, de rats bruns, d'un lapin, d'un phoque commun, de moutons et d'un pinson au Royaume-Uni (Paterson et al., 2012). En Allemagne, Walther et al. (2012) l'ont trouvé chez des *S. aureus* isolés des chats, des chiens et d'un cobaye (Walther et al., 2012).

De nombreuses études ont décrit la présence des souches SARM avec les mêmes caractéristiques portant soit le gène *mecA* (Feßler et al., 2010; Smith et al., 2013 ; Grøntvedt et al., 2016) soit le gène *mecC* (Benito et al., 2016; Drougka et al., 2016) chez l'homme et les animaux, ces études suggèrent la possibilité d'une transmission zoonotique de ces isolats.

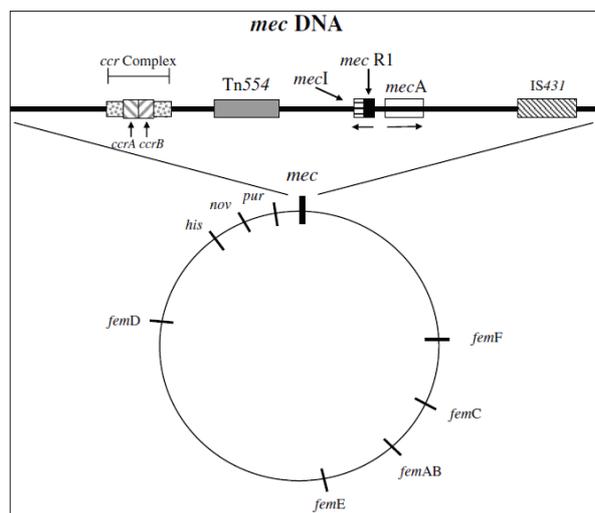


Figure III-1 : Organisation et localisation chromosomique de la région SCC*mec* au niveau de l'ADN (le gène *mecA* et les éléments régulateurs *mecl-mecR1*) (Wax et al., 2008).

5.3. Epidémiologie des SARMs

Les fosses nasales de l'homme sont le réservoir naturel des *S. aureus* où ils peuvent être isolés chez 10% à 40% des adultes en bonne santé (Dennesen et *al.*, 1998). A partir des narines, *S. aureus* se propage à la peau puis aux plaies chirurgicales, aux corps étrangers (par ex. dispositifs médicaux), aux brûlures, et aux voies respiratoires supérieures, les mains étant le principal mode de transmission (Dennesen et *al.*, 1998). Les *S.aureus* sont incriminés dans les infections post-chirurgicales beaucoup plus fréquemment chez les porteurs nasals que chez les non-porteurs (Casewell, 1998).

5.3.1. SARMs liés aux infections hospitalières (SARM-H)

Les infections aux SARMs ne se développent pas chez les personnes en bonne santé, elles sont plus fréquentes chez celles qui sont déjà hospitalisées, car la bactérie trouve souvent un point d'entrée dans le corps, tel qu'une plaie chirurgicale. Une souche SARM est introduite dans un établissement de santé principalement par l'admission d'un patient infecté ou porteur qui sert comme réservoir (Mulligan et *al.*, 1993). Le principal mode de transmission des SARM au sein des hôpitaux se fait par le biais des mains des travailleurs de la santé qui acquièrent la bactérie après un contact étroit avec des patients porteurs ou du matériel contaminé (Mulligan et *al.*, 1993; Dennesen et *al.*, 1998). Plus rarement, les patients peuvent contracter le SARM suite à une transmission aérienne (Dennesen et *al.*, 1998).

Plusieurs facteurs de risque sont liés aux disséminations des SARM au sein des établissements hospitaliers ; celles-ci incluent une hospitalisation préalable, l'admission dans une unité de soins intensifs, les actes invasifs (interventions chirurgicales), les lésions cutanées, l'âge et un traitement antimicrobien antérieur (Monnet, 1998). D'autres facteurs favorisent aussi les infections aux SARMs, il s'agit de l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, de dispositifs à demeure (sondes, cathéters), de la gravité de la maladie sous-jacente et de la durée du séjour à l'hôpital (Craven et *al.*, 1981; Bradley, 1992).

En Algérie, des études ont rapporté l'émergence des SARMs dans des établissements de santé au niveau d'Alger (Ramdani-Bougoussa et *al.*, 2006 ; Antri et *al.*, 2011 ; Djoudi, et *al.*, 2013), de Tlemcen (Rebiahi et *al.*, 2011) et de Constantine (Ouchenane et *al.*, 2011).

5.3.2. SARMs liés aux infections communautaires (SARM-C)

Les SARMs dans les infections communautaire sont été décrits pour la première fois au cours de la flambée des infections à SARM à Detroit (USA) en 1980-1981 (Herold et *al.*, 1998). Au milieu des années 1990, les infections communautaires à SARM commençaient à être décrites chez des personnes sans facteurs de risque identifiables. Bien qu'il soit difficile de distinguer entre infections à SARMs nosocomiales et communautaires, il a été observé que les souches de SARMs d'origine communautaire étaient résistants seulement aux β -lactamines, contrairement aux SARMs responsables des infections nosocomiales, les SARMs d'origine communautaire avaient tendance à rester sensibles à la plupart des classes d'antibiotiques, y compris la clindamycine, les macrolides, les fluoroquinolones, la triméthopime-sulfaméthoxazole et les aminoglycosides (Herold et *al.*, 1998).

Les facteurs de risque favorisant la dissémination des SARM-C sont divers, tels que le portage persistant, le séjour hospitalier récent (au cours des 12 derniers mois), les maladies sous-jacentes graves, les traitements antibiotiques antérieurs, ou une résidence de longue durée dans un établissement de soins, un contact étroit entre les personnes dans les milieux sportifs, les écoles, les crèches et les prisons (Catry et *al.*, 2010).

En 2002, un nouveau type de SCC (type IV) a été détecté chez une souche SARM d'origine communautaire et s'est avéré présent dans 89% des isolats de SARM liés aux infections communautaires (Ma et *al.*, 2002). Cet élément génétique ne porte que le gène de résistance *mecA*, ce qui confirme que les souches SARM-C tendent à être sensibles aux antibiotiques autres que les β -lactamines (Hiramatsu et *al.*, 2001).

La prévalence des SARM-C varie considérablement d'un pays à l'autre. Aux Etats-Unis, les SARM-C ont été isolés chez 59% des patients ayant des infections communautaires (Moran et *al.*, 2006). La prévalence est généralement faible en Europe, mais elle a atteint 45% en Grèce (Chini et *al.*, 2006). En Algérie, la prévalence de SARM-C est moins documentée que celles des SARM-H. Néanmoins des études ont mis l'accent sur la dissémination des SRAM-C au sein de la communauté (Antri et *al.*, 2010 ; Djoudi, et *al.*, 2013 ; Alioua et *al.*, 2014).

5.3.3. SARMs associé au bétail (SARM-AB)

L'épidémiologie des SARMs a changé depuis les années 1990 avec l'émergence de nouveaux éléments *SCCmec* tels que les types IV et V (2B, 5C2) (Kaneko et Kamio,

2004). Depuis 2003, certaines souches de SARM portant le SCC*mec* IV ou V se sont répandues dans le bétail, révélant le véritable potentiel zoonotique de *S. aureus* et même les SARM (Nemati et *al.*, 2008).

6. Résistance aux tétracyclines

Les tétracyclines sont à l'origine produites naturellement par *Streptomyces* spp. Elles ont un large spectre d'action grâce à leur activité contre les bactéries à Gram positif, Gram négatif, aérobies et anaérobies. Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques qui inhibent la synthèse protéique, elles se lient à la sous-unité 30S du ribosome et empêchent la liaison de l'aminocyl-ARNt au site accepteur sur le complexe ribosome-ARN messenger. Cela empêche l'élongation des chaînes de peptides et inhibe la synthèse protéique (Prescott et *al.*, 2000; Finch et *al.*, 2003).

Chez *S. aureus*, la résistance aux tétracyclines est due à deux mécanismes : soit par l'élimination des tétracyclines intracellulaires par un système d'efflux actif, soit par la protection du ribosome par modification de la cible et la modification des tétracyclines par des enzymes (Speer et *al.*, 1992). Les protéines TetK et TetL peuvent expulser des tétracyclines sauf la minocycline, tandis que la protéine de protection des ribosomes TetM, confère également une résistance à la minocycline. Aucun de ces facteurs n'entraîne de résistance à la glycylycylcine-tigécycline (Roberts, 1996).

Le gène *tetK* est souvent porté sur de petits plasmides d'environ 4,5 kb (Khan et Novick, 1983). Le gène *tetL* est rarement observé chez *S. aureus* (Schwarz et *al.*, 1998), sauf chez les SARMS associés aux animaux d'élevage comme les porcs, les bovins et la volaille (Kadlec et *al.*, 2009; Feßler et *al.*, 2010; Monecke et *al.*, 2012). Le gène *tetL* a été également détecté sur des plasmides (Schwarz et *al.*, 2014). Le gène *tetM* sont généralement portés sur des transposons conjugatifs d'origine entérococcique, tels que Tn916 ou Tn1545 (Roberts, 1996), ils ont été trouvés chez les SARM et même chez *S. aureus* sensible à la méthicilline (SASM) isolés de l'homme (Jensen et Lyon, 2009).

Le gène *tetM* est fréquemment trouvé chez les SARMS associés aux animaux producteurs des denrées animales (Kadlec et *al.*, 2009; Feßler et *al.*, 2010; Monecke et *al.*, 2012), ce gène a été également détecté chez des *S. aureus* sensibles à la méthicilline isolés de poulets et de dindes (Monecke et *al.*, 2012). D'autres études ont montré que les souches SARMS associées au bétail, portaient souvent les gènes *tetM*, *tetK* et *tetL* selon diverses

combinaisons, la souche peut porter soit deux gènes *tet* ou trois gènes *tet* en même temps (Kadlec et al., 2009; Feßler et al., 2010).

7. Résistance aux macrolides–Lincosamides–Streptogramine

Les lincosamides sont des agents bactériostatiques qui inhibent la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 50S du ribosome et en inhibant la peptidyl-transférase. Cette famille comprend la lincomycine, la clindamycine et la pirlimycine (Finch et al., 2003). Les streptogramines comprennent la virginiamycine, la pristinamycine et la quinupristine/dalfopristine.

Les macrolides sont des antibiotiques largement utilisés pour le traitement des infections humaines et animales. L'utilisation de ces antibiotiques a été accompagnée par la sélection de bactéries résistantes comme les staphylocoques (Schlegelova et al., 2002). Les bactéries résistantes ou les déterminants génétiques de la résistance, peuvent être transmis des animaux aux humains via les denrées alimentaires (Schlegelova et al., 2004). Les gènes de résistance aux macrolides observés chez les souches pathogènes de *S. aureus*, ont été également détectés chez les staphylocoques à coagulase négative (SCN) (Luthje et Schwarz, 2006).

La résistance aux macrolides, aux lincosamides et à la streptogramine B (MLS_B) chez *S. aureus* repose sur la présence d'un ou plusieurs gènes *erm* des classes A, B, C, F, T, Y et 33. Les gènes de type *erm* confèrent une résistance combinée aux trois types d'antibiotiques (MLS_B). Les résistances plasmidiques par méthylation d'un résidu adénine dans l'ARN ribosomale 23S de la sous-unité 50S du ribosome empêche la liaison de l'antibiotique à sa cible. Pour *S. aureus*, les gènes *erm* codent pour des méthylases qui modifient le site cible A2058 ou A2059 dans l'ARNr 23S et inhibent ainsi la liaison des composés MLS_B. Les gènes *ermA* et *ermB* sont généralement situés sur de petits transposons non-conjugatifs Tn554 et Tn917 / Tn551, respectivement (Schwarz et al., 2011, 2014). Le Tn554 a également été fréquemment trouvé intégré dans les éléments SCC_{mec} II (IWG-SCC, 2009).

Le gène *ermB* a été détecté chez les souches SARM-AB isolées des bovins (Feßler et al., 2010). Le gène *ermA* et *ermB* ont été détectés dans une grande variété de *S. aureus*, y compris les SARM, chez l'homme (Monecke et al., 2011). Le gène *ermC* est généralement localisé sur de petits plasmides de taille variable entre 2,3 et 4,4 kb (Schwarz et al., 2014).

Ces plasmides ont été identifiés chez *S. aureus* (y compris les SARM) isolés de l'homme et diverses espèces animales (Lyon et Skurray, 1987 ; Monecke et al., 2011 ; Schwarz et al., 2011).

Le gène *msrA* code pour une protéine de transport ABC (488-aa), qui confère une résistance combinée seulement aux macrolides et streptogramine B (Ross et al., 1990). Le gène *msrA* a été détecté chez *S. aureus* isolé de volailles (Nawaz et al., 2000). Le gène *msrA* a été également détecté chez des SARMs associés aux infections communautaires chez l'homme (Kennedy et al., 2010).

Le gène *mphC* code pour une phosphotransférase de 299 acides aminés, qui ne confère que de résistance aux macrolides (Schnellmann et al., 2006). Si, le gène *mphC* est lié au gène *msrA*, il lui confère des niveaux plus élevés de résistance aux macrolides (Lüthje et Schwarz, 2006). Le gène *mphC* a été identifié chez des souches *S. aureus* d'origine humaine (Schmitz et al., 2002).

8. Résistance aux aminoglycosides

Les aminoglycosides sont généralement des agents bactéricides dont l'activité est limitée aux bactéries aérobies et mycoplasmes (Finch et al., 2003). Ces antibiotiques vont agir sur les ribosomes des bactéries, plus particulièrement, ils se fixent de façon irréversible à la sous unité 30S du ribosome. Une fois fixés aux ribosomes, ils gênent la traduction de l'ARN messager (ARNm) et provoquent une lecture incorrecte du code génétique de l'ARN de transfert (ARNt) menant à une synthèse de protéines anormales (Jana et Deb, 2006). Cette famille comprend plusieurs antibiotiques comme la streptomycine, la néomycine, la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine et la kanamycine.

La résistance aux aminoglycosides résulte d'une réduction intracellulaire de la concentration de l'antibiotique par une pompe à efflux, d'une altération de la molécule cible ou d'une inactivation de l'antibiotique par une activité enzymatique (Jana et Deb, 2006).

Le gène *aacA-aphD* (également connu sous le nom : *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) inactive certains aminoglycosides par activité enzymatique, ce gène code pour une enzyme bifonctionnelle de 479 acides aminés qui réduisent l'activité de l'acétyltransférase et de la phosphotransférase et confèrent une résistance à la gentamicine, la kanamycine, la tobramycine et, une fois surexprimés, confèrent une résistance aussi à l'amikacine (Rouch

et *al.*, 1987). Ce gène est porté sur le transposon Tn4001 (Byrne et *al.*, 1989). Le gène *aacA-aphD* est très répandu chez les staphylocoques d'origine animale, y compris *S. aureus* (principalement SARM) isolés des bovins (Feßler et *al.*, 2010), du cheval (Walther et *al.*, 2009), et de poulets et dindes (Monecke et *al.*, 2012).

Le gène *aadD* (également connu sous le nom: *ant (4')-Ia*) code pour une adényltransférase 256-aa, qui confère une résistance à la kanamycine, à la néomycine et à la tobramycine. Il a été initialement identifié sur le plasmide pUB110 chez des *S. aureus* d'origine humaine (McKenzie et *al.*, 1987).

9. Résistance aux glycopeptides

La vancomycine, la teicoplanine et l'avoparcine sont des antibiotiques appartenant à la famille des glycopeptides, ces antibiotiques sont actifs contre les bactéries à Gram positif. Ils inhibent la synthèse du peptidoglycane de la paroi cellulaire en se liant avec le D-alanyl-D-alanine terminal du dipeptide muramyl (Prescott et *al.*, 2000). Pendant longtemps, les glycopeptides ont été les antibiotiques de recours lors d'infection à *S. aureus* résistants aux antibiotiques, particulièrement les SARMs (Lina et Cattoir, 2014).

La résistance à la vancomycine est rarement rencontrée chez *S. aureus*. La résistance des staphylocoques à la vancomycine a été découverte pour la première fois en 1997 au Japon (Hiramatsu et *al.*, 1998), plus tard des résistances à la vancomycine et aux autres glycopeptides ont été détectés dans différentes régions de monde (Kralovic et *al.*, 2002). Le premier cas clinique des souches de *S. aureus* hautement résistantes à la vancomycine (SARV) a été détecté en 2002 chez un patient humain (Weigel et *al.*, 2003). Malgré que la fréquence des souches de SARV restent très rares (Howden et *al.*, 2010), des souches résistantes à la vancomycine (SARV) ont été isolées aux Etats-Unis, en Inde et en Iran, ces souches constituent une menace certaine (Lindsay, 2010). En Algérie, Rebiahi et *al.* (2011) ont rapporté un taux de résistance à la vancomycine de 1,8% chez les SARMs liés aux infections hospitalières (Rebiahi et *al.*, 2011).

La résistance à la vancomycine est associée principalement au gène *vanA* situé sur un transposon non conjugatif du type Tn1545 localisé sur un plasmide. Cette résistance étant le résultat d'un changement du D-alanine terminal en D-lactate réduisant l'affinité pour les glycopeptides en prévenant la liaison de l'antibiotique (Finch et *al.*, 2003). D'autres gènes de résistance ont également été détectés, dont *vanB* et *vanC* qui produisent une altération

de la membrane en transformant un D-alanine terminal en D-lactate. Le gène *vanC* confère un faible niveau de résistance. Ces gènes semblent se répandre chez les souches SARM d'origine humaine (Gonzalez-Zorn et Courvalin, 2003).

10. Résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques à coagulase négative (SCN)

Le pouvoir pathogène des SCN est actuellement prouvé, des études ont signalé que des souches de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. saprophyticus* causent des infections nosocomiales chez l'homme (Mazzariol et al., 2012) et d'autres souches comme *S. chromogenes*, *S. simulans* et *S. xylosus* sont responsables d'infections chez les animaux (Unal et Cinar, 2012).

En parallèle, la sensibilité et la résistance des SCN aux antibiotiques sont souvent comparables, sans être totalement superposables, à celles décrites chez *S. aureus*. En particulier, les mécanismes de résistance sont plus variés et pour certaines espèces, les fréquences de résistance aux antibiotiques sont élevées. C'est le cas pour *S. epidermidis* et *S. haemolyticus* plus souvent retrouvés à l'origine d'infections nosocomiales (Leclercq et al., 1990). Il est également rapporté que les SCN constituent un réservoir important de gènes de résistance aux divers antibiotiques (Podkowik et al., 2012).

Naturellement sensibles aux bêta-lactamines, les SCN peuvent acquérir vis-à-vis de ces antibiotiques des résistances analogues à celles décrites chez *S. aureus*. La résistance aux pénicillines repose sur l'inactivation enzymatique par des pénicillinases. Elle se rencontre chez 60 à 80% des souches SCN, toutes espèces confondues, mais semble cependant moins fréquente chez *S. saprophyticus* (Leclercq et al., 1990). Le gène *blaZ* a été identifié comme la cause de la résistance à la pénicilline chez les SCN (Devriese et al., 2002).

Le mécanisme de résistance des SCN à la méthicilline est lié à la présence du gène *mecA*. Le gène *mecA* est porté sur un élément génétique mobile *SCCmec*. Un transfert horizontal de cet élément pourrait être un facteur important dans la diffusion des SARMs (Bloemendaal et al., 2010).

Il a été déterminé que deux mécanismes jouent un rôle dans la résistance aux tétracyclines chez les SCN, soit par l'élimination des tétracyclines intracellulaires par un système d'efflux actif codé par les deux gènes *tetK* et *tetL*, soit par la protection du ribosome par modification de la cible codé par les gènes *tetM* et *tetO*. Ces deux mécanismes existent

chez les souches SCN mais avec des proportions variables selon l'espèce considérée (Trzcinski et *al.*, 2000; Fluit et *al.*, 2001). La plupart des espèces de staphylocoques ont aussi tendance à porter le gène *tetK* à l'exception de *S. intermedius*, qui préférentiellement porte le gène *tetM* (Schwarz et *al.*, 1998).

La résistance aux macrolides chez les SCN peut être due à un mécanisme d'efflux actif de l'antibiotique, ce mécanisme est codé par les gènes *msrA* et *msrB* (conférant une résistance aux macrolides et aux streptogramines de type B seulement) ou peut être le résultat d'une modification de la cible ribosomale codée par les gènes *erm* (*ermA*, *ermB* et *ermC*) conférant une résistance combinée aux macrolides, lincosamides, et streptogramines de type B (Schmitz et *al.*, 1999; Maravic, 2004).

Partie pratique

Chapitre IV

Matériels & Méthodes

1. Contexte méthodologique

Les staphylocoques occupent une importance majeure dans l'augmentation du nombre de toxi-infections alimentaires et dans beaucoup de pathologies en milieu hospitalier; sans oublier sa position importante dans l'acquisition de la résistance aux antibiotiques, parfois même à celles des nouvelles familles (Kennedy *et al.*, 2008 ; Hennekinne *et al.*, 2010).

Nous pensons que le statut des staphylocoques en Algérie nécessite une attention particulière de la part des responsables de la santé humaine et animale. En effet, non seulement peu de travaux ont été réalisés sur le taux de contamination des denrées alimentaires présentes sur le marché; et sub-séquentiellement, les données statistiques en matière de toxi-infections à l'échelle nationale ne sont pas fiables. D'un autre côté, la réglementation actuelle limite la recherche aux souches staphylococciques à coagulase positive (SCP) uniquement, or plusieurs études ont montré que les staphylocoques à coagulase négative (SCN) pourraient jouer également un rôle important (da Cunha *et al.*, 2007 ; Dubois *et al.*, 2010).

La possibilité de transmission de gènes de résistance entre souches de staphylocoques au sein de la même population humaine ou animale (Argudin *et al.*, 2010; Grumann *et al.*, 2014), ou entre l'homme et les animaux via la manipulation des denrées alimentaires d'origine animale suscite beaucoup de questions, et inquiète les professionnels de la santé.

Notre travail est une pièce complémentaire dans la connaissance de ce pathogène important en Algérie. Nous essayerons dans ce travail d'estimer le taux de contamination par les staphylocoques de différentes denrées alimentaires et de certains échantillons prélevés en milieu hospitalier. Nous étudierons plus tard le degré de sensibilité des isolats à différentes classes d'antibiotiques. Dans une autre partie on va essayer d'explorer les supports génétiques des entérotoxines et la résistance aux antibiotiques chez des isolats d'origine alimentaire et clinique.

Pour bien cerner cette problématique, et mener à bien notre étude, nous avons fixé des objectifs principaux et d'autres complémentaires réparties comme suit :

- ✓ Estimer le taux de contamination de quelques matrices alimentaires par les SCP et *S. aureus*.
- ✓ Isoler et identifier les des staphylocoques à partir des divers prélèvements biologiques en tenant compte de leur origine hospitalière ou communautaire.
- ✓ Etude de la sensibilité des isolats de staphylocoques vis-à-vis de certaines classes d'antibiotiques.
- ✓ Déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI vis-à-vis de l'oxacilline et la vancomycine.
- ✓ Recherche par la technique PCR de la présence des gènes codant les entérotoxines staphylococciques (isolats alimentaires et cliniques).
- ✓ Et enfin rechercher par la méthode PCR les gènes codant la résistance à quelques antibiotiques.

2. Méthodologie de travail

Afin d'atteindre les objectifs tracés, nous avons établi un schéma méthodologique représenté par la figure IV.1. Une attention particulière est portée aux catégories des échantillons examinés et à la région où ont été prélevés ces échantillons.

Notre travail s'est déroulé dans les laboratoires suivants :

- Le laboratoire de l'établissement public de santé et proximité (EPSP) appartenant à la direction de santé de la wilaya de Médéa pour la recherche et le dénombrement des staphylocoques à partir des échantillons alimentaires.
- Le laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital Mohamed Boudiaf de Médéa, pour l'isolement des isolats d'origine clinique.
- Le centre de recherche de biotechnologie (*CRBt*), nouvelle ville Ali Mendjeli, de la Wilaya de Constantine pour la lyophilisation des isolats.
- Et enfin le laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'université Mustafa Kemal à Hatay (Turquie) pour la recherche des gènes des entérotoxines par technique PCR.

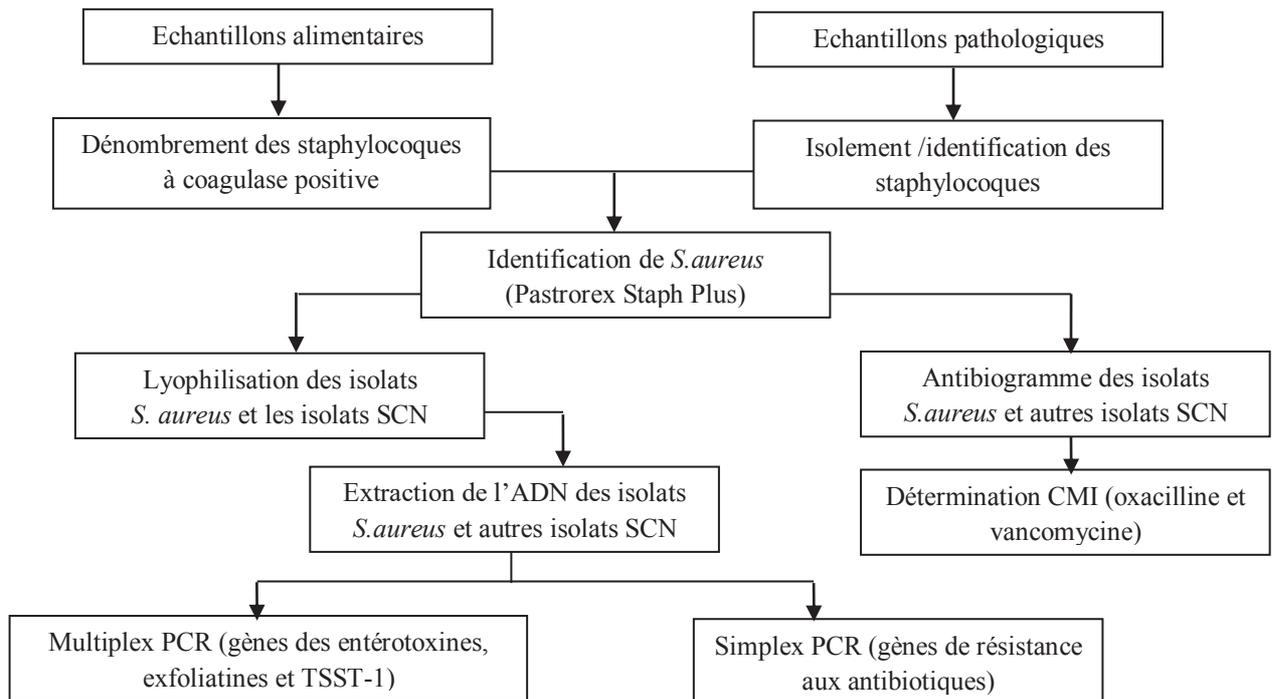


Figure IV.1 : Diagramme de la méthodologie utilisée

3. Matériels utilisés

3.1. Echantillonnage

3.1.1. Echantillons alimentaires

Les tableaux IV.1 présentent la répartition des 112 échantillons alimentaires soumis à analyse. Les catégories de matrices alimentaires ont été choisies selon les considérations suivantes :

- La wilaya de Médéa est connue par la vente de lait cru et les produits à base de lait cru surtout le beurre et le lait caillé préparés traditionnellement.
- Les échantillons incluent la viande hachée, les plats cuisinés de type fast-food ainsi que les produits de pâtisserie : ces aliments subissent généralement des manipulations lors de leur préparation et distribution.
- Les matrices alimentaires sont majoritairement d'origine animale : pour explorer la possibilité de l'origine animale des gènes des entérotoxines et ceux de l'antibiorésistance.
- Les textes législatifs relatifs aux denrées alimentaires (JORADP, 1998) exigent la recherche et le dénombrement des staphylocoques dans ces matrices alimentaires choisis.

Les échantillons analysés ont été prélevés à partir de différents commerces de détail dans les deux wilayas de Médéa et Ain-Defla. Selon les normes des textes législatifs relatifs aux denrées alimentaires (JORADP, 1998), la quantité des échantillons alimentaires prélevés en vue d'une analyse microbiologique doit dépasser 100 g pour les produits solides et 100ml pour les produits liquides, cette quantité pouvant être fournie par une ou plusieurs pièces. Une fois prélevés, les échantillons sont placés dans une glacière à une température voisine de +4°C, puis acheminés au laboratoire pour être analysés le jour même.

Tableau IV.1 : Répartition des échantillons selon leur nature

| Type de prélèvement | | Nombre de prélèvement | Pourcentage | |
|----------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------|--------|
| Viande et dérivés | Viande bovine fraîche(VR) | 10 | 8,93% | 58.03% |
| | Viande hachée(VH) | 25 | 22,32 % | |
| | Merguez (M) | 5 | 4,46% | |
| | Poulet (VP) | 15 | 13,40 % | |
| | Dinde (VD) | 10 | 8,93 % | |
| Lait cru (L) | | 23 | 20,53 % | |
| Produit de pâtisserie (PP) | | 14 | 12,50 % | |
| Plats cuisinés(PC) | | 10 | 8,93 % | |
| Total | | 112 | 100 % | |

3.1.2. Echantillons biologiques

Les staphylocoques responsables des infections hospitalières ont été isolées à partir des prélèvements issus des patients hospitalisés à l'hôpital Mohammed Boudiaf de Médéa. D'autres souches d'origine des infections communautaires ont été isolées à partir de prélèvements effectués dans six laboratoires privés de la wilaya de Ain Defla et de Médéa.

Les différents échantillons biologiques analysés sont : le pus, le sperme, l'urine, les pertes vaginales, les prélèvements de gorge, les prélèvements urétraux, les liquides articulaires, les prélèvements nasaux, les cathéters, les prélèvements de fractures fistuleuses et les dispositifs médicaux.

3.1.2.1. Réalisation des prélèvements

Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des orifices naturelles de l'homme, où les fosses nasales représentent l'habitat préférentiel. Lors de la réalisation des prélèvements, les mains ou tout contact avec la peau pourrait contaminer l'échantillon. Pour cela, des précautions particulières ont été prises pour éviter toute contamination des échantillons prélevés, et cela selon les recommandations de la littérature (Denis et *al.*,

2011). Dans le cas où le prélèvement a été réalisé hors du laboratoire, le transport au laboratoire devait être rapide, et le cas échéant, une conservation au maximum de 24 heures à +4°C était admise.

Les staphylocoques peuvent résister en milieu externe, où ils peuvent coloniser des surfaces inertes et forment des niches de biofilms, cela contribue à la transmission des souches entre malades. C'est pour cela que nous avons recherché les staphylocoques à partir de divers dispositifs médicaux comme les sondes, masques d'aérosols, drains et cathéters. Les petits dispositifs ont été placés dans des sachets stériles de prélèvements et acheminés au laboratoire, d'autres de grand volume (poignets des portes, filtres des climatiseurs) ont subi un écouvillonnage avec des écouvillons stériles humidifiés dans de l'eau physiologique stérile.

3.2. Matériels non biologiques

Nous avons utilisé différentes catégories de matériel de laboratoire (équipements, petit matériel et instrument), des milieux de culture et réactifs. L'annexe 1 regroupe la liste du matériel, ainsi que les formules et le mode de préparation des milieux de culture utilisés.

4. Recherche et dénombrement des staphylocoques à coagulase positive dans les matrices alimentaires

Le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive a été effectué selon la norme ISO 6888-1:1999/A1:2003 relative au dénombrement des staphylocoques (*S.aureus* et autre espèces) ; Partie 1: Technique utilisant le milieu gélose de Baird Parker.

4.1. Prise d'essai

❖ Produits liquides (Ex : lait)

- Le liquide est agité soigneusement afin d'assurer une répartition uniforme des micro-organismes (solution mère).
- Un volume de 10 ml de l'échantillon est prélevé et mélangé à 90 ml de diluant (eau physiologique)
- Le mélange est agité pendant 1 à 2 minutes, la dilution obtenue est l'ordre de 10^{-1} .
- Les dilutions décimales sont faites de 10^{-1} à 10^{-4}

❖ Les produits solides : (viandes, produits de pâtisseries, plats cuisinés)

- 10 g de l'échantillon sont prélevés dans un sachet Stomacher, puis 90 ml de diluant (Eau physiologique) sont ajoutés dans le sachet contenant l'échantillon.
- Le mélange est homogénéisé pendant deux à cinq minutes à l'aide d'un Stomacher (Seward, UK) afin d'obtenir une suspension homogène de dilution de 10^{-1} .
- Les dilutions décimales sont faites de 10^{-1} à 10^{-4} .

4.2. Ensemencement

Un volume de 0,1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou 0,1 ml de suspension mère (dilution 10^{-1}) pour les autres produits, est transféré à l'aide d'une pipette stérile à la surface d'un milieu gélosé Baird-Parker (Oxoid, UK). L'opération est répétée avec la dilution 10^{-2} et les dilutions suivantes si nécessaire.

L'inoculum est étalé soigneusement le plus rapidement possible à la surface du milieu gélosé en évitant de toucher les bords de la boîte avec l'étaleur. Les boîtes sont séchées, avec leur couvercle en place, pendant environ 15 min à la température ambiante.

Le milieu Baird-Parker est un milieu sélectif pour l'énumération des staphylocoques dans les aliments (Baird-Parker, 1962). Le milieu est additionné d'une émulsion de jaune d'œuf (Oxoid, UK) et la sélectivité du milieu est atteinte avec du tellurite de potassium et du chlorure de lithium. L'addition de sulfamezathine (Baird-Parker, 1969) n'est conseillée que si les espèces *Proteus* sont suspectées dans l'échantillon de test (suspicion de contamination fécale). Le pyruvate de sodium est un composant essentiel pour récupérer les cellules endommagées de staphylocoques et leur croissance subséquente (Baird-Parker et Davenport, 1965).

4.3. Incubation

Les boîtes préparées sont retournées, puis incubées pendant $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, puis elles sont réincubées pendant $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ supplémentaires dans l'étuve à 35 °C ou à 37 °C .

4.4. Sélection des boîtes et interprétation

Après $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ d'incubation, les positions des colonies caractéristiques éventuellement présentes sont marquées sur le fond des boîtes.

Les boîtes sont incubées à 35 °C ou à 37 °C durant 24 h ± 2 h supplémentaires, et les nouvelles colonies caractéristiques et les non caractéristiques sont éventuellement marquées. Le dénombrement ne retient que les boîtes renfermant au maximum 300 colonies dont 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques au niveau de deux dilutions successives avec exigence qu'une des deux boîtes renferme au moins 15 colonies. S'il y a moins de 15 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques sur les boîtesensemencées avec un produit liquide non dilué ou avec la dilution la plus faible pour les autres produits, il est possible de faire une estimation.

❖ Colonies caractéristiques

Les colonies noires ou grises, brillantes et convexes (1 mm à 1,5 mm de diamètre après 24 h d'incubation et 1,5 mm à 2,5 mm de diamètre après 48 h d'incubation) et entourées d'une auréole d'éclaircissement sont considérées comme caractéristiques (figure IV.3). Après au moins 24 h d'incubation, un anneau opalescent peut apparaître dans cette auréole claire immédiatement au contact des colonies (Baird Parker, 2003) (photo en annexe 6).

❖ Les colonies non caractéristiques

Les colonies non caractéristiques peuvent présenter l'une des morphologies suivantes:

- a) Colonies noires et brillantes avec ou sans bord blanc étroit; la zone claire est absente ou à peine visible et l'anneau opalescent est absent ou à peine visible;
- b) Colonies grises dépourvues de zone claire. Les colonies non caractéristiques sont surtout formées par des staphylocoques à coagulase négative qui contaminent les produits.

4.5. Confirmation du genre (recherche de la catalase et de la coagulase)

• Test de la catalase

Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques, les staphylocoques sont catalase positive. La catalase est une oxydoréductase appartenant au groupe des cytochromes. Elle joue un rôle majeur dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) généré par respiration aérobie.

A partir d'une culture pure, une petite quantité de culture bactérienne est prélevée (la moitié d'une colonie prélevée à partir de la gélose Baird Parker); puis placée sur une lame, on fait réagir la colonie dans 1 goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Elle peut être

également réalisée en tube contenant 0,5 ml de H₂O₂. Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène), la réaction se fait selon l'équation :



- **Staphylocoagulase (Coagulase libre) :**

La coagulase libre est présente chez *S. aureus*, mais aussi peut être produite par *S. intermedius* ou *S. hyicus*. Ce test consiste à mettre en évidence la coagulase libérée dans le milieu extérieur.

La technique consiste à ensemencer une moitié de colonie prélevée sur la surface de la gélose Baird Parker dans un tube ou dans un flacon de bouillon cœur-cerveille et incubé à 35°C ou 37°C pendant 24 h ± 2 h. Un volume 0,1 ml de chaque culture est ajouté à 0,3 ml de plasma de lapin dans des tubes stériles à hémolyse et sont incubés à 35°C ou à 37°C pendant 24h, une lecture est possible à 6h pour les souches fortement coagulase positive.

Après incubation, la coagulation du plasma est examinée ; en inclinant le tube on peut constater l'aspect gélatineux (Coagulase +) ou liquide (Coagulase -). Si le test est négatif, réexaminer après 24 h d'incubation, ou après les temps d'incubation préconisés par le fabricant. On considère que la réaction à la coagulase est positive quand le coagulum occupe plus de la moitié du volume initialement occupé par le liquide (photo en annexe 6).

4.6. Confirmation de *Staphylococcus aureus* par le test latex (Pastorex Staph Plus)

L'identification de l'espèce *S. aureus* parmi les staphylocoques à coagulase positive a été réalisée par le test d'agglutination PASTROREX STAPH PLUS (Bio-Rad®, France, 2016). Le réactif Pastorex plus est un test rapide d'agglutination sur lame qui permet la recherche simultanée :

- D'un facteur d'affinité pour le fibrinogène que l'on désigne sous le nom de coagulase liée ou « clumping factor »
- De la protéine A qui possède une affinité pour le fragment cristallisable (FC) des immunoglobulines gamma (IGG)
- Des polysaccharides capsulaires de *Staphylococcus aureus*.

Le mode opératoire est extrait du manuel du fabricant et décrit en Annexe 4.

4.7. Expression des résultats

4.7.1. Cas général

a. Calcul du nombre a de staphylocoques à coagulase positive identifiés pour chaque boîte retenue

Le Calcul du nombre « a » de staphylocoques à coagulase positive est identifié pour chaque boîte retenue. Le nombre « a » est calculé selon l'équation suivante :

$$a = \frac{b^c}{A^c} \times C^c + \frac{b^{nc}}{A^{nc}} \times C^{nc}$$

Où :

A^c : est le nombre de colonies caractéristiques repiquées.

A^{nc} : est le nombre de colonies non caractéristiques repiquées.

b^c : est le nombre de colonies caractéristiques de staphylocoques présumés qui sont à coagulase positive.

b^{nc} : est le nombre de colonies non caractéristiques de staphylocoques présumés qui sont à coagulase positive.

C^c : est le nombre total de colonies caractéristiques de staphylocoques dans la boîte.

C^{nc} : est le nombre total de colonies non caractéristiques de staphylocoques dans la boîte.

Il faut arrondir le résultat « a » un nombre entier pour cela:

- Si le dernier chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédent n'est pas modifié.
- Si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédent est augmenté d'une unité.

b. Calcul du nombre N de staphylocoques à coagulase positive identifiés présents dans la prise d'essai

Pour les boîtes contenant au maximum 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques pour deux dilutions consécutives, le nombre de staphylocoques à coagulase positive est calculé pour chaque boîte. Le nombre N de staphylocoques à coagulase positive identifiés présents dans l'échantillon pour prise essai, est calculé en tant que moyenne pondérée à partir des deux dilutions successives selon l'équation suivante :

$$N = \sum \frac{a}{V \times 1.1 \times F}$$

Où :

$\sum a$: est la somme des colonies de staphylocoques à coagulase positive identifiées sur les deux boîtes retenues.

F : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue (la suspension mère est une dilution)

V : est le volume étalé sur chaque boîte.

Il faut arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs. Pour cela :

- Si le dernier chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédent n'est pas modifié.
- Si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédent est augmenté d'une unité.

4.7.2. Estimation dans le cas où la culture présente de petits nombres de colonies

Lors de la lecture et l'interprétation des résultats, si la boîte correspondante à la suspension mère contient moins de 15 colonies et si l'ensemencement a été effectué avec 0,1 ml d'échantillon, le résultat est alors exprimé sous la forme suivante:

- $Ne = a \times 10$ en ce qui concerne les produits liquides.
- $Ne = a/d$ en ce qui concerne les autres produits.

Ou :

Ne : représente le nombre de staphylocoques à coagulase positive identifiés.

d : représente le taux de dilution correspondant à la suspension mère.

Si la boîte correspondante à la suspension mère ne contient aucune colonie de staphylocoques à coagulase positive et si l'ensemencement a été effectué avec 0,1 ml d'échantillon, le résultat est alors exprimé sous la forme suivante:

- Moins de 10 staphylocoques à coagulase positive par ml en ce qui concerne les produits liquides.
- Moins de 10/d staphylocoques à coagulase positive par gramme (g) en ce qui concerne les produits solides

4.8. Méthode de répartition des échantillons selon le taux de contamination

En microbiologie alimentaire, l'analyse d'un échantillon donne des résultats non satisfaisants s'il démontre la présence des microorganismes dangereux ou s'il contient des germes en nombre supérieur à une limite au-delà de laquelle l'aliment devient potentiellement dangereux.

L'interprétation des résultats d'analyses est basée sur des critères microbiologiques fixés dans l'arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires (JORADP, 1998).

En fonction de la nature de la matrice alimentaire d'une part, et le microorganisme recherché d'autre part, il est possible d'utiliser un plan d'échantillonnage de deux ou trois classes. Dans cette étude, nous avons utilisé le plan à trois classes dans lequel les échantillons alimentaires analysés ont été classés dans l'une des catégories : « S » (satisfaisante), « NS » (non satisfaisante) ou « A » (acceptable).

5. Analyse des échantillons d'origine clinique

Le choix du protocole analytique pour les échantillons cliniques dépend de la nature de l'échantillon ainsi que de la disponibilité des milieux et réactifs. Les analyses microbiologiques des différents échantillons pathologiques ont été effectuées selon les méthodes proposées par Denis et *al.* (2011) et Karmakar et *al.* (2016).

Une fois arrivés au niveau du laboratoire, les échantillons font l'objet d'un examen macroscopique afin de vérifier quelques caractéristiques visuelles (trouble, couleur ou odeur), puis une étude cytologique est envisagée pour vérifier le statut immunitaire des patients et la présence de diverses cellules inflammatoires indicatrices de l'infection (l'étude cytologique concerne généralement les urines, le sperme, les pertes vaginales et les liquides de ponction).

5.1. Enrichissement et isolement

Sachant qu'une infection peut être causée par une ou plusieurs bactéries en association, divers milieux de culture ont été utilisés pour rechercher des germes autres que les staphylocoques, cependant au cours de cette étude, nous nous intéresserons seulement aux staphylocoques isolés.

Pour l'isolement des staphylocoques, l'utilisation de milieux adaptés aux bactéries à Gram positif telle qu'une gélose au sang cuit (gélose chocolat) ou gélose au sang frais rendait impératif, l'ensemencement d'un milieu sélectif pour les coques à Gram positif tel que le milieu hypersalé au mannitol (Chapman).

Les milieux chromogènes (Chrom-agar-orientation) permettent une discrimination plus fine des colonies et donc une meilleure discrimination des colonies pour les échantillons polymicrobiens. L'ensemencement doit répondre au double but de dénombrer les bactéries et d'isoler la ou les bactéries en cause en obtenant des colonies bien distinctes les unes des autres.

A l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette Pasteur, une portion (pus) ou une quantité (liquide) de prélèvement a été ensemencée par épuisement sur gélose en boîte de Pétri, de façon à obtenir des colonies bien isolées.

La réalisation de la coloration de Gram à partir de l'échantillon biologique est possible pour orienter le diagnostic, cela concerne beaucoup plus les échantillons des urines, le liquide céphalorachidien (LCR), liquides de ponctions, les pertes vaginales.

Pour le matériel de soin et les dispositifs médicaux, l'examen microscopique est inutile. Le petit matériel (comme les masques pour bébé, cathéter et sonde urinaire) sont émergés dans un bouillon BHIB, le bouillon est mis à l'incubation durant 24h à 37°C, à partir de cette culture d'enrichissement, un ensemencement est effectué sur des milieux tels que la gélose Chapman ou la gélose nutritive.

Si un écouvillonnage est effectué sur le grand matériel, une culture d'enrichissement dans un bouillon d'enrichissement BHIB est réalisée puis incubé durant 24h à 37°C. A partir du tube contenant le bouillon d'enrichissement (BHIB), un petit volume est ensemencé sur les mêmes milieux d'isolement cités précédemment. L'incubation des boîtes est faite à 37°C pendant 18 à 24 heures (Marchal et Bourdon, 1973).

5.2. Caractéristiques macroscopiques des colonies

a. Milieu de Chapman

Sur le milieu de Chapman, les colonies *S. aureus* sont souvent jaunes entourées d'une zone jaune, mannitol+. *Staphylococcus aureus* fermentent le mannitol et font virer le milieu du rouge au jaune orangé (Kloos et Bannerman, 1995). Par contre, les colonies entourées

d'une zone rouge ou pourpre, mannitol- sont des *S. epidermidis* ou *S. hominis* (Delarras, 2007) (Figure IV.2).

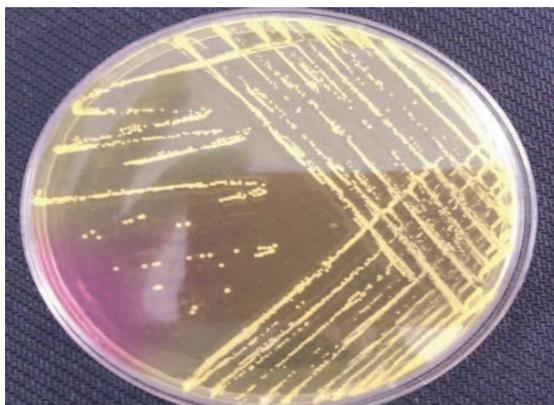


Figure IV.2: Aspect des colonies de *S. aureus* sur milieu de Chapman (Photo personnelle).

b. Gélose Nutritive

Sur gélose nutritive, les colonies sont lisses, les isolats de *S. aureus* produisant en général un pigment jaune (Kloos et Bannerman, 1995) (Figure IV.3).

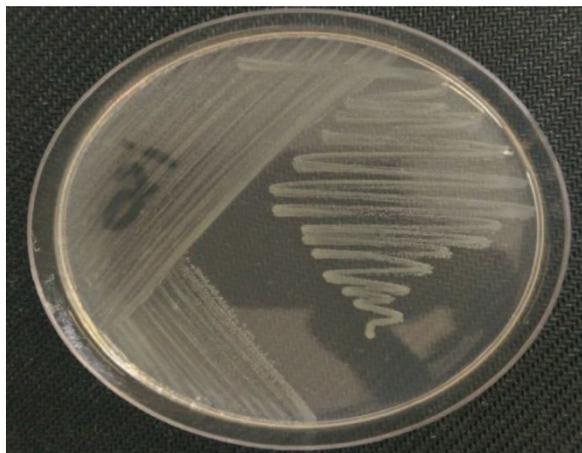


Figure IV.3 : Aspect des colonies de *S. aureus* sur gélose nutritive (photo personnelle).

c. Gélose au sang cuit

Sur gélose au sang cuit, les colonies sont circulaires, volumineuses, opaques éventuellement pigmentées et de couleur jaune doré et légèrement bombées ou aplaties; elles présentent une surface luisante et humide. Les colonies produites sur gélose au sang cuit ont de plus grands diamètres que ceux des colonies produites sur gélose nutritive (Kloos et Bannerman, 1995).

5.3. Identification

L'identification comporte une série d'étapes, se succédant le plus souvent dans un ordre déterminé; les isolats ont été identifiées par des techniques microbiologiques standards : coloration de Gram, test de la catalase et test de la coagulase, et une confirmation de *Staphylococcus aureus* par le test latex (Pastorex Staph Plus). Les résultats obtenus au cours de chaque étape permettent l'orientation des démarches ultérieures.

❖ Coloration de Gram

La coloration de Gram est effectuée à partir des colonies cultivées sur gélose au sang cuit présentant l'aspect caractéristique du Staphylocoque. Aussi, elle peut être réalisée à partir du milieu de Chapman ou gélose nutritive après purification, pour confirmer la présence de cocci Gram positif en diplocoques et en grappes de raisin. Les frottis sont observés au microscope optique avec l'objectif à immersion (100X) (Figure IV.4).

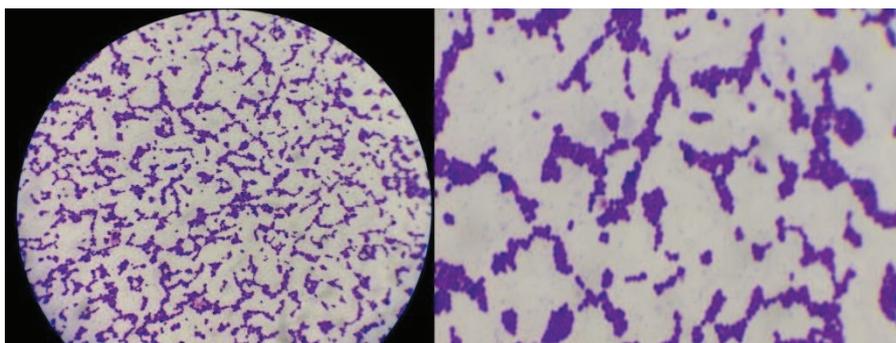


Figure IV.4 : Observation microscopique des Staphylocoques après coloration de Gram
(Photo personnelle).

5.4. Purification des isolats

Après la période d'incubation, les colonies suspectes de staphylocoques selon leurs caractéristiques macroscopiques sont réisolées sur les milieux adéquats (GN ou milieu Chapman). A l'aide d'une pipette Pasteur, les colonies sont ensemencées en stries de telle manière à obtenir des colonies bien isolées et pures.

Pour des utilisations ultérieures, les isolats et purifiées vont subir une conservation de courte durée. Cette conservation a été réalisée dans des tubes de gélose de conservation par pique centrale. Les tubes de conservation sont incubés pendant 24 heures à 37°C puis conservés au réfrigérateur à +4°C.

Selon notre protocole de travail, la conservation des isolats selon cette technique est effectuée périodiquement selon la fréquence d'obtention des isolats. Une fois, le nombre total d'échantillons analysés atteint, toutes les isolats conservées ont été repiquées de nouveau sur gélose nutritive pour réaliser l'étude de la sensibilité aux antibiotiques d'une part et envoyer des copies des isolats au centre de recherche de biotechnologie (CRBt) de Constantine en vue d'une conservation de longue durée par lyophilisation.

6. Etude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des isolats a été réalisée par la méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé Muller-Hinton selon les normes et les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie (CA-SFM, 2010), et celles du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) illustrées dans la manuel de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), version 2011 (Anonyme 1).

Les antibiotiques utilisés ainsi que leurs charges sont: Penicilline (P-10 U), Oxacilline (OX-1µg), Céfoxitine (FOX-30 µg), Kanamycine (K-30 µg), Gentamicine (GM-10µg), Tétracycline (TE-30µg), Erythromycine (E-15µg), Clindamycine (CL-2 µg), Vancomycine (VA-30 µg), Amoxicilline + Acide Clavunique (AMC-10/10 µg), Rifampicine (RIF-30 µg), Triméthoprime/sulfaméthoxazole (SXT-1.25/23.75µg) (Bio-rad, France; Oxoid, UK).

La souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisée pour le contrôle positif, la souche a été obtenue du laboratoire vétérinaire régional de Draa Ben Khada.

6.1. Technique de l'antibiogramme

Un inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement (gélose nutritive, Chapman). Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine, déchargées dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est bien homogénéisée et ajustée jusqu'à atteindre une opacité équivalente à 0.5 McF à l'aide d'un densitomètre McFarland.

Le milieu Mueller-Hinton (MH) (Oxoid, UK) coulé en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4 mm est utilisé, l'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum (Annexe 01).

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum, puis frotté sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'une boîte de Pétri est ensemencée (Anonyme 1).

6.2. Application des disques d'antibiotiques

Les disques d'antibiotiques (BioRad, France ; Oxoid, UK) sont déposés (maximum 6 pour une boîte de 90mm) à la surface de la gélose en les appliquant délicatement par une pince stérile ou à l'aide d'un distributeur. Ils sont espacés de 24 mm, centre à centre. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé. Les boîtes sont ensuite incubées immédiatement pendant 18 à 24 heures à 37°C.

6.3. Méthode de lecture

Les résultats sont comparés aux valeurs critiques figurant dans le tableau de lecture, puis la bactérie est classée dans l'une des catégories: sensible, résistant ou intermédiaire (Tableau: valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus* spp.)(Annexe 02) (Anonyme 1).

7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice par bandelettes E-Test

Selon les recommandations illustrées dans le manuel de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), version 2011 (Anonyme 1), pour *S. aureus*, le disque de céfoxitine est comparable à celui de l'oxacilline pour détecter la résistance à l'oxacilline par production de PLP2a (gène *mecA*) ; cependant, le disque de céfoxitine est plus facile à lire. Le tableau suivant a été utilisé pour l'interprétation des résultats de la résistance à l'oxacilline par la méthode de diffusion des disques.

Tableau IV.2 : Recherche de la résistance à l'oxacilline et interprétation des tests (méthode de diffusion des disques)

| | Oxacilline (1µg) | Céfoxitine (30µg) | Interprétation |
|------------------|------------------|-------------------|----------------|
| <i>S. aureus</i> | ≥13mm | ≥22mm | Souche OX R |
| | ≤12mm | ≤21mm | Souche OX S |

Selon les recommandations illustrées dans le manuel de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), pour mieux confirmer cette résistance à l'oxacilline, il faut déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI de l'oxacilline.

La détermination de la CMI a été réalisée par la méthode validée des bandelettes E-Test (Liofilchem, Italy) (Figure IV.10). La détermination du CMI pour les isolats de staphylocoques présentant une résistance à la vancomycine par la méthode de diffusion sur gélose a été aussi effectuée par la méthode E-test (Figure IV.5).

❖ **Mode opératoire :**

Sur des boîtes de gélose Muller-Hinton (Oxoid, UK) ensemencées par l'isolat à tester, appliquer les bandelettes E-test (oxacilline, vancomycine), à l'aide d'une pince stérile, sur la surface de la gélose. Une seule bandelette est utilisée par boîte, une fois appliquée, elle ne doit pas être déplacée. Les boîtes sont laissées couvercle en haut pendant 15 mn au plus sur paillasse, puis elles sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37° C.

La valeur de la CMI correspond à l'intersection des 2 ellipses. Les résultats ont été comparés aux valeurs critiques figurant sur un tableau récapitulatif des valeurs critiques pour les CMI de *S. aureus* (Annexe 3). La bactérie est classée dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistant.

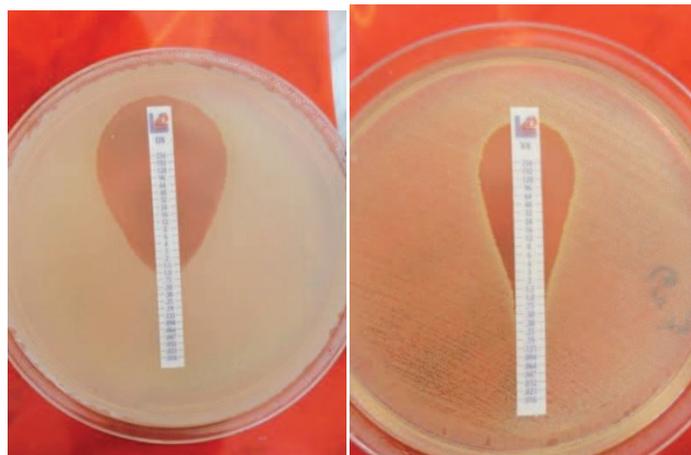


Figure IV.5 : Détermination de la CMI par la technique des Bandelettes E-Test
(Photo personnelle).

8. Conservation des isolats (Lyophilisation)

La conservation des isolats a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie du centre de recherche de biotechnologie (CRBt) de Constantine. La méthode de conservation utilisée est la lyophilisation en lait écrémé.

La lyophilisation (cryodessiccation) est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation, la majeure partie de l'eau contenue dans la solution bactérienne. Grâce à l'abaissement de l'activité de l'eau, cette méthode donne l'avantage de conserver les souches bactériennes à long terme et facilite leur transport à température ambiante en toute sécurité.

Le protocole de lyophilisation des isolats que nous avons utilisé suit les recommandations de Stephen (1995) et Bjerketorp et *al.* (2006), le protocole est décrit en annexe 5.

9. Détection des gènes codants pour les entérotoxines, exfoliatines et la toxine TSST-1 par Multiplex PCR

La méthode utilisée est la PCR Multiplex. La méthode PCR est un test de diagnostic très précis, fiable, peu coûteux et, surtout, très efficace dans la détection des gènes codant les entérotoxines staphylococciques (Mehrotra et *al.*, 2000).

Dans notre étude, deux PCR Multiplex ont été utilisées : SET-A pour l'amplification des gènes codant les entérotoxines staphylococciques classiques (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* et *see*), et SET-B pour l'amplification des gènes codant les exfoliatines A et B (*eta*, *etb*) et le gène *tst* codant la toxine TSST-1. Le gène *femA* a été utilisé dans les deux réactions de PCR comme contrôle interne pour confirmer la présence de l'espèce *Staphylococcus aureus*. Il a été confirmé que le gène *femA* jouait un rôle dans le métabolisme des parois cellulaires et qu'il était présent dans toutes les isolats de l'espèce *S. aureus* pendant la phase de croissance active.

9.1. Extraction et isolement de l'ADN

Tous les isolats conservés par lyophilisation (96 isolats de *Staphylococcus* spp) ont été activés sur bouillon trypticase soja (TSB), incubés pendant 18 à 24 h à 37 °C. Après incubation, un volume de 0,1 ml de la culture sur TSB a été ensemencé sur gélose trypticase soja (TSA), les boîtes ont été incubées durant 18 à 24 h à 37°C. Deux à trois

colonies ont été repiquées sur tube Eppendorf contenant 1 ml de PBS puis centrifugées à 12000 rpm pendant 10 min.

Après élimination du surnageant, les cellules bactériennes contenues dans le culot ont été suspendues dans 350 µl de tampon TE (10 mM Tris chlorure, 1 mM EDTA, pH 8.0) et soumises à l'action de 1000 µg de lysozyme (100mg/ml) et incubées à 37°C pendant 60 min ou jusqu'à ce que la solution devienne visqueuse. Il a été ajouté ensuite 350 µl de tampon TE [10 mM chlorure de tris, 1 mM EDTA (pH 8,0)] avec 1 % SDS et 100 µg de protéinase-K (10mg/ml), puis incubées de nouveau à 60°C pendant 30 min.

Après centrifugation, les acides nucléiques contenus dans les surnageants ont été extraits par la méthode de Sambrook et Russel (2001) (photo en annexe 6). Brièvement, le surnageant a été jeté et un volume de 1 ml de phénol / chloroforme / isoamylalcool (PCI, 25/24/1) a été ajouté au culot, mélanger doucement puis séparer par centrifugation à 13000 rpm pendant 10 min. La phase aqueuse contenant l'ADN a été transférée dans un nouveau tube. Les acides nucléiques ont été précipités en ajoutant 0,6 volume d'isopropanol et recueillis par centrifugation à 8000 rpm pendant 10 min. L'ADN a été lavé deux fois par l'éthanol pur à 100% et à 70%. Finalement, l'ADN a été suspendu dans de l'eau traitée avec le diéthylpyrocarbonate (DEPC) et stocké à -20°C jusqu'aux analyses par PCR.

9.2. Conditions de la PCR

Le choix des amorces et de la procédure utilisée pour la PCR ont été réalisées comme décrit par Mehrotra et *al.*, (2000) avec quelques modifications. Le tableau IV.4 résume les caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour les entérotoxines classiques (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* et *see*), pour les gènes codant les exfoliatines A et B (*eta*, *etb*) et pour la toxine TSST-1(*tst*).

Pour la réalisation de la Multiplex PCR, deux SET ont été préparés SET-A et SET-B (tableau IV.4). Pour le SET-A, le mix de PCR contient: 200 µM de deoxynucleoside triphosphates; 5 µl de 10X tampon de réaction PCR (100 mM Tris-HCl [pH 8.3], 500 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 20 pmol pour chacune des amorces suivantes : *sea*, *seb*, *sec*, *see* et *femA*; 40 pmol pour l'amorce *sed*; 2,5 U de l'enzyme Taq DNA polymerase (Thermo scientific) (photos en annexe 6).

Le mix SET-B contient les mêmes constituants que le SET-A sauf pour la concentration de MgCl₂ (2,0 mM) et les amorces : 50 pmol pour *eta* et 20 pmol pour *etb*, *tst*, et *femA*, tous

ces réactifs ont été ajoutés à 3 μ l de l'ADN extrait. Le volume final a été ajusté à 25 μ l avec de l'eau stérile ultra-pure. Pour le contrôle positif, l'ADN a été obtenu à partir du département de microbiologie, faculté de médecine vétérinaire de l'université Mustafa Kemal (Turquie).

L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un thermocycleur (CFX 96 thermal cycler, Bio-Rad), selon les programmes suivants: La dénaturation initiale à 94°C dure 3 min suivie par 29 cycles d'amplification (dénaturation à 94°C pendant 1,5 min, hybridation 54°C pendant 1,5 min, et l'extension à 72°C pendant 1 min), l'amplification se termine par une extension finale à 72°C pendant 7 min. Après l'achèvement des cycles d'amplification, 10 μ l de produits de PCR ont été colorés puis analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (BioMax). Le gel d'agarose a été déjà préparé et teinté par 5 μ l de RedSafe™ d'acide nucléique (iNtROn Biotechnology, Korea) (photos en annexe 6).

Afin de déterminer la taille des bandes obtenue, 5 μ l de marqueur de taille d'ADN (100 bp) ont été déposés dans le gel d'agarose. Le gel a été immergé dans le tampon TBE (0,09 M Tris-HCl, 0,09 M acide borique, 2 mM EDTA, pH 8,3) pour subir une migration sous l'action d'une tension électrique de 120 Volts pendant 45 min (Model EC 1000 XL Thermo Scientific, Inc.). Les fragments d'ADN obtenus ont été visualisés dans un transilluminateur UV (EC3, UVP Biomaging systems, Inc) et traités par le logiciel Alpha Ease FC Software.

Table IV.3: Caractéristiques des amorces utilisés dans la réaction PCR Multiplex (Mehrotra et *al.*, 2000).

| Gène | Amorce | séquence Oligo-nucléotidique (5'-3') | Localisation dans le gène | Taille (bp) | Multiplex SET-PCR |
|-------------|----------|--------------------------------------|---------------------------|-------------|-------------------|
| <i>sea</i> | GSEAR-1 | GGTTATCAATGTGCGGGTGG | 349–368 | 102 | A |
| | GSEAR-2 | CGGCACTTTTTTCTCTTCGG | 431–450 | | |
| <i>seb</i> | GSEBR-1 | GTATGGTGGTGTAAGTACGAGC | 666–685 | 164 | A |
| | GSEBR-2 | CCAAATAGTGACGAGTTAGG | 810–829 | | |
| <i>sec</i> | GSECR-1 | AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG | 432–455 | 451 | A |
| | GSECR-2 | CACACTTTTAGAATCAACCG | 863–882 | | |
| <i>sed</i> | GSEDR-1 | CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG | 492–514 | 278 | A |
| | GSEDR-2 | ATTGGTATTTTTTTCGTTTC | 750–769 | | |
| <i>see</i> | GSEER-1 | AGGTTTTTTCACAGGTCATCC | 237–257 | 209 | A |
| | GSEER-2 | CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC | 425–445 | | |
| <i>femA</i> | GFEMAR-1 | AAAAAAGCACATAACAAGCG | 1444–1463 | 132 | A et B |
| | GFEMAR-2 | GATAAAGAAGAAACCAGCAG | 1556–1575 | | |
| <i>eta</i> | GETAR-1 | GCAGGTGTTGATTTAGCATT | 775–794 | 93 | B |
| | GETAR-2 | AGATGTCCTATTTTTGCTG | 848–867 | | |
| <i>etb</i> | GETBR-1 | ACAAGCAAAAAGAATACAGCG | 509–528 | 226 | B |
| | GETBR-2 | GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG | 715–734 | | |
| <i>tst</i> | GTSSTR-1 | ACCCCTGTTCCCTTATCATC | 88–107 | 326 | B |
| | GTSSTR-2 | TTTTTCAGTATTTGTAACGCC | 394–413 | | |

10. Détection des gènes de résistance aux antibiotiques par Simplex PCR

La méthode de l'extraction de l'ADN est la même que celle utilisée pour la Multiplex PCR des gènes des entérotoxines (méthode décrite précédemment).

Dans cette partie, le protocole de la PCR Simplex utilisé est celui recommandé dans la littérature et selon les instructions du fabricant des amorces. Le tableau IV.5 présente les caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes de résistance aux antibiotiques : méthicilline (*mecA*), pénicilline (*blaZ*), gentamicine (*aacA-aphD*), érythromycine (*ermA*, *ermC*) et tétracycline (*tetK*, *tetM*).

La préparation du mix pour l'amplification des gènes *aacA-aphD*, *ermA*, *ermC*, *tetK* et *tetM* a été réalisée selon la méthode décrite par Strommenger et *al.* (2003). Le mix d'amplification de la PCR simplex contient 200 µM de deoxynucleoside triphosphates dNTPs; 2,5 µl de 10X tampon de réaction PCR (100 mM Tris-HCl [pH 8,3], 500 mM KCl); 3 mM MgCl₂; 10 pmol pour chaque une des amorces suivantes: *aacA-aphD*, *ermA*, *ermC*, *tetK* et *tetM* et 2 U de *Taq*DNA polymérase (AmpliTaq DNA polymerase; Perkin-Elmer).

Le protocole utilisé pour l'amplification du gène *blaZ* suit les travaux de Martineau et *al.* (2000), le mix contient les mêmes constituants décrits ci-dessus mis à part la concentration du $MgCl_2$ qui est ramenée à 9 mM, et 5 pmol de l'amorce *blaZ* et 3 U du *Taq*DNA polymérase (AmpliTaq DNA polymerase; Perkin-Elmer). La méthode de l'amplification du gène *mecA* suit les recommandations de Mehrotra et *al.* (2000) avec quelques modifications, le mix contient les mêmes constituants que celui utilisé pour le gène *blaZ* à l'exception de la concentration du $MgCl_2$ (2,0 mM) et l'amorce dans laquelle une concentration de 50 pmol a été utilisée.

Tous ces réactifs ont été ajoutés à 3 μ l de l'ADN. Le volume final du mélange a été ajusté à 25 μ l avec de l'eau stérile ultra-pure. Le contrôle positif de l'ADN a été obtenu du département de microbiologie, faculté de médecine vétérinaire, université de Mustafa Kemal (Turquie).

L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un thermocycleur (CFX 96 thermal cycler, Bio-Rad), selon les programmes suivants: dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie par 35 cycles d'amplification (dénaturation à 94°C pendant 30 sec, appariement [les températures d'appariement spécifiques pour chaque amorce sont décrites dans le tableau IV.5] pendant 60 sec, et l'extension à 72°C pendant 1 min), l'amplification se terminant par une extension finale à 72°C pendant 7 min. Après amplification, 10 microlitres de produit de PCR et 5 μ l du marqueur de taille de DNA (100 bp) ont été ensuite analysés par électrophorèse (Model EC 1000 XL Thermo Scientific, Inc.) sur gel d'agarose à 2% (BioMax); teinté par 5 μ l de RedSafeTM d'acide nucléique (iNtROn Biotechnology, Korea), immergé dans le tampon TBE (0.09 M Tris-HCl, 0.09 M acide borique, 2 mM EDTA, pH 8.3) pendant 35 min à 120 V. Les fragments d'ADN obtenus ont été visualisés dans un transilluminateur UV (EC3, UVP Biomaging systems, Inc) et traités par le logiciel Alpha Ease FC Software.

Tableau IV.4: Caractéristiques des amorces utilisées dans la réaction PCR Simplex

| Antibiotique | Nom de l'amorce | séquence Oligo-nucléotidique (5'-3') | Température d'appariement en °C | Taille(bp) | Références |
|---------------|--------------------|--------------------------------------|---------------------------------|------------|----------------------------------|
| Pénicilline | <i>blaZ1</i> | 5'-ACTTCAACACCTGCTGCTTTC-3' | 56 | 173 bp | Martineau <i>et al.</i> , 2000 |
| | <i>blaZ2</i> | 5'-TGACCACTTTTATCAGCAACC-3' | | | |
| Méthicilline | <i>mecA1</i> | 5'-ACTGCTATCCACCCTCAAAC-3' | 54 | 163bp | Mehrotra <i>et al.</i> , 2000 |
| | <i>mecA2</i> | 5'-CTGGTGAAGTIGTAATCTGG-3' | | | |
| Gentamicine | <i>aacA-aphD 1</i> | 5'-TAA TCC AAG AGC AAT AAG GGC-3' | 54 | 227 bp | Strommenger <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>aacA-aphD 2</i> | 5'-GCC ACA CTA TCA TAA CCA CTA-3' | | | |
| Erythromycine | <i>ermA 1</i> | 5'-AAG CGG TAA ACC CCT CTG A-3' | 54 | 190 bp | Strommenger <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>ermA 2</i> | 5'-TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC-3' | | | |
| Erythromycine | <i>ermC 1</i> | 5'-AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT-3' | 54 | 299 bp | Strommenger <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>ermC 2</i> | 5'-TAA TCG TGG AAT ACG GGT TTG-3' | | | |
| Tétracycline | <i>tetK 1</i> | 5'-GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT-3' | 54 | 360 bp | Strommenger <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>tetK 2</i> | 5'-GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA-3' | | | |
| Tétracycline | <i>tetM 1</i> | 5'-AGT GGA GCG ATT ACA GAA-3' | 54 | 158 bp | Strommenger <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>tetM 2</i> | 5'-CAT ATG TCC TGG CGT GTC TA-3' | | | |

11. Analyses Statistiques

Le test de Fisher exact a été utilisé pour comparer la prévalence des gènes codants les entérotoxines détectés chez les *S. aureus* et SCN isolés à partir des matrices alimentaires et celles d'origine clinique. Les prévalences des gènes de résistance aux antibiotiques détectés chez *S. aureus* et SCN ont été aussi comparées par le test Fisher exact (TGV Statistiques). Les résultats des différences ont été jugés significatives si la probabilité trouvée est inférieure au seuil de 0.05 ($P < 0.05$).

Chapitre V

Résultats & Discussion

Résultats et Discussion

Les résultats obtenus à l'issue de notre travail seront présentés par parties, en commençant par les résultats obtenus par la microbiologie classique qui analyse les caractéristiques spécifiques des staphylocoques; puis l'exploration du portage génétique par la méthode moléculaire PCR ; et l'étude des profils de résistance pour arriver à la fin à décrire la situation des staphylocoques dans la région d'étude.

Les résultats sont ainsi organisés en trois parties :

Partie 1 : les résultats présentés dans cette partie concernent les taux de contamination des différentes matrices alimentaires par les SCP et les *S.aureus* (isolats alimentaires).

Partie 2 : Relative à la prévalence des gènes codant les entérotoxines, exfoliatines et la toxine TSST-1, pour les isolats alimentaires et cliniques.

Partie 3 : Rapporte les degrés de sensibilité phénotypique des isolats alimentaires et cliniques et l'exploration des gènes codant les facteurs de résistance pour quelques classes d'antibiotiques.

Résultats partie 1 :**1. Taux de contamination par les staphylocoques**

Les résultats de la contamination par les staphylocoques sont présentés dans le Tableau V.1 et illustrés par la Figure V.1.

Tableau V.1: Taux de cultures positives sur milieu Baird-Parker (Développement bactérien sur milieu Baird-Parker)

| Culture | Nombre | Pourcentage |
|----------|--------|-------------|
| Positive | 91 | 81,25 % |
| Négative | 21 | 18,75% |
| Total | 112 | 100 % |

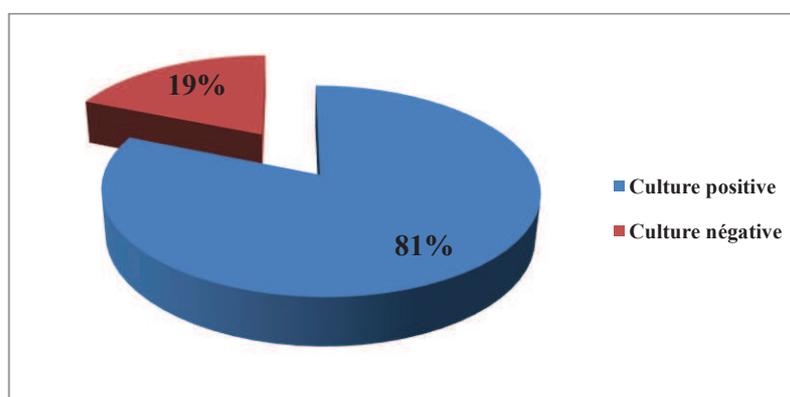


Figure V.1 : Taux de cultures positives sur milieu Baird-Parker

Nos résultats montrent que 91 prélèvements sur 112 ont donné une culture positive sur le milieu Baird-Parker, soit un taux de 81,25% de la totalité des prélèvements.

2. Taux de contamination par les staphylocoques à coagulase positive

Les résultats de la contamination des différentes matrices alimentaires (30 isolats SCP) sont présentés dans le Tableau V.2 et illustrés dans la Figure V.2.

Tableau V.2 : Taux de contamination des différents échantillons par les SCP

| Nature de l'échantillon | Nombre d'échantillons contaminés | Pourcentage de contamination |
|-------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Lait cru | 11 | 36,67 |
| Viande hachée | 11 | 36,67 |
| Merguez | 02 | 6,67 |
| Poulet | 02 | 6,67 |
| Produits de Pâtisserie | 04 | 13,33 |
| Total | 30 | 100 |

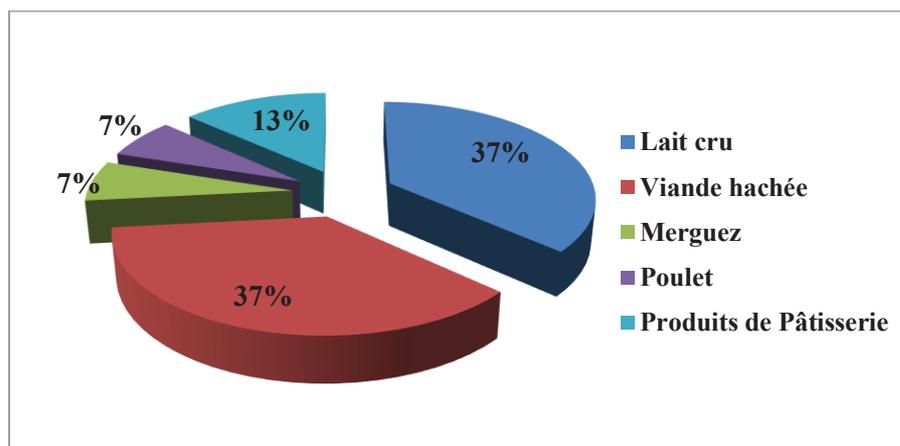


Figure V.2 : Taux de contamination des différentes matrices alimentaires par les SCP

Dans cette étude, sur 91 prélèvements qui ont donné une culture positive sur milieu Baird-Parker, 30 ont donné des colonies positives pour les tests de la catalase et de la coagulase, soit un taux de staphylocoques à coagulase positive (SCP) de 26,78% de la totalité des échantillons analysés.

Selon nos résultats, les trente (30) échantillons contaminé par les SCP sont classés dans l'une des trois catégories suivantes : Satisfaisante, Acceptable, Non satisfaisante (Tableau V.3 et Figure V.3)

Tableau V.3 : Répartition des échantillons analysés selon le taux de contamination par les SCP (catégorie S, NS, A).

| Catégorie d'aliments | S | A | NS |
|--------------------------|----|----|----|
| Lait cru (n=23) | 12 | - | 11 |
| Viande hachée (n=25) | 14 | 04 | 07 |
| Viande morceau (n=10) | 10 | - | - |
| Merguez (n=5) | 03 | 01 | 01 |
| Poulet (n=15) | 13 | - | 02 |
| Dinde (n=10) | 10 | - | - |
| Plats cuisinières (n=10) | 10 | - | - |
| Pâtisserie (n=14) | 10 | 01 | 03 |

- Douze (12) échantillons de lait (52,17%) sont classés dans la catégorie **S** (satisfaisante) et onze (47,82%,) prélèvements sont classés dans la catégorie **NS** (non satisfaisante).
- Les résultats des échantillons de viande hachée se répartissent comme suit : quatorze prélèvements (56%) sont classés dans la catégorie **S** et quatre d'entre eux (16%) sont classés comme acceptables (catégorie **A**), tandis que sept (28%) sont classés dans la catégorie **NS** (non satisfaisante).
- Trois prélèvements de Merguez (60%) sont classés dans la catégorie **S**, les autres sont jugés comme acceptable (**A**) ou non satisfaisant (**NS**).
- Un taux de 86,66% des échantillons de poulet sont rangés dans la classe **S**, et 13,33% dans la classe **NS**.
- 71,43% des échantillons de pâtisseries sont classés dans la classe **S**; 21,42% dans la classe **NS** et 7,14% jugés comme acceptable (classe **A**).
- Tous les échantillons de viande bovine en morceaux, ceux de dinde et de plats cuisinés sont classés dans la catégorie **S**.

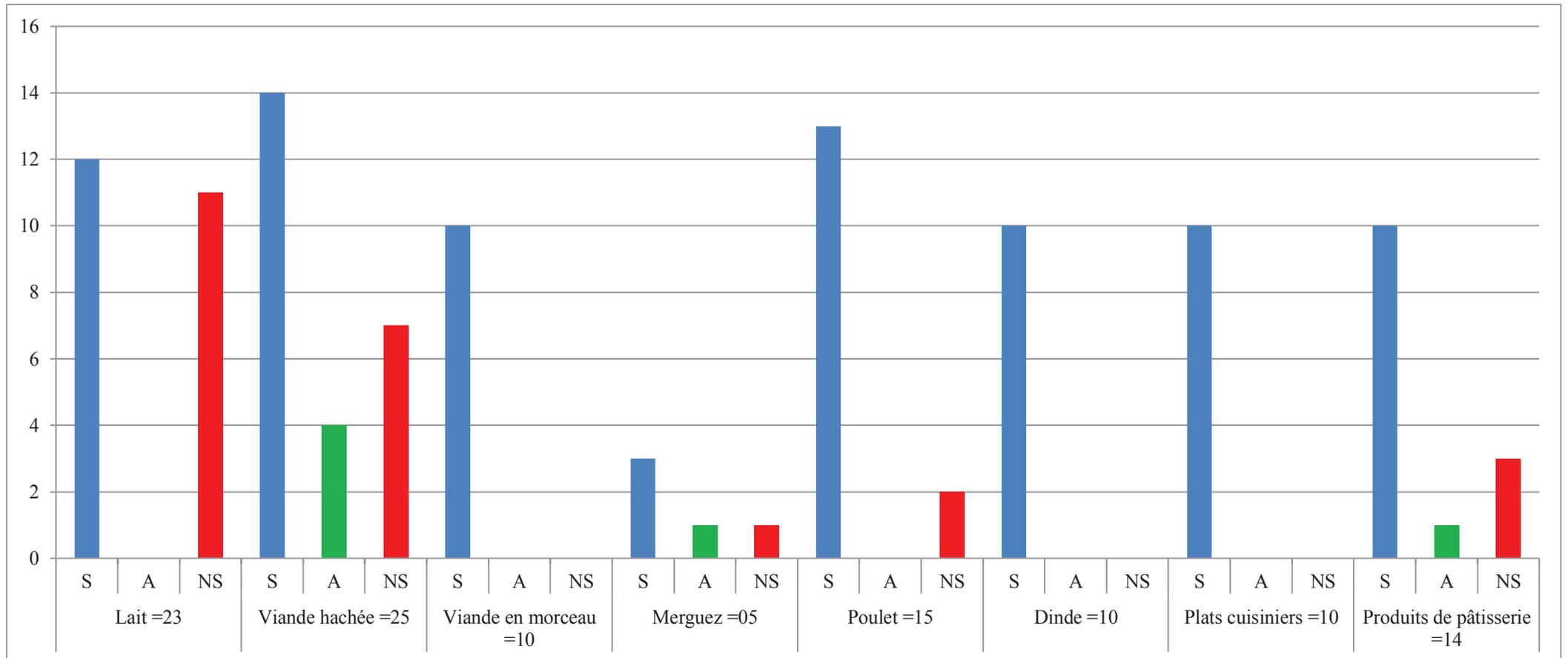


Figure V.3 : Répartition des échantillons analysés selon le taux de contamination par les SCP.

3. Taux de contamination des matrices alimentaires par les *S.aureus*

La répartition des isolats de *S.aureus* selon la nature des échantillons positifs est présentée dans le Tableau V.4 et illustré par la Figure V.4.

Tableau V.4: Répartition du nombre d'isolats de *S.aureus* selon le type échantillons positifs.

| Nature des échantillons | Nombre d'isolats de <i>S.aureus</i> | % d'isolats de <i>S.aureus</i> |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Lait cru | 10 | 41,67 |
| Viande hachée | 8 | 33,33 |
| Merguez | 02 | 8,33 |
| Poulet | 02 | 8,33 |
| Produits de Pâtisserie | 02 | 8,33 |
| Total | 24 | 100 % |

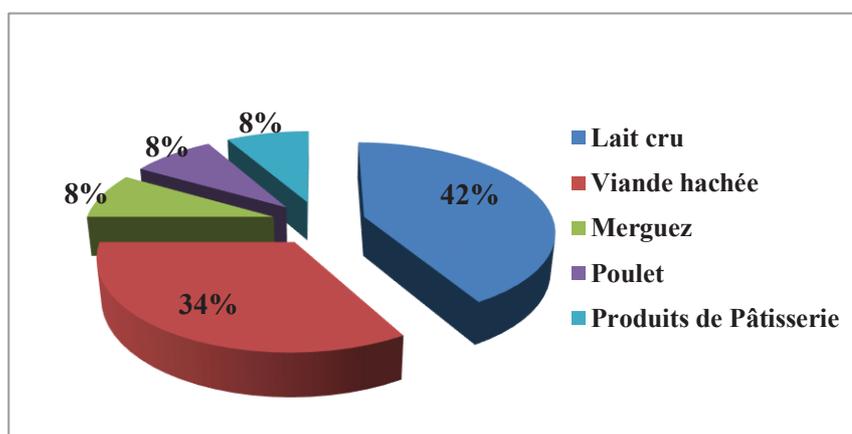


Figure V.4: Répartition du nombre d'isolats de *S.aureus* selon le type des échantillons positifs

Parmi les trente (30) isolats de staphylocoques à coagulase positive, 24 ont été confirmées comme *Staphylococcus aureus*, ce qui représente un taux de contamination de 21,42% des matrices alimentaires analysées par les *S. aureus*.

Discussion partie 1 :

Dans cette étude le taux des échantillons qui donnent une culture positive sur milieu Baird-Parker est relativement important. Dans une étude menée en Algérie par Chaalal (2013), le taux de positivité de la culture bactérienne sur le même milieu de Baird-Parker était de 71,96%.

Bien que le taux des cultures positives sur milieu Baird-Parker retrouvé au cours de notre étude soit relativement élevé, il ne reflète pas à notre avis la qualité bactériologique des échantillons analysés, et par-delà les risques encourus par les consommateurs. Considérant que les normes internationales relatives à la microbiologie des aliments (NF EN ISO 6888-1/A1) et les textes réglementaires relatifs à l'hygiène alimentaire (JORADP, 1998) ne prennent en compte que les staphylocoques à coagulase positive, particulièrement l'espèce *S.aureus* comme agent pathogène présentant un risque potentiel pour la santé des consommateurs. La confirmation de la présence de staphylocoques à coagulase positive (*S.aureus* et d'autres espèces) nécessite d'autres tests complémentaires.

Le développement bactérien sur milieu Baird-Parker ne constitue qu'une indication de la contamination globale (Lancette et Bennett, 2001). Des bactéries appartenant à des genres autres que les staphylocoques peuvent se multiplier et former des colonies d'aspect similaire à celui des staphylocoques ex : *Proteus mirabilis* et *Micrococcus* (Joffin et Leyral, 2006).

Les staphylocoques à coagulase positive regroupent plusieurs espèces connues pour leur pouvoir pathogène. Ce groupe inclut *S. aureus* ainsi que *S. intermedius*, *S. hycus* (Berdgoll, 1989) et *S. delphini* (Martin et Iandolo, 2000). Ce qui indique que le taux de contamination présenté dans le tableau V.2 ne spécifie pas l'espèce au sein du groupe des SCP.

Le taux de contamination des matrices alimentaires par des SCP enregistré au cours de cette étude (26,78%) est légèrement supérieur à celui retrouvé par Normanno et *al.*(2005) en Italie sur différents échantillons alimentaires (17,3%), et à celui rapporté par Lina et *al.* (2007) au Brésil (15,1%). Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses, tout manque d'hygiène corporelle ou vestimentaire des manipulateurs des denrées alimentaires peut conduire à des contaminations de ces produits alimentaires. Le taux de contamination relativement élevé enregistré dans notre étude pourrait refléter les mauvaises conditions d'hygiène de préparation, de stockage et vente des produits alimentaires. En fait le non-respect de la chaîne de froid et les mauvaises conditions d'hygiène conduisent certainement à des contaminations des matrices alimentaires et en conséquence des toxi-infections pourraient se déclencher. Dans les pays développés, le lancement de plusieurs lois et

textes réglementaires régissant la sécurité sanitaire des aliments, ainsi que l'application rigoureuse de ces lois ont contribué à la maîtrise des risques sanitaires liés aux denrées alimentaires. Dans notre région nous avons constaté un manque flagrant de maîtrise de l'hygiène surtout dans les locaux de vente du lait cru et les restaurants de type fast-food.

Selon nos résultats, le taux de contamination le plus élevé est noté pour les échantillons de lait cru (36,67%). Ces résultats sont proches de ceux retrouvés par Normanno et *al.* (2005) (38,4%), mais inférieurs à ceux signalés par Lina et *al.* (2007) où le taux de contamination atteignait 100%. La région concernée par notre étude est connue par la vente de lait cru et autres produits laitiers (lait fermenté, lait caillé et beurre) dans des petits locaux, où les vendeurs s'approvisionnent en lait issu des différents petits élevages laitiers de la région, cela représente un risque majeur, vu le manque d'informations pour le statu sanitaire des vaches laitières éventuellement présentant des mammites, aussi la difficulté de maîtriser les conditions d'hygiène lors la traite et du transport. De plus, même si une petite quantité de lait provenant d'un seul éleveur contient des germes pathogènes, tout le lait de mélange vendu aux consommateurs sera contaminé.

La viande hachée était également fréquemment contaminée par les SCP (36,67%). Les autres produits carnés (merguez) et le poulet montrent un taux de contamination de 6,67%. Ces résultats sont comparables à ceux de Normanno et *al.* (2005) menés en Italie, qui ont rapporté un taux de 31,2% de contamination des viandes hachées.

Dans une autre étude réalisée par Desmarchelier et *al.* (1999) sur des échantillons de viande fraîche prélevée dans trois abattoirs différents en Australie, les taux de contamination par des souches de SCP étaient de l'ordre de 39,1%, 45% et 19,5%.

Pour les produits de pâtisserie, 13,33% de nos échantillons se sont révélés positifs. Normanno et *al.* (2005) ont rapporté un taux de contamination de l'ordre de 3,5% dans la même catégorie de matrice alimentaire.

Notre étude montre que les produits laitiers sont considérés comme des aliments particulièrement à risque (47,82% NS), et que la source de contamination dans ce cas reste indéterminée. D'une façon globale, la source de contamination du lait par les staphylocoques a une double origine. Elle peut être d'origine endogène, majoritairement représentée par les mammites ; ou exogène, représentée par le

portage de staphylocoques sur la peau et les muqueuses, où la présence de petites lésions cutanées favorise la contamination par les staphylocoques (Kerouanton et *al.*, 2007 ; Hennekinne et De Buyser, 2010).

Capurro et *al.* (2010) ont montré que 47% des vaches laitières étaient porteuses de staphylocoques sur leur peau. Au cours des enquêtes réalisées en France et au Royaume-Uni, le taux des *S. aureus* isolées dans les quartiers des mamelles infectées était de 20% à 40% lors d'infections inapparentes ou sub-cliniques, et de 15% à 30% lors de mammites cliniques (Poutrel, 1992). En Algérie, Hamiroune et *al.* (2014) ont montré que les staphylocoques à coagulase positive étaient présents dans 32,79 % des échantillons laitiers.

La contamination du lait pourrait également provenir des souillures des manipulateurs ou des matériels de fabrication et de traite où la bactérie est capable de survivre grâce à des biofilms formés sur des surfaces inertes (Roberson et *al.*, 1998). Dans notre étude, il est important de signaler que les vendeurs de lait et de produits laitiers utilisent généralement des récipients en plastique pour transporter ou stocker le lait cru, ces récipients sont difficiles à nettoyer et à désinfecter du fait de leur système d'ouverture très serrée et les caractéristiques de la matière plastique comme matière non compatible avec les denrées alimentaires surtout lors d'usages répétés.

Tous les résultats de l'analyse des échantillons de viande fraîche étaient négatifs vis-à-vis des SCP, alors qu'un taux de contamination relativement important a été enregistré dans les échantillons de viande hachée (28%).

La présence des staphylocoques dans les produits carnés tels que la viande hachée et les merguez pourrait être due à une contamination initiale des carcasses soit par les micro-organismes provenant de l'aire d'abattage, des chambres de stockage, des ateliers de découpe, du matériel utilisé, soit par le contenu du tractus intestinal ou des régions nasales ; ce dernier site est considéré comme le site principal de colonisation par des staphylocoques généralement *S. aureus* et *S. intermidis* (Corbière Morot-Bizot et *al.*, 2006, Bounar-Kechih et *al.*, 2018).

L'homme est considéré comme le vecteur principal de la contamination par les staphylocoques, notamment au cours des manipulations intervenant tout au long de la chaîne alimentaire. Ainsi, chez l'homme, selon différents auteurs, le portage nasal

concerne 20% à 50% des individus (Bergdoll, 1989; Kluytmans et *al.*, 1997, Monecke et *al.*, 2011). La contamination des produits alimentaires comme le cas des viandes hachées pourrait aussi être due à la microflore cutanée des manipulateurs. La négligence des bonnes pratiques d'hygiène au cours de la production et de la préparation des denrées alimentaires pourrait conduire à des taux de contaminations très élevés (Hennekinne et De Buyser, 2010). Dans notre étude, il a été remarqué que dans certains commerces, la préparation de viande hachée à l'avance est une pratique qui a toujours cours, mais la plupart des bouchers respectent la réglementation en vigueur interdisant la préparation de viande hachée à l'avance sauf lors de la demande du consommateur (AIM du 20/09/1999). Cela ne doit pas cacher les conditions d'hygiène déplorables observées dans nos boucheries. Les tables de travail sont souvent très souillées, et les couteaux, hachoirs et autres instruments ne sont nettoyés que lors de la fermeture, à la fin de la journée. Il en est de même pour les carcasses ou morceaux de carcasses qui sont suspendus et exposés à la poussière à l'entrée de la boucherie.

Dans le cas particulier des viandes hachées, si les morceaux servant à la préparation sont initialement contaminés, ou si le manipulateur qui procède à l'opération de hachage est porteur de staphylocoques; dans ce cas le hachage représente un facteur favorisant la dissémination des staphylocoques dans toute la masse de viande hachée obtenue, en augmentant la surface de contact des bactéries avec les petites particules de la denrée alimentaire. Dans ce cas, les staphylocoques trouvent plus de possibilité de prolifération et de toxinogénèse au sein de la matrice alimentaire (Guiraud, 2003).

L'absence de staphylocoques à coagulase positive dans les plats cuisinés analysés est certainement due à l'exposition de ces aliments aux traitements thermiques au cours de la cuisson. Cela ne signifie pas l'absence d'entérotoxines thermostables préformées dans ce type d'aliments présentant un risque potentiel sanitaire pour le consommateur.

En revanche, la présence de staphylocoques dans les aliments crus est moins grave que leur présence dans ceux qui ont fait l'objet d'un traitement thermique (cuisson ou pasteurisation), car un traitement thermique ultérieur pourrait réduire le nombre de souches entérotoxigènes (Hennekinne et De Buyser, 2010).

Le taux de contamination (21,42%) des différentes matrices alimentaires par les *S.aureus* est comparable à celui rapporté par d'autres études, notamment celle réalisée au Portugal par Periera et al. (2009) qui ont isolé 148 *S.aureus* à partir de différentes matrices alimentaires. En Algérie, l'étude menée par Chaalal (2013) a révélé un taux de contamination des différentes matrices alimentaires par des souches de *S.aureus* allant jusqu'à 52,33%.

Selon notre étude, les échantillons de lait cru étaient les plus contaminés par *S.aureus* (41,67%), suivis par les viandes hachées (33,33%). Zouharova et Rysanek (2008) et Rahimi (2013) ont rapporté des taux de contamination de 15,9% et 5,8%, respectivement pour les échantillons de lait et de produits laitiers. En revanche, Rall et al. (2008) et André et al. (2008) ont enregistré des taux de contamination de 70,4% et 66,7%, respectivement, dans les mêmes catégories de matrices alimentaires que nôtres.

En Turquie, Gundogan et al. (2005) ont signalé un taux de contamination des viandes fraîches par les *S.aureus* de 53,3%. En Algérie, Chaalal (2013), a rapporté un taux de contamination des viandes hachées par *S.aureus* de 55,5%.

Ces résultats mettent en évidence un risque potentiel pour les consommateurs et confirme l'importance de *S.aureus* au sein de la population des staphylocoques comme espèce majeure de contamination des denrées alimentaires. L'espèce *S.aureus* possédant un arsenal de facteurs de virulence est majoritairement impliqué dans les toxi-infections alimentaires. L'inquiétude est d'autant plus grande, après avoir constaté les mauvaises conditions d'hygiène et le manque de respect des procédures sanitaires lors de la préparation et la vente des produits alimentaires dans les différentes filières de denrées alimentaires

En l'absence d'hygiène rigoureuse et de mesures préventives, la contamination et la production d'entérotoxines de *S.aureus* dans les aliments peuvent se produire et des toxi-infections alimentaires peuvent se déclencher (Normanno et al., 2007).

Selon des données obtenues du bureau d'hygiène de la wilaya de Médéa, deux épisodes de toxi-infections alimentaires collectives ont frappé cette wilaya. La première en 2016, où pas moins de 167 personnes, issues de différentes localités de cette wilaya, ont été intoxiquées, suite à la consommation de pâtisserie, vendue dans

un local, sis au centre-ville de Médéa. Les victimes, originaires des communes de Médéa, El-Hamdania et Si-Mahdjoub avaient consommé de la pâtisserie, de qualité douteuse. Le deuxième épisode est survenu en 2017, où pas de moins de 150 personnes ont été intoxiquées suite à la consommation de lait et autres produits laitiers achetés à partir de deux points de vente dans la wilaya ; dans ce cas, les analyses de laboratoire effectuées ont confirmé l'implication des staphylocoques comme agent responsable de cette toxi-infection alimentaire dramatique.

Résultats partie 2 :

1. Prévalence des gènes codant les entérotoxines staphylococciques, les exfoliatines et la toxine TSST-1

Dans le présent travail, 96 isolats de staphylocoques (51 souches d'origine alimentaires et 45 d'origine clinique) ont été testées pour la présence des gènes codant les entérotoxines staphylococciques classiques A-E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* et *see*), les gènes *eta* et *etb* codant les exfoliatines A et B et aussi le gène *tst* codant la toxine TSST-1. Les résultats de la détection de ces gènes sont présentés dans les tableaux V.5 et V.6. Les bandes d'amplification des gènes obtenus sont illustrés dans les figures V.5, V.6 et V.7.

Tableau V.5: Distribution des gènes codant les entérotoxines staphylococciques, les exfoliatines et la toxine TSST-1 pour les isolats alimentaires

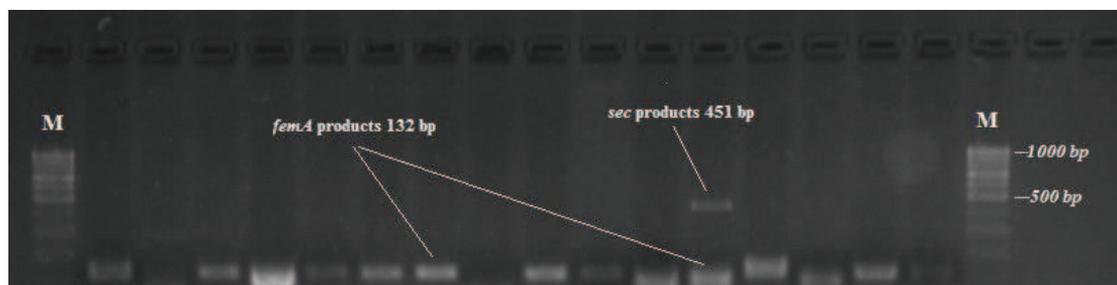
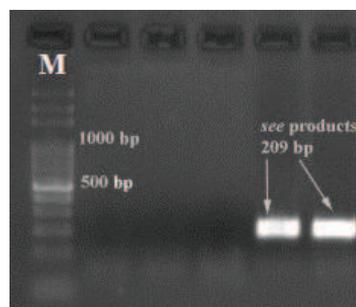
| Gènes | Isolats alimentaires (n = 51) | | P | Nature de l'échantillon |
|-----------------|-------------------------------|--------------|-------|---|
| | <i>S. aureus</i> (n = 22) | SCN (n = 29) | | |
| <i>sea</i> 102 | 2 (9,09%) | - | 0,181 | (2) pâtisserie |
| <i>seb</i> 164 | - | - | ND | - |
| <i>sec</i> 451 | 1(4,55%) | 2(6,90%) | 1,000 | (1) pâtisserie (2) viande hachée |
| <i>sed</i> 278 | 11(50%) | 8(27,59%) | 0,145 | (10) lait cru (1) pâtisserie (2) merguez (6) viande hachée |
| <i>see</i> 208 | 1(4,55%) | 2(6,90%) | 1,000 | (3) lait cru |
| <i>femA</i> 132 | 22 | - | ND | (10) lait cru (2) pâtisserie (2) merguez (8) viande hachée |
| <i>eta</i> 93 | - | - | ND | - |
| <i>etb</i> 266 | - | - | ND | - |
| <i>tst</i> 326 | - | - | ND | - |

P : Valeur de signification statistique ($P < 0,05$). ND : Non Déterminé

Tableau V.6: Distribution des gènes codant les entérotoxines staphylococciques, les exfoliatines et la toxine TSST-1 pour les isolats cliniques

| Gènes | Isolats cliniques (n = 45) | | | P | Nature d'échantillon |
|-----------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------|-------|---|
| | isolats hospitaliers (n = 18) | isolats communautaires (n = 27) | | | |
| | <i>S. aureus</i> (n = 18) | <i>S. aureus</i> (n = 21) | SCN (n = 06) | | |
| <i>sea 102</i> | - | - | - | ND | - |
| <i>seb 164</i> | 1(5,56%) | 1(4,76%) | - | 1,000 | (1) Sperme |
| <i>sec 451</i> | 1(5,56%) | - | - | 1,000 | (1) Décharge Vaginale (1) Prélèvement de gorge |
| <i>sed 278</i> | 3(16,67%) | - | - | 1,000 | (1) Hémoculture (1) Sonde urinaire (1) Décharge Vaginale |
| <i>see208</i> | - | - | - | ND | - |
| <i>femA 132</i> | 18 | 21 | - | ND | - |
| <i>eta 93</i> | - | - | - | ND | - |
| <i>etb 266</i> | - | - | - | ND | - |
| <i>tst 326</i> | 9(50%) | 15(71,43%) | 1(16,67%) | 0,558 | (9) Pus (5) Urine (5) Sperme (3) Décharge Vaginale (1) Liquide synovial (1) Plaie chirurgicale (1) Sonde urinaire |

P : Valeur de signification statistique ($P < 0,05$). ND : Non Déterminé.

**Figure V.5 :** Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats de PCR des gènes (*femA* et *sec*) chez des *S. aureus* cliniques. M : marqueur de taille de l'ADN (échelle 100 pb).**Figure V.6 :** Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats de PCR des gènes *see* chez des isolats SCN d'origine alimentaire. M : marqueur de taille de l'ADN (échelle 100 pb).

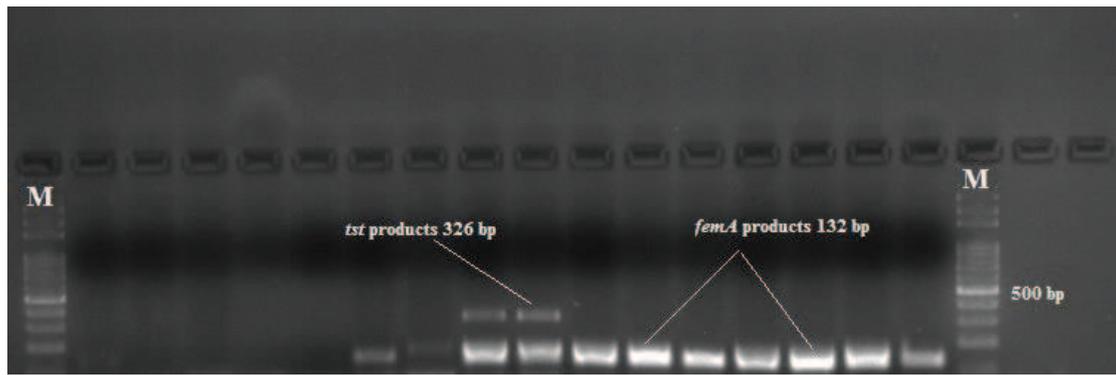


Figure V.7 : Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats de PCR des gènes (*femA* et *tst*) chez des isolats de staphylocoques d'origine clinique. M : marqueur de taille de l'ADN (échelle 100 pb).

Rappelons que Pastorex Staph Plus a pu révéler la présence de 63 isolats de *S.aureus* (24 d'origine alimentaire et 39 d'origine clinique) ; alors que la confirmation moléculaire (amplification du gène *femA* par PCR) a permis de confirmer 61 isolats comme étant des *S.aureus* (22 d'origine alimentaire et 39 d'origine clinique).

Parmi la totalité des isolats alimentaires testés ($n = 51$), 27 (52,94%) portaient au moins un gène codant pour les entérotoxines staphylococciques SEA-SEE. Le gène *sed* était le plus dominant (70,37%); il a été détecté chez 19 isolats (11 *S. aureus* et 8 SCN). Cependant, trois isolats possédaient le gène *sec*. Le gène *sea* codant l'entérotoxine SEA n'a été retrouvé que chez deux isolats de *S. aureus*, et le gène *seb* était totalement absent.

Selon la nature des échantillons alimentaires analysés, le lait cru et les viandes hachées étaient majoritairement contaminées par des isolats de staphylocoques possédant le gène *sed* (10 et 6 isolats, respectivement) (Tableau V.5). D'autre part, les trois isolats possédant le gène *see* ont été isolés à partir des échantillons de lait cru. En outre, les deux isolats de *S.aureus* possédant le gène *sea* ont été isolés à partir de produits de pâtisserie.

Selon les résultats présentés dans le Tableau V.5; 68,18% des isolats *S.aureus* possédaient au moins un gène codant les entérotoxines par rapport à 41,37% des isolats SCN ($P < 0,089$). Cette différence était plus remarquable pour les deux gènes *sed* et *sea* ($P=0,145$, $P=0,181$, respectivement). Néanmoins, le taux des gènes *sec* et *see* retrouvés chez les isolats SCN (6,9%) était supérieur en comparaison avec celui observé chez les isolats de *S. aureus* (4,54%) ($P = 1,000$).

Concernant les isolats d'origine clinique, seulement six (6/13,33%) isolats de *S.aureus* possédaient un ou plusieurs gènes codant les entérotoxines staphylococciques. Trois isolats d'origine hospitalière possédaient le gène *sed* et un isolat possédait le gène *seb*. Exceptionnellement, un isolat de *S.aureus* d'origine communautaire portait le gène *seb*. Les résultats obtenus de notre étude montre que le portage des gènes des entérotoxines est significativement élevé ($P<0.001$) chez les isolats d'origine alimentaire (27, 55,94%) en comparaison à celles d'origine clinique (6, 13,33%).

Un taux relativement élevé (55,55%) de isolats d'origine clinique portaient le gène *tst* codant la toxine TSST-1, ce taux était légèrement supérieur pour les isolats d'origine communautaire (16) par rapport à celles isolées en milieu hospitalier (09 isolats) ($P=0,558$). Les gènes *eta* et *etb* codant les exfoliatines A et B n'ont pas été détectés dans toutes les isolats d'origine clinique.

2. Profils génétiques

Le Tableau V.7 présente les dix (10) profils génétiques observés chez l'ensemble des isolats possédant un ou plusieurs gènes codant les entérotoxines staphylococciques et le gène *tst* de la toxine TSST-1.

Tableau V.7: Profils génétiques des gènes codant les entérotoxines et la toxine TSST-1 pour tous les isolats.

| Profils génétiques | isolats alimentaires (n = 51) | | isolats cliniques (n = 45) | |
|--------------------|-------------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| | <i>S. aureus</i> (n = 22) | SCN (n = 29) | <i>S. aureus</i> (n = 39) | SCN (n = 06) |
| <i>sea</i> | 1 | - | - | - |
| <i>seb</i> | - | - | 1 | - |
| <i>sec</i> | - | 2 | 1 | - |
| <i>sed</i> | 9 | 8 | - | 1 |
| <i>see</i> | 1 | 2 | - | - |
| <i>Sed-sea</i> | 1 | - | - | - |
| <i>Sed-sec</i> | 1 | - | - | - |
| <i>Sed-seb-tst</i> | - | - | 1 | - |
| <i>Sed-tst</i> | - | - | 1 | - |
| <i>tst</i> | - | - | 22 | 1 |

De nos résultats, il ressort que les isolats de staphylocoques peuvent porter une multitude des gènes codants pour les différentes entérotoxines staphylococciques, et parfois en association avec le gène *tst* codant la toxine TSST-1. D'autre part, certains isolats peuvent ne posséder qu'un seul gène.

Nos résultats montrent une prédominance des génotypes contenant un seul type de gène (6 génotypes). Ainsi, 26 isolats possèdent un seul type de gène codant l'une des entérotoxines, et 23 isolats portent seulement le gène *tst*. Les deux génotypes *sed* et *tst* sont les plus fréquemment retrouvés (18 et 23 isolats, respectivement). Les génotypes contenant plusieurs type de gène sont : *sed-sea*, *sed-sec*, *sed-tst*, *sed-seb-tst*.

Nos résultats montrent que les profils génétiques suivants: *sea*, *seb*, *sed-sea*, *sed-sec*, *sed-seb-tst* et *sed-tst* sont observés exclusivement chez des isolats de *S. aureus*. Le reste des génotypes inclue les deux catégories des isolats, *S. aureus* et SCN.

Discussion partie 2 :

Pastorex Staph Plus est un Kit d'agglutination rapide permettant d'identifier rapidement les *S. aureus* à partir d'une culture sur gélose. Néanmoins, ses performances de sensibilité et de spécificité ne sont jamais parfaites ; des faux positifs et des faux négatifs peuvent apparaître. Selon une étude de comparaison des performances de quatre Kits commerciaux d'identification de *S.aureus*, le test Pastorex Staph Plus possède une spécificité de 97%, il ressort que ce test donne des résultats plus fiables pour des staphylocoques à coagulase positive que celle à coagulase négative (Araj et Atamian, 1997).

Globalement, selon les matrices alimentaires analysées, l'importance du taux de contamination avec un portage génétique codant pour les entérotoxines staphylococciques est en accord avec plusieurs études ultérieures (Chapaval et al., 2006; Pereira et al., 2009 et Carfora et al., 2015). De la même manière, nous observons que le gène *sed* qui était le plus détecté chez les isolats alimentaires, (isolées surtout à partir de lait cru et de viandes hachées) est en accord avec les travaux de Pu et al. (2011) et ceux de Bianchi et al. (2013), qui démontrent un niveau de détection du gène *sed* de 15% pour les viandes et de 25% pour les produits laitiers. Cependant, Hwang et al. (2007) et Zouharova et Rysanek (2008) ont enregistré des taux inférieurs aux nôtres (1% et 2,9% des isolats provenant de viandes et de lait étaient porteuses du gène *sed*).

Balaban et Rasooly (2000) et Normanno et al.(2005) suggèrent que l'entérotoxine SED est majoritairement impliquée dans les toxi-infections alimentaires staphylococciques; le risque est accentué avec une forte contamination des denrées

alimentaires par des souches de staphylocoques portant le gène *sed* où les conditions de prolifération et de toxinogénèse semblent être réunis. Le taux élevé de détection du gène *sed* codant l'entérotoxine D pourrait être relié avec les épisodes de toxi-infections alimentaires enregistrés dans la wilaya de Médéa dans les dernières années.

Parmi la totalité des échantillons analysés, le gène *sea* n'a été détecté que chez les isolats provenant des produits de pâtisserie (Tableau V.5). Chapaval et *al.* (2006) et Rall et *al.* (2008) ont rapporté que le gène *sea* était le plus détecté chez des staphylocoques isolées à partir de lait cru (67,78% et 28,9%, respectivement). Le gène *sea* est habituellement retrouvé chez des isolats de staphylocoques responsables de toxi-infections alimentaires (Omoe et *al.*, 2005 [5,8%]; Chiang et *al.*, 2008 [29,2%], Tang et *al.*, 2011 [50%]). Dans notre investigation, malgré le taux faible de détection du gène *sea* dans les produits de pâtisserie, Il est important de signalé que l'isolement des isolats de staphylocoques portant le gène *sea* codant l'entérotoxine SEA est très inquiétant, et peut être directement cohérent avec l'épisode de TIAC déclarée dans la wilaya de Médéa suite à la consommation de produits de pâtisserie.

Ces observations corroborent les conclusions de Balaban et Rasooly, (2000) qui ont noté que l'entérotoxine staphylococcique SEA est la plus impliquée dans les toxi-infections staphylococciques (Staphylococcal Food Poisoning SFP). Pour les échantillons de lait, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Pereira et *al.* (2009), qui n'ont pas détecté le gène *sea* chez des staphylocoques isolées à partir des échantillons de lait cru. Ces observations nous amènent à penser qu'il serait plus utile et nécessaire de mettre en place une méthode immunologique pour la détection des entérotoxines dans les aliments suspects ou présentant une charge bactérienne des staphylocoques dépassant le seuil critique d'acceptabilité.

Concernant le gène *seb*, nos résultats sont en accord avec les études menées par Cremonesi et *al.* (2005) et Bianchi et *al.* (2013) ; ces derniers ont rapporté qu'une seule souche de staphylocoque isolée à partir du lait portait le gène *seb*. Hwang et *al.* (2007) également n'ont pas détecté le gène *seb* chez les souches isolées à partir des échantillons de viandes.

Dans la présente étude, les deux gènes *sec* et *see* n'ont été retrouvés que chez trois isolats de staphylocoques, alors que les gènes *eta* et *etb* codant les exfoliatines A et B et le gène *tst* codant la toxine TSST-1 n'ont pas été détectés chez l'ensemble des

isolats d'origine alimentaire. Rall et *al.* (2008) ont noté que seulement 5 isolats portaient le gène *sec* et 2 souches portaient le gène *see*. Cependant, dans les études de Zouharova et Rysanek (2008) et de Pu et *al.* (2011), les gènes *sec* et *see* n'ont pas été détectés chez les souches isolées à partir de différentes denrées alimentaires. D'autres auteurs (Jørgensen et *al.*, 2005; Rahimi, 2013) confirment également que les staphylocoques isolées à partir des échantillons de lait ne portaient pas le gène *see*.

Au cours de notre étude, le taux de gènes codant les entérotoxines staphylococciques retrouvé chez l'ensemble des isolats SCN (41,37%) est plus important que celui signalé par Blaiotta et *al.* (2004) et da Cunha et *al.* (2006), il est cependant en accord avec les résultats d'une étude récente menée par Fijałkowski et *al.* (2016).

Dans notre étude, le gène *sed* était majoritairement détecté chez les isolats SCN. Cependant, les deux gènes *sea* et *seb* n'ont pas été retrouvés. Da Cunha et *al.* (2006) ont rapporté que 15% des isolats SCN d'origine alimentaire portaient le gène *sea*. Vernozy-Rozand et *al.* (1996) et Rodriguez et *al.* (1996) ont pu détecter des gènes codant les entérotoxines staphylococciques chez des isolats SCN provenant des échantillons de viandes et de produit laitiers.

D'après Bergdoll (1990) et Rossen et *al.* (1992), la détermination du type d'entérotoxine est importante parce qu'il suggère une possible source de contamination des aliments. A cet effet, il a été démontré que les entérotoxines SEA et SEB étaient associées à la contamination des aliments (principalement des manipulateurs) et que les entérotoxines SEC et SED étaient associées à une contamination d'origine animale (principalement les vaches et les cochons).

Orwin et *al.* (2001) rapportaient que les toxi-infections staphylococciques (SFP) sont des maladies complexes d'étiologies diverses. Dans la même tendance, Chiang et *al.* (2008) ont conclu que l'incrimination d'une seule toxine dans les toxi-infections staphylococciques est ambigu, car différents facteurs peuvent intervenir, tels que la composition de la matrice alimentaire, la présence d'autres microorganismes, le type et la quantité des entérotoxines et le statut immunitaire des patients. Les aliments riches en protéine comme le lait et les viandes sont souvent susceptibles de porter des staphylocoques entérotoxinogènes.

Pour les isolats d'origine cliniques, le taux de portage des gènes des entérotoxines est inférieur à ceux rapportés par Becker *et al.* (2003)[43%]; Nashev *et al.* (2007)[67,9%] et Chiang *et al.* (2008)[57,8%]. Ces différences retrouvées avec ces auteurs pourraient s'expliquer par la nature des échantillons à partir desquelles les staphylocoques ont été isolés, qui inclut des isolats responsables de toxi-infections alimentaires ou d'autres isolées à partir du portage nasal ou des mains du personnel manipulant les denrées alimentaires. Dans notre étude, les staphylocoques ont été isolées à partir des échantillons cliniques en relation avec des infections staphylococciques systémiques (infections suppuratives, uro-génitale, orthopédique, hémoculture) (Tableau V.6). Paradoxalement, le taux de portage des gènes des entérotoxines dans les isolats d'origine clinique trouvé dans notre étude est inférieur à celui signalé par d'autres auteurs, comme Naffa *et al.* (2006), da Cunha *et al.* (2007) et Demir *et al.* (2011) qui ont enregistré des taux élevés de isolats portant les gènes codant les entérotoxines staphylococciques (27%, 47,5% et 55%, respectivement), ces auteurs ont étudié les mêmes catégories d'échantillons que les nôtres. Becker *et al.* (2003) et Demir *et al.* (2011) suggèrent que les différences entre les résultats peuvent être influencées par les origines des zones géographiques où les échantillons ont été prélevés.

Bien que plusieurs auteurs (Becker *et al.*, 2003; Naffa *et al.*, 2006 ; da Cunha *et al.*, 2007; Nashev *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2008; Demir *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2011) ont signalé la prédominance du gène *sea* chez des staphylocoques isolées de différentes catégories d'échantillons cliniques, nos résultats montrent qu'aucune isolat clinique ne portait le gène *sea*. Concernant la détection du gène *see*, nos résultats sont en adéquation avec les travaux de Naffa *et al.* (2006) ; da Cunha *et al.* (2007); Nashev *et al.* (2007); Chiang *et al.* (2008); Demir *et al.* (2011) et Tang *et al.* (2011).

Le taux de détection du gène *tst* chez les isolats cliniques (55,55%), est supérieur à ceux rapportés par d'autres études focalisées sur les isolats cliniques (Becker *et al.*, 2003 [6,6%]; da Cunha *et al.*, 2007 [14,1%] ; Demir *et al.*, 2011 [20,3%]. Cependant, ce résultat est proche du taux enregistré par Chiang *et al.* (2008)[59,1%].

La toxine du choc toxique staphylococcique TSST-1 fait partie du groupe des exotoxines pyrogéniques à activité superantigénique (PTSAGs), elle est rarement impliquée dans les toxi-infections alimentaires staphylococciques. Cette toxine a un rôle étiologique primordial dans les infections staphylococciques systémiques comme

le syndrome du choc toxique staphylococcique (TSS) (Dinges et al., 2000). Tsen et al. (1998) ; El-Ghodban et al. (2006); Lappin et Ferguson (2009) ont rapporté que la toxine TSST-1 codée par le gène *tst* était fréquemment détectée chez les isolats de *S. aureus* d'origine clinique, mais rarement chez les isolats d'origine alimentaire; dans la même tendance, Fijałkowski et al. (2016) n'ont pas détecté le gène *tst* chez 75 souches de staphylocoques isolées à partir d'échantillons de viandes de type *Ready-To-Eat*.

En ce qui concerne les toxines d'exfoliatine, des études précédentes ont rapporté que des isolats de *S. aureus* produisaient l'un ou les deux types des exfoliatines (Hayakawa et al., 2000; Becker et al., 2003; Demir et al., 2011). Hayakawa et al. (1998) ont rapporté que l'exfoliatine ETA a été détectée seulement chez une souche parmi 166 (0,6%) isolée à partir de lait de tank et l'exfoliatine ETB n'a pas été détectée. Jarraud et al. (2001) n'ont pas détecté les deux gènes *eta* et *etb* chez 58 isolats de *S. aureus* responsables d'infections suppuratives.

Plusieurs auteurs ont signalé que les profils génétiques contenant un seul gène étaient les plus répandus avec la prédominance du génotype *sea* (Nashev et al., 2007; Zouharova et Rysanek., 2008; Rall et al., 2010). Pour les isolats d'origine alimentaire, nos résultats sont en accord avec les observations de Bianchi et al. (2013) et Pu et al. (2011) qui ont rapporté la prédominance du génotype *sed*. Néanmoins, la prédominance du génotype *tst* chez les isolats cliniques corrobore les résultats de Chiang et al. (2008).

Selon nos résultats, la combinaison des gènes codant diverses toxines chez une même souche est légèrement faible (quatre souches seulement). Le gène *tst* a été détecté en association avec les gènes codant les entérotoxines dans deux génotypes (*sed-seb-tst* et *sed-tst*). Des études précédentes ont rapporté que les de staphylocoques peuvent abriter le gène *tst* soit seul soit en combinaison avec d'autres gènes codant les entérotoxines (Backer et al., 2003; Chapaval et al., 2006; da Cunha et al., 2007; Chiang et al., 2008; Demir et al., 2011). Hwang et al., 2007 ont remarqué une combinaison du gène *tst* avec le gène *sec* mais pas avec les gène *sed* ou *seb*, ces auteurs ont suggéré qu'un élément génétique mobile peut porter le gène *tst* autre que l'élément SaPIbov précédemment découvert (Fitzgerald et al., 2001).

Les méthodes moléculaires comme la PCR sont des outils rapides et efficaces pour la détection des gènes codant les entérotoxines staphylococciques (Mehrotra et *al.*, 2000; Akimeden et *al.*, 2001; Blaiotta et *al.*, 2004; Chiang et *al.*, 2008). Néanmoins, l'utilisation de ces méthodes moléculaires ne permettent pas de confirmer la capacité des isolats à exprimer les gènes et produire les entérotoxines (Rodriguez et *al.*, 1996). Il est important de savoir que la production des entérotoxines au sein d'une matrice alimentaire dépend de divers facteurs comme : les nutriments, le pH, la compétition avec d'autres microorganismes, l'oxygène, l'humidité et la température (Blaiotta et *al.*, 2004; Gustafson et *al.*, 2015).

Dans une autre optique, *S. aureus* est l'espèce la plus souvent incriminée dans les toxi-infections alimentaires par la production des entérotoxines dans les produits alimentaires. Quoique, les isolats SCN sont souvent marginalisées et considérées comme des contaminants avec un potentiel pathogène faible ou modéré (Omoe et *al.*, 2003). Plusieurs études ont discuté le caractère entérotoxigène des isolats de SCN (da Cunha et *al.*, 2007; Zell et *al.*, 2008; Vasconcelos et *al.*, 2011; Batista et *al.*, 2013), et d'autres travaux précédentes ont suggérés que les SCN pourraient être impliquées dans des cas de toxi-infections alimentaires (Gemmell, 1987; Vernozy-Rozand et *al.*, 1996; Veras et *al.*, 2008; Rall et *al.*, 2010).

Les gènes codant les entérotoxines staphylococciques sont localisés dans le chromosome ou codés par des éléments génétiques mobiles comme les îlots de pathogénicité, les prophages et les plasmides (Balaban et Rasooly, 2000; Kuroda et *al.*, 2001), un transfert génétique horizontal peut se produire entre les isolats de staphylococciques (Le Loir et *al.*, 2003 ; Omoe et *al.*, 2005) conduisant à l'acquisition de la pathogénicité des *S. aureus* et SCN (Ławrynowicz-Paciorek et *al.*, 2007; Argudín et *al.*, 2010).

En industrie agro-alimentaire, les SCN atténuées de pouvoir pathogène sont utilisées comme cultures de démarrage pour la maturation de différents types de viandes et de produits laitiers (Hammes et Hertel 1998; Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001; Bockelmann, 2002; Place et *al.*, 2003). L'avantage de leur utilisation dans les viandes comprend, la réduction du nitrate en nitrite pour promouvoir le développement et la stabilité de la couleur rouge, la décomposition du peroxyde et la prévention du rancissement pour le maintien de la qualité sanitaire du produit. En outre, l'activité protéolytique et lipolytique des SCN contribuent au développement de la saveur dans

les viandes et les produits laitiers par la formation d'esters et d'autres composés aromatiques à partir des acides aminés (Talon et *al.*, 1998 ; Corbière Morot-Bizot, 2006). Cependant, le taux de SCN entérotoxigènes isolées souligne les risques potentiels pour les consommateurs en particulier quand des stratégies adéquates ne sont pas mises en place pour éviter la multiplication et la formation des entérotoxines dans les aliments (Miralles et *al.*, 1996).

La production des toxines par les souches de staphylocoques est un mécanisme complexe impliquant des gènes porteurs et des gènes promoteurs comme les gènes régulateurs de la virulence (e.g., *agr*, *sarA*, *rot* et *sigB*). Les gènes codant diverses toxines (entérotoxines, exfoliatines et la toxine TSST-1) pourraient être localisés sur des éléments génétiques mobiles; cela peut être considéré comme un support potentiel de transfert génétique ou de combinaison des gènes (Omoe et *al.*, 2005; Chiang et *al.*, 2008, Grumann et *al.*, 2014). Jarraud et *al.* (2001) suggèrent que la combinaison des gènes (entérotoxine et toxine TSST-1) chez une même souche de staphylocoque pourrait être expliquée par le fait que ces toxines partagent des structures et des propriétés communes et peuvent dériver d'un ancêtre commun.

Résultats partie 3 :**1. Sensibilité aux antibiotiques**

Les résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de l'ensemble des isolats de staphylocoques sont présentés dans le tableau V.8 et illustrés dans les figures V.8 et V.9. La distribution des taux de sensibilité aux antibiotiques des isolats alimentaires et cliniques selon la catégorie des échantillons sont présentés dans les tableaux V.9 et tableau V.10, respectivement. Les Profils de l'antibiorésistance des isolats alimentaires et cliniques sont présentés dans le tableau V.11.

Tableau V.8. Distribution des taux de sensibilité aux antibiotiques des isolats de staphylocoques d'origine alimentaire et clinique

| Antibiotiques | isolats alimentaires (n= 51) | | | | | | isolats cliniques (n=45) | | | | | | | | |
|---------------|------------------------------|--------|-------|--------------|-------|-------|----------------------------------|-------|-------|-----------------------------------|-------|-------|--------------|-------|-------|
| | | | | | | | isolats hospitalières (N =18) | | | isolats communautaires (N= 27) | | | | | |
| | <i>S. aureus</i> (n = 24) | | | SCN (n = 27) | | | <i>S. aureus</i> (n = 18) | | | <i>S. aureus</i> (n = 21) | | | SCN (n = 06) | | |
| | S (%) | R (%) | I (%) | S (%) | R (%) | I (%) | S (%) | R (%) | I (%) | S (%) | R (%) | I (%) | S (%) | R (%) | I (%) |
| P | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 88,89 | 11,11 | 0,00 | 5,56 | 94,44 | 0,00 | 9,52 | 90,48 | 0,00 | 50,00 | 50,00 | 0,00 |
| OX | 95,83 | 4,17 | 0,00 | 88,89 | 11,11 | 0,00 | 61,11 | 38,89 | 0,00 | 33,33 | 66,67 | 0,00 | 66,67 | 16,67 | 16,67 |
| FOX | 91,66 | 8,33 | 0,00 | 88,89 | 11,11 | 0,00 | 61,11 | 38,89 | 0,00 | 47,62 | 52,38 | 0,00 | 83,33 | 16,67 | 0,00 |
| AMC | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 96,30 | 3,70 | 0,00 | 94,44 | 5,56 | 0,00 | 80,95 | 19,05 | 0,00 | 83,33 | 16,67 | 0,00 |
| GM | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 94,44 | 0,00 | 5,56 | 85,71 | 14,29 | 0,00 | 83,33 | 16,67 | 0,00 |
| E | 79,17 | 12,50 | 8,33 | 66,67 | 18,52 | 14,81 | 72,22 | 27,78 | 0,00 | 47,62 | 52,38 | 0,00 | 66,67 | 16,67 | 16,67 |
| K | 54,17 | 12,50 | 33,33 | 74,07 | 7,41 | 18,52 | 66,67 | 27,78 | 5,56 | 85,71 | 14,29 | 0,00 | 83,33 | 16,67 | 0,00 |
| TE | 54,17 | 45,83 | 0,00 | 48,15 | 51,85 | 0,00 | 55,56 | 44,44 | 0,00 | 47,62 | 52,38 | 0,00 | 50,00 | 50,00 | 0,00 |
| VA | 95,83 | 4,17 | 0,00 | 92,59 | 7,41 | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 |
| CL | 91,67 | 8,33 | 0,00 | 70,37 | 22,22 | 7,41 | 94,44 | 0,00 | 5,56 | 95,24 | 0,00 | 4,76 | 100,00 | 0,00 | 0,00 |
| RIF | 95,83 | 4,17 | 0,00 | 92,59 | 7,41 | 0,00 | 88,89 | 11,11 | 0,00 | 85,71 | 9,52 | 4,76 | 100,00 | 0,00 | 0,00 |
| STX | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 88,89 | 3,70 | 7,41 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 80,95 | 14,29 | 4,76 | 83,33 | 0,00 | 16,17 |

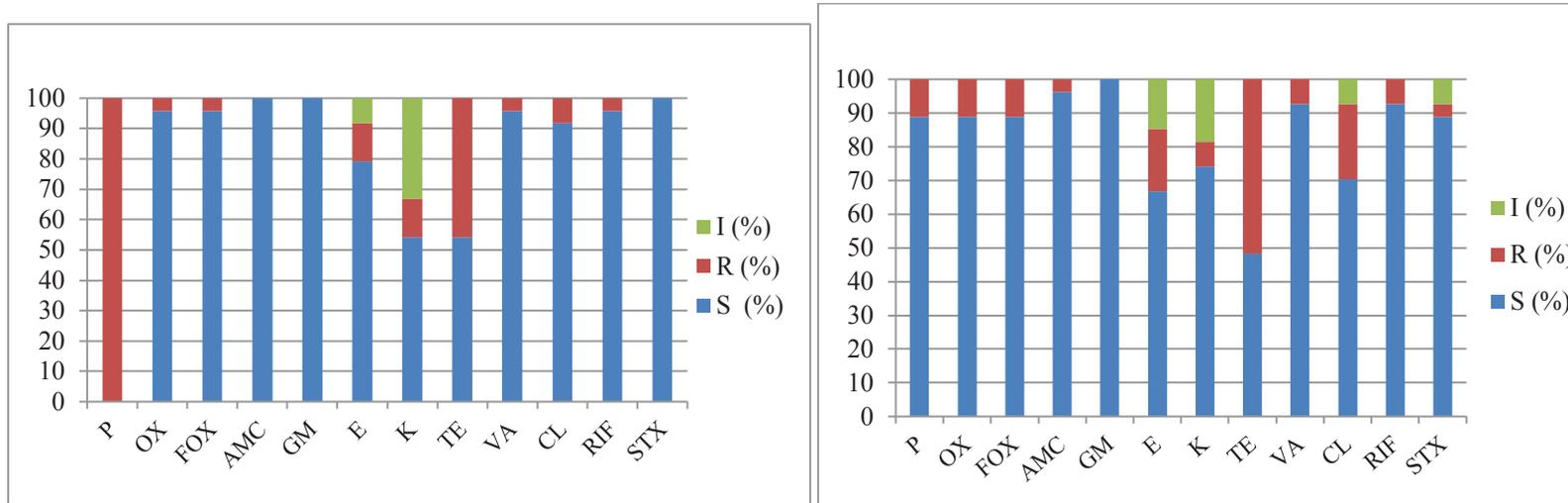


Figure V.8 : Distribution des taux de sensibilité aux antibiotiques des isolats de staphylocoques d'origine alimentaire

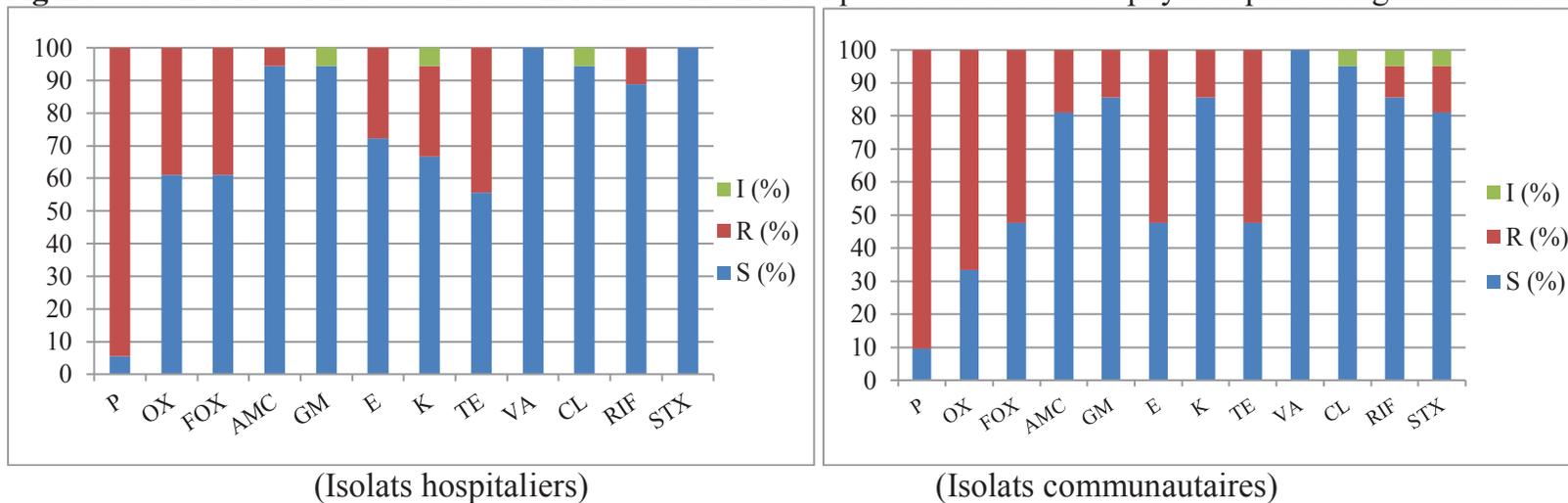


Figure V.9 : Distribution des taux de sensibilité aux antibiotiques des isolats de staphylocoques d'origine clinique

Tableau V.9 : Distribution des taux de résistance aux antibiotiques des isolats alimentaires selon la catégorie des échantillons.

| Antibiotique | isolats | Type d'aliment | | | | |
|--------------|-----------------|----------------|---------------|--------|------------|---------|
| | | Lait | Viande hachée | Poulet | Pâtisserie | Merguez |
| P | <i>S.aureus</i> | 10 | 8 | 2 | 2 | 2 |
| | SCN | 9 | 9 | 2 | 4 | - |
| OX | <i>S.aureus</i> | 1 | - | - | - | - |
| | SCN | - | - | 1 | 2 | - |
| FOX | <i>S.aureus</i> | 1 | 1 | - | - | - |
| | SCN | - | - | 1 | 2 | - |
| AMC | <i>S.aureus</i> | - | - | - | - | - |
| | SCN | - | - | - | 1 | - |
| GM | <i>S.aureus</i> | - | - | - | - | - |
| | SCN | - | - | - | - | - |
| E | <i>S.aureus</i> | 2 | - | 1 | - | - |
| | SCN | 1 | 1 | 2 | 1 | - |
| K | <i>S.aureus</i> | 2 | 1 | - | - | - |
| | SCN | 1 | - | 1 | - | - |
| TE | <i>S.aureus</i> | 7 | 2 | 2 | - | - |
| | SCN | 6 | 5 | 1 | 2 | - |
| VA | <i>S.aureus</i> | 1 | - | - | - | - |
| | SCN | - | 2 | - | - | - |
| CL | <i>S.aureus</i> | 1 | - | 1 | - | - |
| | SCN | 2 | 1 | 2 | 1 | - |
| RIF | <i>S.aureus</i> | 1 | - | - | - | - |
| | SCN | - | 1 | 1 | - | - |
| STX | <i>S.aureus</i> | - | - | - | - | - |
| | SCN | - | 1 | - | - | - |

Tableau V.10: Distribution des taux de résistance aux antibiotiques des isolats cliniques selon la catégorie des échantillons.

| ATB | isolats | Cathéter | hémoculture | Liquide synoviale | Sperme | Lèvre inférieure | Fracture | Pus | Sonde urinaire | Urine | Prélèvement de gorge | Plaie chirurgicale | Décharge vaginale |
|-----|----------------|----------|-------------|----------------------|--------|---------------------|----------|-----|-------------------|-------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| P | Hospitalières | 1 | 1 | - | - | 1 | 1 | 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Communautaires | - | - | - | 5 | - | - | 8 | - | 5 | - | - | 1 |
| OX | Hospitalières | 1 | - | - | - | - | - | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | - |
| | Communautaires | - | - | - | 3 | - | - | 6 | - | 4 | - | - | 1 |
| FOX | Hospitalières | 1 | - | - | - | - | - | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | - |
| | Communautaires | - | - | - | 1 | - | - | 5 | - | 4 | - | - | 1 |
| AMC | Hospitalières | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| | Communautaires | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - | 1 | - | - | 1 |
| GM | Hospitalières | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Communautaires | - | - | 1 | 6 | - | - | 8 | - | 5 | - | - | 1 |
| E | Hospitalières | 1 | - | - | - | - | - | 3 | - | 1 | - | - | - |
| | Communautaires | - | - | - | 4 | - | - | 2 | - | 4 | - | - | 1 |
| K | Hospitalières | 1 | - | - | - | - | 1 | 1 | - | 1 | - | 1 | - |
| | Communautaires | - | - | - | 4 | - | - | 3 | - | 4 | - | - | 1 |
| TE | Hospitalières | 1 | - | - | - | - | 1 | 4 | - | 1 | - | 1 | - |
| | Communautaires | - | - | - | 4 | - | - | 3 | - | 3 | - | - | - |
| VA | Hospitalières | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Communautaires | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| CL | Hospitalières | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Communautaires | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| RIF | Hospitalières | - | - | - | - | - | - | 1 | - | 1 | - | - | - |
| | Communautaires | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 |
| STX | Hospitalières | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Communautaires | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 |

Tableau V.11 : Profils de l'antibiorésistance des isolats alimentaires et cliniques

| profil de résistance | isolats alimentaires (N= 51) | | isolats cliniques (N=45) | | |
|--------------------------------|------------------------------|--------------|---|--------------------------------|--------------|
| | <i>S. aureus</i> (n = 24) | SCN (n = 27) | isolats hospitaliers (<i>S.aureus</i> n =18) | isolats communautaires (n= 27) | |
| | | | | <i>S. aureus</i> (n = 21) | SCN (n = 06) |
| P | 12 | 8 | 7 | 2 | - |
| P.K | 1 | - | - | - | - |
| P.TE | 5 | 7 | - | - | - |
| K.TE | 2 | - | - | - | - |
| P.E.TE | 1 | - | 2 | - | 1 |
| P.FOX.TE | 1 | - | - | - | - |
| P.OX.FOX.CL.VA.E.RIF.TE | 1 | - | - | - | - |
| P.VA | - | 2 | - | - | - |
| TE | - | 1 | - | - | 1 |
| P.CL.E.TE | 1 | 1 | - | - | - |
| P.OX.FOX.AMC.CL.E.RIF.TE | - | 1 | - | - | - |
| CL.SXT.E.RIF.TE | - | 1 | - | - | - |
| P.K.CL.E.TE | - | 1 | - | - | - |
| P.OX.FOX.CL.E | - | 1 | - | - | - |
| P.K.TE | - | 1 | - | 2 | 1 |
| P.OX.FOX | - | 1 | 3 | 1 | - |
| P.CL.TE | - | 1 | - | - | - |
| P.OX.FOX.TE | - | - | 1 | - | - |
| P.K.TE | - | - | 1 | - | - |
| P.OX.FOX.K.TE | - | - | 2 | 2 | - |
| P.OX.FOX.AMC.K.E.RIF.TE | - | - | 1 | - | - |
| E.RIF.TE | - | - | 1 | - | - |
| P.OX.E | - | - | - | 1 | - |
| P.OX.FOX.K.E.TE | - | - | - | 1 | - |
| P.OX.FOX.AMC.K.SXT.E | - | - | - | 1 | - |
| P.OX.FOX.AMC.K.GM.SXT.E.RIF | - | - | - | 1 | - |
| P.OX.FOX.E.TE | - | - | - | 1 | - |
| P.K.E | - | - | - | 1 | - |
| P.OX.FOX.K.GM.TE | - | - | - | 1 | - |
| P.OX.FOX.AMC.K.GM.SXT.E.RIF.TE | - | - | - | 1 | - |
| P.OX.FOX.E | - | - | - | 1 | - |
| P.OX | - | - | - | 1 | - |
| P.OX.K.E.TE | - | - | - | 1 | - |
| P.OX.FOX.AMC.K.E | - | - | - | 1 | - |
| E.TE | - | - | - | 1 | - |
| GM | - | - | - | - | 1 |
| P.OX.FOX.AMC | - | - | - | - | 1 |

Concernant les isolats alimentaires, nos résultats révèlent que 49 (96,08%) étaient résistantes à au moins un antibiotique testé. Le taux de résistance à la pénicilline était le plus élevé 94,11% (24 *S. aureus* ; et 24 SCN), suivi par celui de la tétracycline avec un taux de 49,02% (11 *S. aureus* et 14 SCN).

Bien que la méthode de diffusion de disque sur gélose révélait que 4 isolats étaient résistantes à l'oxacilline (méthicilline) (un isolat *S.aureus* [4,17%] et trois isolats SCN [11,11%]); la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode E-test a permis de confirmer la résistance chez deux isolats seulement (un isolat SARM isolé de lait cru et l'autre SCN-RM isolé de produit de pâtisserie). La résistance à la vancomycine a été confirmée chez seulement un isolat de *S.aureus* provenant de lait cru (CMI>256µg), alors que les isolats SCN étaient tous sensibles à la vancomycine.

Les résultats montrent également un taux de résistance relativement élevé des isolats de *S. aureus* (12,5%) aux deux antibiotiques testés, à savoir l'érythromycine et la kanamycine. Par contre, aucune résistance n'a été observée pour les antibiotiques suivants: gentamicine, amoxicilline-acide clavulanique, et triméthoprime-sulfaméthoxazole.

Les *S.aureus* isolées des échantillons de merguez et des produits de pâtisserie étaient résistants uniquement à la pénicilline (Tableau V.9). Les autres isolats alimentaires (lait, viandes hachées, poulet) présentent une résistance à divers antibiotiques. La résistance combinée à la pénicilline et à la tétracycline a été notée chez les staphylocoques isolées à partir des échantillons de lait et de poulet (Tableau V.9).

Chez les isolats d'origine clinique, le taux de résistance à la pénicilline était élevé (92,31% chez *S.aureus* et 50% chez SCN), de même pour la tétracycline (48,71% chez *S.aureus* et 50% chez SCN) (Tableau V.8).

Le taux de résistance de *S.aureus* à l'oxacilline (SARM) était de 38,89% et 52,38% pour les isolats hospitalières et communautaires respectivement. Ces SARMs ont été principalement isolées à partir de prélèvements de pus et d'urine (Tableau V.10). En revanche, lorsque l'on considère les résultats de la résistance obtenus avec la méthode E-test (CMI), ces taux ne dépassent pas des valeurs de 11,11% et 23,80%. Les SARMs isolées des échantillons de pus et des urines (origine communautaire) ont des valeurs de CMI>256µg et les SARMs isolées des infections de la gorge et des urines (origine hospitalière) ont présenté des CMI>256µg.

Notre étude montre également que le taux de résistance à l'érythromycine est relativement élevé chez les isolats de *S. aureus* (52,38% et 27,78% pour les isolats communautaires et hospitaliers, respectivement). Alors que toutes les isolats de *S. aureus* d'origine hospitalière étaient sensibles à la gentamicine et celles isolées des infections communautaires présentaient une résistance de l'ordre de 14,29 %. La vancomycine était active contre la totalité des isolats d'origine clinique.

A l'issue de notre investigation, 37 profils de résistance aux divers antibiotiques testés ont été observés : 17 profils pour les isolats alimentaires et 25 pour les isolats cliniques (Tableau V.11). L'analyse de l'ensemble des isolats a révélé la prédominance des profils regroupant une résistance à deux antibiotiques ou plus (34 profils) où la résistance simultanée à la pénicilline et à la tétracycline a été observée dans 19 profils. Le profil [P] regroupe le nombre le plus élevé des isolats alimentaires et cliniques (20 et 09 isolats, respectivement). Cinq profils de résistance identiques ont été détectés chez les isolats alimentaires et cliniques.

Selon nos résultats, la multirésistance (résistance simultanée à trois classes d'antibiotiques ou plus) est détectée chez 36 isolats regroupées dans 26 profils. Par ailleurs, 32 (22 profils) isolats ont présenté des résistances à plus de deux familles d'antibiotiques différentes.

Nous avons noté que 15 isolats parmi les 19 SARMs ont présenté des résistances à d'autres familles d'antibiotiques spécialement aux deux antibiotiques : tétracycline et l'érythromycine. De plus, il est important de signaler la résistance d'un isolat SARM d'origine alimentaire à la vancomycine. L'analyse de la multirésistance a montré que les isolats provenant principalement des échantillons de lait et de poulet ont présenté des résistances à trois familles d'antibiotiques différentes (Bêta-lactamines, tétracyclines et macrolides), la même constatation a été observée pour les isolats cliniques issus de cathéter, d'urine, de pus et de décharges vaginales.

2. Détection des gènes de résistance aux antibiotiques (PCR Simplex)

Les résultats de la PCR simplex pour la détection des gènes de résistances aux divers antibiotiques (méthicilline [*mecA*], gentamicine [*aacA-aphD*], érythromycine [*ermA*, *ermC*], tétracycline [*tetK*, *tetM*] et pénicilline [*blaZ*]) sont rapportés dans le tableau V.12 ; les bandes d'amplification des gènes sont présentés dans les figures V.10 et V.11.

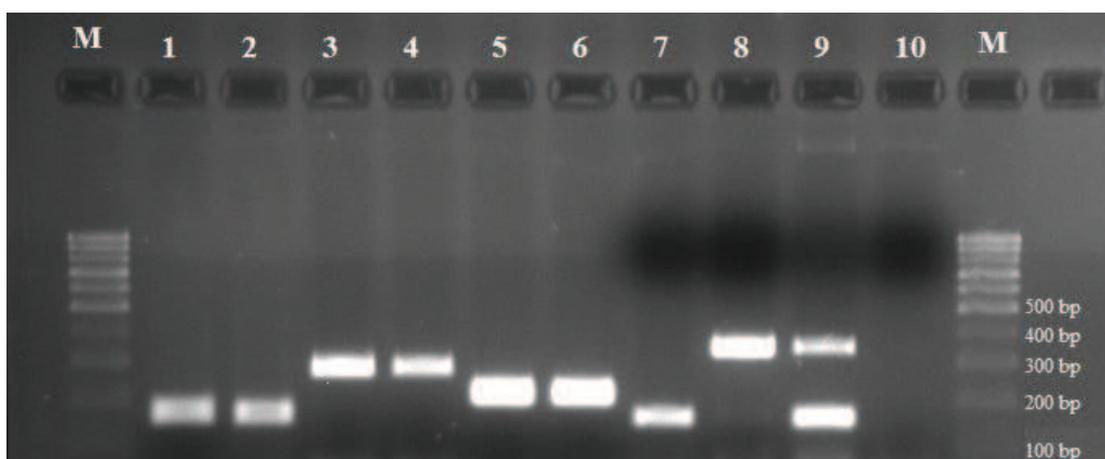


Figure V.10 : Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats de PCR des gènes de résistances aux antibiotiques (pénicilline, érythromycine, gentamicine, tétracycline) chez des isolats staphylocoques.

Voie M : marqueur de taille de l'ADN (échelle 100 pb), voie 1-2 : *blaZ*(173bp), voie 3-4: *ermC*(299bp), voie 5-6: *aacA-aphD*(227bp), voie 7: *tetM*(158bp), voie 8: *tetK*(360bp), voie 9: *tetK+tetM*, voie 10 : contrôle négative.

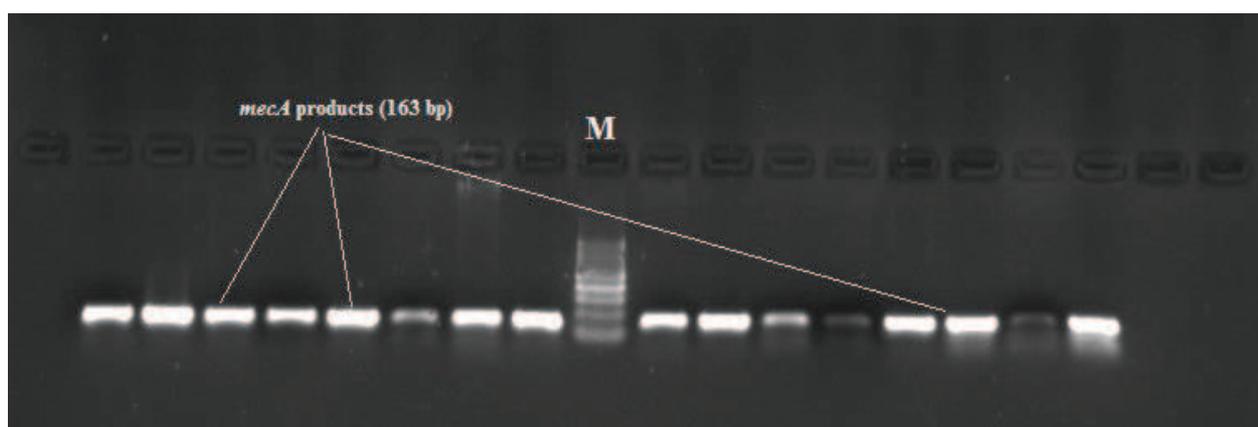


Figure V.11 : Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats de PCR du gène *mecA* (163bp) chez des isolats staphylocoques. Voie M : marqueur de taille de l'ADN (échelle 100 pb).

Tableau V.12 : Distribution des taux de détection des gènes de résistance aux antibiotiques (isolats alimentaires et cliniques)

| Antibiotique | Gènes | Isolats alimentaires (n=51) | | | Isolats cliniques (n=45) | | | P value |
|----------------------|------------------|-----------------------------|--------------|---------|------------------------------|-------------------------------|--------------|---------|
| | | <i>S. aureus</i> (n = 24) | SCN (n = 27) | P value | isolats hospitalières (n=18) | isolats communautaires (n=27) | | |
| | | | | | <i>S. aureus</i> (n = 18) | <i>S. aureus</i> (n = 21) | SCN (n = 06) | |
| <i>Tétracycline</i> | <i>tetM</i> | 19(79,16%) | 19(70,37%) | 0.344 | 10 (55,56%) | 17(80,95%) | 2(33,33%) | 0.162 |
| | <i>tetK</i> | 12(50,00%) | 5(18,52%) | 0.035 | 6(33,33%) | 11(52,38%) | 1(16,67%) | 0.333 |
| <i>Erythromycine</i> | <i>ermA</i> | 0(0,00%) | 0(0,00%) | ND | 0(0,00%) | 0(0,00%) | 0(0,00%) | ND |
| | <i>ermC</i> | 2(8,33%) | 1(3,70%) | 0.595 | 1(5,56%) | 5(23,81%) | 0(0,00%) | 0.189 |
| <i>Gentamicine</i> | <i>aacA-aphD</i> | 6(25,00%) | 3(11,11%) | 0.275 | 3(16,67%) | 9(42,86%) | 2(33,33%) | 0.095 |
| <i>Pénicilline</i> | <i>blaZ</i> | 12(50,00%) | 13(48,14%) | 1.000 | 6(33,33%) | 15(80,95%) | 2(33,33%) | 0.025 |
| <i>Méthicilline</i> | <i>mecA</i> | 12 (50,00%) | 13(48,14%) | 1.000 | 17(94,44%) | 19(90,48%) | 6(100%) | 1.000 |

Pour les isolats alimentaires, le support génétique codant la résistance à la tétracycline (gènes *tetM* et *tetK*) était majoritairement détecté. Les deux gènes *tetM* et *tetK* ont été détectés simultanément chez 11 isolats de *S. aureus* (45,83%) et 4 isolats de SCN (14,81%). Le gène *tetM* était fortement présent, indifféremment chez les isolats de *S.aureus* (79,16%) comme chez les SCN (70,37%). Alors que le gène *tetK* était significativement ($P=0.035$) plus présent chez les isolats de *S.aureus* (50%) en comparaison aux isolats de SCN (18,52%).

Le gène *mecA* codant la résistance à la méthicilline a été détecté chez 12(50,00%) et 13(48,14%) isolats de *S.aureus* et de SCN, respectivement. Le gène *aacA-aphD* codant pour la résistance à la gentamicine a été retrouvé chez 6(25%) isolats de *S.aureus* et 3(11,11%) isolats SCN. Alors que le gène *blaZ* qui porte la résistance à la pénicilline a été retrouvé chez presque la moitié des isolats testées : 12(50%) chez *S.aureus* et 13(48,14%) pour les SCN. Il faut noter que le taux des gènes susmentionnés ne présente aucune différence significative entre les isolats de *S.aureus* et les SCN ($P>0.05$).

En ce qui concerne les isolats d'origine clinique, la détection du gène *mecA* était élevée : (17/94,44%) pour les isolats hospitaliers et (19/90,48%) pour les isolats communautaires. Le taux de détection du gène *tekM* était aussi élevé chez les isolats de *S.aureus* 17(80,95%) communautaires. Les deux gènes *tekM* et *tetK* ont été détectés chez 25,64%(10/39) des isolats de *S. aureus* d'origine clinique.

Le gène *ermC* était porté par six (16,66 %) isolats de *S.aureus* alors que le gène *aacA-aphD* a été détecté chez 12(30,76%) isolats de *S.aureus*. Il est à noter que le taux de détection du gène *blaZ* était significativement plus élevé chez les isolats de *S.aureus* hospitaliers par rapport à celles d'origine communautaire : 15 (80,95 %) contre 6 (55,56) ($P=0.025$).

3. Corrélation entre résistance phénotypique et support génétique

Le tableau V.13 présente la comparaison des résultats de l'antibiorésistance phénotypique (pénicilline, méthicilline, gentamicine, érythromycine, tétracycline) obtenus par la méthode de diffusion du disque sur gélose avec les résultats obtenus par la PCR simplex (détection des gènes de résistance).

Tableau V.13 : Corrélation entre la résistance phénotypique (diffusion sur disque) et le support génétique (PCR) pour les isolats alimentaires et cliniques.

| Antibiotique | Isolats alimentaires (n=51) | | | | | | Isolats cliniques (<i>Staphylococcus aureus</i> n=39) | | | | | |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|--|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | <i>S. aureus</i> (n = 24) | | | SCN (n = 27) | | | Isolats hospitaliers (n=18) | | | isolats communautaires (n=27) | | |
| | Résistance phénotypique | détection des gènes | | Résistance phénotypique | détection des gènes | | Résistance phénotypique | détection des gènes | | Résistance phénotypique | détection des gènes | |
| | | chez les souches résistantes | chez les souches sensibles | | chez les souches résistantes | chez les souches sensibles | | chez les souches résistantes | chez les souches sensibles | | chez les souches résistantes | chez les souches sensibles |
| <i>Pénicilline</i> | 24 | 12 | 00 | 24 | 10 | 3 | 17 | 6 | 0 | 19 | 13 | 2 |
| <i>Méthicilline</i> | 1 | 00 | 12 | 3 | 1 | 12 | 7 | 7 | 10 | 14 | 13 | 6 |
| <i>Gentamicine</i> | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 3 | 1 | 8 |
| <i>Erythromycine</i> | 3 | 0 | 2 | 5 | 1 | 0 | 5 | 1 | 0 | 11 | 4 | 1 |
| <i>Tétracycline</i> | 11 | 8 <i>tetM</i> | 11 <i>tetM</i> | 14 | 10 <i>tetM</i> | 9 <i>tetM</i> | 8 | 4 <i>tetM</i> | 6 <i>tetM</i> | 10 | 9 <i>tetM</i> | 8 <i>tetM</i> |
| | 11 | 7 <i>tetK</i> | 5 <i>tetK</i> | 14 | 3 <i>tetK</i> | 2 <i>tetK</i> | 8 | 4 <i>tetK</i> | 2 <i>tetK</i> | 10 | 8 <i>tetK</i> | 3 <i>tetK</i> |

L'analyse des résultats montre que les taux de corrélation sont différents d'un antibiotique à un autre. Pour la pénicilline, 50% (12/24) des isolats alimentaires résistants portaient le gène *blaZ*. Alors que trois isolats de SCN trouvés sensibles phénotypiquement portaient le gène *blaZ*. Pour la méthicilline, 28 isolats de *S.aureus* sensibles phénotypiquement portaient le gène *mecA*. En revanche, 20 isolats de *S.aureus* résistants portaient le gène *mecA*, ce qui donne un taux de corrélation de 90,90%.

Pour la gentamicine, parmi les trois isolats de *S.aureus* résistants, seulement un isolat portait le gène *aacA-aphD*. Néanmoins, 17 isolats de *S.aureus* sensibles portaient le gène *aacA-aphD*. Pour l'érythromycine, parmi les 19 isolats phénotypiquement résistants, seulement 5 (26,31%) possédait le gène *ermC* et aucune isolats ne portait le gène *ermA*.

Nous avons noté également que parmi les 11 isolats de *S.aureus* d'origine alimentaire résistants à la tétracycline, 8(72,72%) et 7(63,63%) portaient respectivement les gènes *tetM* et *tetK*. Pour les isolats cliniques, la corrélation entre les résultats phénotypiques et ceux obtenus par PCR étaient de 72,22% et 66,66% pour les gènes *tetM* et *tetK*, respectivement.

Discussion partie 3 :

1. Résistance à l'oxacilline

Selon nos résultats, les isolats de *S.aureus* d'origine alimentaire montrent une faible résistance à l'oxacilline par rapport aux résultats rapportés par Gundogan et al. (2005) [67,5%], Pereira et al. (2009)[38%] et Guven et al. (2010)[17,3%]. Selon nos résultats, aucun isolat SARM n'a été détecté dans les échantillons de viandes et dérivés, le seul isolat SARM a été isolé à partir d'un échantillon de lait cru. Gundogan et al.(2005) et Pesavento et al. (2007) ont trouvé un taux élevé de SARM dans les échantillons de viandes (67,5% et 64,27% respectivement). Cependant, Guven et al. (2010) ont enregistré un taux de 41,66% de résistance à l'oxacilline chez des *S.aureus* isolés à partir de lait cru et un taux de 22,5% chez les souches isolées à partir d'échantillons de viande et dérivés. En Algérie, Akkou et al. (2015) et Chaalal et al. (2016) n'ont noté aucune résistance à l'oxacilline chez des isolats de *S.aureus* provenant du lait de mammites bovines et de lait cru destinés à la consommation humaine.

La caractérisation des SARM isolés à partir des denrées alimentaires d'origine animale ont fait l'objet de plusieurs études dans différents pays (de Boer et al., 2009 ; Pu et al., 2009;

Moon et *al.*, 2015) ; ces auteurs suggèrent que les SARMs isolés à partir de matrices alimentaires comme le lait, les viandes et ses dérivés sont issus des infections animales ou font suite à des contaminations par des manipulateurs lors des opérations de préparation (Moon et *al.*, 2015). La présence des SARMs d'origine animale chez l'homme est rare, mais il a été montré que ces isolats pouvaient être transmises des animaux à l'homme via la manipulation ou par la consommation des produits animaux ou d'origine animale (Verkade et Kluytmans, 2014). Malgré que la méthicilline soit un antibiotique non homologué pour l'utilisation vétérinaire contre les infections animales, la détection des SARMs dans quelques denrées alimentaires (lait cru) sa pourrai du à un passage des ces germes de homme (éleveurs, ouvriers) vers les animaux en causant des infections animales comme les mammites, en conséquence ces SARMs seront adapté aux animaux et sont qualifié comme des SARM lié au bétail. Il est possible aussi que ces SARMs soient passé des manipulateurs par voie de contamination vers les denrées alimentaires.

Le taux de résistance à l'oxacilline pour les isolats issus des échantillons cliniques est proche de celui rapporté par Antri et *al.* (2011) [44,80%], mais inférieur à celui rapporté par Alioua et *al.* (2014)[62,2%]. Dans ces deux études menées en Algérie, les auteurs ont signalé la prédominance des SARMs d'origine hospitalière (SARM-H) sur celles d'origine communautaire (SARM-C) (62% vs 38% et 92,4% vs 7,6% respectivement) ; cependant nos résultats étaient en discordance avec les résultats de ces études (38,89% vs 52,38%).

Dès leur découverte en 1960, les isolats de *S. aureus* résistants à la méthicilline étaient considérées comme des bactéries rebelles aux traitements par les antibiotiques surtout en milieu hospitalier (Vandenesch et *al.*, 2003); il est clair actuellement que les SARMs représentent un sérieux problème de santé publique suite à leur dissémination dans toute la communauté (Padmanabhan et Fraser, 2005).

La corrélation entre la résistance phénotypique et le portage génétique par le gène *mecA* a permis de constater que 4,17% et 46,15% des isolats de *S.aureus* d'origine alimentaire et clinique sont confirmées phénotypiquement comme étant des SARMs. A l'inverse, l'occurrence du portage du gène *mecA* était beaucoup plus élevée 50% et 92,30% chez des *S.aureus* d'origine alimentaire et clinique, respectivement. Pereira et *al.*(2009) ont noté que 38% des isolats de *S. aureus* d'origine alimentaire étaient résistants à l'oxacilline, mais seuls 0,68% (1/148) de ces isolats portaient le gène *mecA*. Zmantar et *al.*(2013) ont noté que le gène *mecA* était absent chez 20 SARMs isolées de patients hospitalisés.

Chez les staphylocoques, l'expression de la résistance à l'oxacilline (méthicilline) *in vitro* est souvent hétérogène (Chambers, 1997) ; car les méthodes couramment utilisées pour tester la résistance aux antibiotiques sont non seulement pas particulièrement précises mais aussi elles présentent une faible reproductibilité (Baron, 1995; Howden et Grayson, 2006). C'est pour cela, que dans les recommandations du CLSI, il est précisé que tout résultat intermédiaire ou présentant une discordance de résistance entre le disque de l'oxacilline et celui de la céfoxitine nécessite une confirmation par des tests de screening ou la détermination de la CMI (Shittu et Lin, 2006).

La difficulté d'interprétation des résultats phénotypiques peut être liée ou non à l'expression du gène *mecA*. Il est admis que l'expression du gène *mecA* serait liée à des facteurs externes (Martineau et *al.*, 2000) ou sous le dépendance d'un contrôle génétique par des éléments de régulation comme les gènes *mecI* et *mecRI* (Niemeyer et *al.*, 1996; Chambers, 1997). Des études ont suggéré que la résistance à la méthicilline chez les staphylocoques pourrait être codée par d'autres éléments génétiques autres que le gène *mecA* (Baron, 1995).

Plusieurs études ont rapporté la relation entre les SARMs et la résistance aux autres antibiotiques que ce soit dans les produits alimentaires (Pu et *al.*, 2011) ou dans les infections cliniques (Fluit et *al.*, 2001; Kim et *al.*, 2004; , Zinn et *al.*, 2004). Kesah et *al.* (2003) ont rapporté un taux élevé de SARMs multirésistantes dans les pays Africains comme le Maroc, Kenya, Nigeria et Cameroun. En Algérie, Kesah et *al.* (2003) et Borg et *al.* (2007) ont rapporté que la majorité des SARMs présentent une faible multirésistance aux autres antibiotiques. Dans notre étude, les isolats de *S. aureus* présentent une résistance simultanée aux antibiotiques, l'oxacilline et la tétracycline. Cette observation a été confirmée par la technique PCR où les résultats ont montré que plus de 66% et 44% des souches SARMs d'origine clinique étaient porteuses des gènes *tetM* et *tetK* codant pour la résistance à la tétracycline. La multirésistance des souches SARMs aux autres antibiotiques n'est pas surprenante en raison de leurs supports génétiques portés sur cassette chromosomiques staphylococciques ou sur d'autres déterminants de résistance supplémentaires comme les plasmides (Zhang et *al.*, 2005). Nos résultats suggèrent que le taux de résistance des *S.aureus* à la méthicilline et même l'acquisition des résistances à d'autres molécules d'antibiotiques à connu une augmentation durant la dernière décennie.

2. Résistance à la pénicilline

Dans la présente étude, nous avons observé que tous les isolats de *S.aureus* d'origine alimentaire étaient résistants à la pénicilline, ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Peles et al. (2007)[88,9%]; Moon et al. (2007)[90,2%] et Guven et al. (2010)[92,7%] ; mais ils sont supérieurs à ceux de Gundogan et al. (2005)[53,8%]; Pereira et al. (2009)[73%] et Aydin et al. (2011)[71,4%]. Pour les *S.aureus* isolés à partir des échantillons cliniques, la résistance à la pénicilline était également élevée (>90%), ce qui corrobore de nombreuses études réalisées antérieurement (Savas et al.,2005 [100%]; Goff et Dowzicky, 2007 [93,3]; Sina et al., 2013 [100%]).

Les pénicillines sont les premiers antibiotiques introduits pour le traitement des infections staphylococciques (Cohen, 1992), la résistance des staphylocoques à la pénicilline est due à l'enzyme β -lactamase (pénicillinase) qui inhibe l'antibiotique par hydrolyse de la liaison peptidique dans l'anneau β -lactame, cette enzyme est codée par le gène *blaZ* (Jensen et Lyon, 2009).

Dans notre étude, les isolats de *S. aureus* résistants à la pénicilline ne possédaient pas systématiquement le gène *blaZ* (50% et 52,78% pour les isolats alimentaires et cliniques, respectivement). Heveri et al.(2005) considèrent que la présence du gène *blaZ* n'engendre pas systématiquement la production de β -lactamase, car des mutations dans les gènes régulateurs (gène antirépresseur *blaR1* et répresseur *blaI*) peuvent inactiver l'expression de la résistance à cet antibiotique. Ils ont également suggéré que l'absence de détection du gène *blaZ* chez des isolats de staphylocoques résistants à la pénicilline, pourrait s'expliquer par une mutation du site d'hybridation des amorces ; c'est pour cela que Takayama et al. (2018) ont recommandé que l'utilisation d'une seule amorce de PCR pouvait provoquer des résultats faussement positifs ou faussement négatifs en raison de polymorphismes dans la séquence du gène *blaZ* (y compris les régions d'hybridation des d'amorce PCR).

3. Résistance à la gentamicine

Dans notre étude, aucun isolat de *S.aureus* provenant des échantillons alimentaires n'a présenté de résistance à la gentamicine, plusieurs études ont indiqué que la résistance à la gentamicine était rarement observée chez les staphylocoques d'origine alimentaire (El-Ghodban et al., 2006 [00%]; Pereira et al., 2009 [3%]; Pu et al., 2011 [3,29%]).

Concernant les isolats de *S.aureus* d'origine clinique, le taux de résistance observé (7,70%) était beaucoup plus faible que ceux signalés par Savas et *al.*(2005)[71,8%] et Zarakolu *al.*(2009)[93%], mais similaire à celui rapporté en Algérie par Ramdani-Bougoussa et *al.* (2006)[7%]. Nos résultats montrent que toutes les isolats cliniques résistants à la gentamicine étaient d'origine communautaire; alors que Ramdani-Bougoussa et *al.* (2006) et Alioua et *al.* (2014) n'ont pas enregistré de résistance à la gentamicine pour les isolats de *S.aureus* d'origine communautaires, par rapport aux celles isolées en milieu hospitalier. De même, selon le rapport de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques publié périodiquement par l'institut pasteur d'Algérie, 1677 souches de *S.aureus* ont été isolées pendant l'année 2015, parmi les quelles, des taux de résistance à la gentamicine de 21,13% et 8,68% ont été enregistrés pour les isolats hospitaliers et communautaires, respectivement (ARRN, 2017).

Les aminoglycosides (gentamicine) sont utilisés (en particulier lorsque l'association est recommandée) pour traiter les infections à staphylocoques en milieu hospitalier ou communautaire (Gade et Qazi., 2014). En revanche, cet antibiotique est rarement utilisé dans le traitement des infections en médecine vétérinaire. L'utilisation abusive d'un même antibiotique pour la même pathologie, augmente l'acquisition de la résistance et réduit son efficacité. En Algérie, selon Akkou et *al.* (2015) et Saïdi et *al.*(2015), aucune résistance à la gentamicine n'a été détectée chez des isolats de *S.aureus* issus de lait des mammites bovines. Chaalal et *al.* (2016) n'ont pas enregistré de résistance à la gentamicine chez des isolats staphylocoques provenant de lait cru destiné à la consommation humaine.

Dans cette étude, un seul isolat de *S.aureus* d'origine clinique présentait une résistance phénotypique à la gentamicine, possédant le gène *aacA-aphD*. Martineau et *al.* (2000) et Strommenger et *al.* (2003) ont noté une bonne corrélation (100% et 53,33%, respectivement) entre la résistance phénotypique et le portage génétique de la résistance à la gentamicine. Le gène *aacA-aphD*, codant pour une enzyme bifonctionnelle (Schmitz et *al.*, 1999) confère une résistance croisée aux aminoglycosides comme la gentamycine, la tobramycine et la kanamycine (Torres et *al.*, 1996). Les résultats discordants entre la résistance phénotypique et le portage génétique suggèrent qu'il y avait des isolats possédant (ou n'exprimant pas) des gènes de résistance aux aminoglycosides autres que le gène *aacA-aphD*.

Dans la présente étude, il a été observé que le gène *aacA-aphD* était fortement détecté chez les isolats de staphylocoques d'origine clinique (31,11%) par rapport aux staphylocoques d'origine alimentaire (17,64%). Cette observation pourrait s'expliquer par l'utilisation courante de la gentamicine dans les infections staphylococciques humaines par rapport à la médecine vétérinaire où cet antibiotique n'est pas homologué sauf utilisation en informel.

4. Résistance à l'érythromycine

Dans notre étude, le taux de résistance à l'érythromycine pour les isolats de *S.aureus* d'origine alimentaire (12,50%) était légèrement supérieur à celui rapporté par Pereira et al. (2009) [5%], mais inférieur à ceux rapportés par Chao et al. (2007)[48,71%] et Guven et al.(2010)[58,6%]. Cependant, le taux de résistance enregistré chez les isolats de *S.aureus* d'origine clinique (41,02%) était relativement plus important que celui rapporté par Ramdani-Bouguessa et al. (2006) [25%]. Selon des constatations près des vétérinaires praticiens de la région d'étude, l'érythromycine est une molécule très efficace contre les infections animales, elle est souvent utilisée dans le traitement des infections suppuratives et les mammites. Dans cette étude, le taux faible de résistance observée dans les isolats de staphylocoques issus des denrées alimentaires d'origine animale pourrai expliquer par les même constatations suggérant que cette molécule est utilisée en deuxième intention de fait de leur prix relativement cher et leur élimination rapide avec un délai d'attente ne dépasse pas 48h par rapport aux autres molécules comme les tétracyclines.

Dans cette étude, aucun isolat de *S.aureus* d'origine clinique résistante à l'érythromycine ne possédait le gène *ermA*, cependant 4 isolats portaient le gène *ermC*. Ardic et al. (2005) ont signalé un taux élevé des gènes *ermA* et *ermC* chez les SARM isolées de patients hospitalisés. La corrélation entre les résultats de la résistance phénotypique à l'érythromycine et celle obtenue par PCR était inférieure à celle obtenue par Martineau et al. (2000) [98,5%] et Strommenger et al. (2003) [53,33%]. Zmantar et al.(2013) ont rapporté que 25 isolats étaient résistantes à l'érythromycine sans détection des gènes de résistance *ermA* et *ermC*.

La résistance aux macrolides chez *S. aureus* et les SCN est le résultat d'une modification de la cible ribosomale de l'antibiotique codée par les gènes *erm* [*ermA*, *ermB* et *ermC*] (Schmitz et al., 1999). Elle peut être due également à un mécanisme actif d'efflux de l'antibiotique codé par les gènes *msrA* et *msrB*. Il est possible que la résistance

phénotypique à l'érythromycine observée sans détection des gènes de résistance par la méthode PCR, fût associée à des éléments génétiques autres que les gènes de type *erm*. Lina et *al.* (1999) ont considéré que la distribution des gènes *erm* dans les isolats de staphylocoques dépendait du type d'isolat (coagulase positive ou négative) et du profil de résistance aux autres antibiotiques (méthicilline résistante ou sensible). Ces mêmes auteurs ont indiqué que le gène *ermC* était prédominant chez les isolats de *S.aureus* sensibles à la méthicilline plutôt que celles résistantes à la méthicilline. Dans notre étude, toutes les isolats de *S.aureus* possédant le gène *ermC* étaient résistantes à la méthicilline, ces variations peuvent être associées à une utilisation variable de l'érythromycine dans chaque pays.

5. Résistance à la tétracycline

Dans notre étude, le taux de résistance à la tétracycline pour les isolats de *S. aureus* d'origine alimentaire (45,83%) était plus élevé que celui signalé par Chao et *al.* (2007) [19,1%], Pesavento et *al.* (2007) [24,7%], Pereira et *al.* (2009)[1%] et Aydin et *al.* (2011)[15,6%]. Pour les isolats de *S.aureus* d'origine clinique, le taux de résistance enregistré (48,71%) était inférieur à ceux notés par Ramdani-Bougoussa et *al.* (2006)[73%]; et Sina et *al.* (2013)[60%]. Nos résultats montrent qu'il n'y a aucune différence significative entre le taux de résistance à la tétracycline observé chez les isolats alimentaires et celles d'origine clinique ; alors qu'El-Ghodban et *al.* (2006) ont rapporté un taux de résistance élevé chez les isolats alimentaires par rapport aux isolats cliniques.

La tétracycline a été préférentiellement choisie pour le traitement et la prophylaxie des infections chez les animaux d'élevage, en raison de son spectre large et son temps d'élimination retardé (Ardic et *al.*, 2005). En Algérie, les tétracyclines sont utilisées dans le domaine vétérinaire d'une façon intense et abusive, le taux élevé de résistance à la tétracycline dans les isolats de staphylocoques issus des matrices alimentaires telles que le lait et la viande, pourrait expliquer en partie nos résultats.

Le site d'action des tétracyclines est le ribosome bactérien empêchant la fixation de l'aminoacyl-ARNt entrant dans le site A du ribosome, ce qui bloque la synthèse protéique chez la bactérie. La résistance à la tétracycline chez *S. aureus* est liée soit à la modification du site de fixation (ribosome) codée par des déterminants génétiques *tetM* ou *tetO*, localisés sur des transposons chromosomiques bactériens (Schwarz et *al.*, 1998), soit par

des mécanismes d'efflux, rejetant l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie, assuré par des protéines transmembranaires appelées pompes d'efflux. Ce dernier mécanisme est codé par les gènes *tetK* et *tetL* portés par des plasmides (Schmitz et al., 2001). Dans cette étude, il est possible que des gènes codant la résistance à la tétracycline autres que les gènes *tetK* et *tetM* soient responsables des cas de résistances phénotypiques observés dans les isolats de staphylocoques.

Dans cette étude, 25 et 10 isolats de *S. aureus* sensibles à la tétracycline portaient les gènes *tetM* et *tetK*, respectivement. Selon les recommandations du CLSI, certains isolats de staphylocoques portant le gène *tetM* seraient considérés comme moyennement sensibles à la tétracycline par la méthode de diffusion du disque (NCCLS, 1997).

6. Résistance à la vancomycine

Tous les isolats de staphylocoques d'origine cliniques étaient sensibles à la vancomycine. Par contre trois isolats de *S. aureus* d'origine alimentaire sont révélés résistants à la vancomycine par la méthode de diffusion de disque sur gélose où un isolat de *S. aureus* a été confirmé comme SARV par la méthode de l'E-test.

La résistance des staphylocoques à la vancomycine a été découverte pour la première fois en 1997 au Japon (Hiramatsu et al., 1997). Plus tard, la résistance à la vancomycine et aux autres glycopeptides a été observée dans différentes régions de monde (Normanno et al., 2007; Guven et al., 2010; Aydin et al., 2011; McGuinness et al., 2017). Plusieurs auteurs ont confirmé que la vancomycine était l'agent antimicrobien le plus efficace contre *S. aureus*, en particulier pour les SARMs (Kesah et al., 2009, Al-Zoubi et al., 2015). Dans une étude réalisée en Algérie par Rebiahi et al. (2011), trois isolats (3/165, 1,8%) de *S. aureus* sont avérés résistants à la vancomycine.

7. Antibiorésistance des staphylocoques à coagulase négative (SCN)

Les taux de résistance les plus élevés ont été observés pour la tétracycline et l'érythromycine (51,51% et 18,18%, respectivement). De plus, 11,11% des SCN isolés à partir d'échantillons alimentaires ont été confirmés résistants à la méthicilline (SCN-RM). Le taux de détection du gène *mecA* chez les isolats SCN (48,14%) était inférieur à celui noté par Martineau et al. (2000) pour les isolats de *S. epidermidis* (79,3%).

Parmi les gènes *tet* codant les mécanismes d'efflux chez les staphylocoques, certains auteurs ont suggéré que le gène *tetK* est fréquemment retrouvé chez *S. aureus* par rapport aux SCN (Trzcinski et al., 2000), dans la présente étude, le gène *tetM* a été majoritairement détecté chez les isolats de *S. aureus* et même chez les SCN (Tableau V.12).

Pour tous les isolats SCN, le gène *ermA* était totalement absent, le gène *ermC* a été détecté chez une seule souche de SCN. Eady et al. (1993) et Martineau et al. (2000) ont observé que 5,9% des SCN et 4,8% de isolats de *S. epidermidis* possédaient le gène *ermA*. Aktas et al. (2007) ont rapporté que 78,2% des isolats SCN portaient le gène *ermC* et 8,9% possédaient le gène *ermA*. Cetin et al. (2010) ont également constaté que 30% et 17% des SCN possédaient le gène *ermC* et *ermA*, respectivement.

Podkowik et al.(2012) ont signalé que les SCN constituaient un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. Luthje et Schwarz (2006) ont rapporté que les SCN étaient des réservoirs de gènes de résistances aux macrolides. Le transfert de gènes de résistance entre les isolats SCN et *S. aureus* est possible dans le cas où les espèces de staphylocoques cohabitent dans le même environnement humain ou animal (Udo et al., 1997).

Discussion générale

Les toxi-infections staphylococciques sont des causes majeures des maladies d'origine alimentaire en raison de la présence de nombreux isolats de *S. aureus* entérotoxinogènes. En parallèle, l'émergence des isolats résistants aux antibiotiques couramment utilisés dans les protocoles thérapeutiques de nombreuses infections humaines et animales est devenue une problématique préoccupante de santé publique.

Dans notre étude, la prévalence globale de *S. aureus* enregistrée dans les échantillons alimentaires était de 21,42% avec un taux significativement plus élevé dans les produits laitiers (41,67%) et la viande hachée (33,33%) (Tableau V.4).

Des produits alimentaires comme le lait, les produits laitiers et les viandes, particulièrement celles qui subissent des manipulations humaines sont fréquemment contaminées par des isolats entérotoxinogènes de *S. aureus*, ces isolats jouent un rôle important dans l'apparition de cas de toxi-infections alimentaires (De Buyser et al., 2001; Normanno et al., 2005; Normono et al., 2007).

Dans le contexte de la sécurité alimentaire, le taux de contamination des aliments par les staphylocoques et la détection de plusieurs gènes d'entérotoxines dans ces mêmes échantillons, mettent en évidence le risque potentiel d'apparition de cas toxi-infections alimentaires. Aussi le statut Algérien des staphylocoques résistants aux antibiotiques est inquiétant, que se soit en médecine humaine ou en santé animale. En fait l'utilisation abusive des antibiotiques en médecine vétérinaire, avec l'absence des analyses de laboratoires comme l'antibiogramme obligent les vétérinaires à procéder à des diagnostics par élimination en choisissant des molécules d'antibiotiques de large spectre et d'une façon non raisonné. En médecine humaine l'automédication aggrave la situation et limite le choix thérapeutiques

Dans la présente étude, des isolats de staphylocoques résistants aux antibiotiques portant simultanément plusieurs gènes codants des entérotoxines, en particulier de SARMs est aussi inquiétante. Parmi les isolats de *S. aureus* d'origine alimentaire qualifiés comme SARM, un isolat possédait le gène *see* et pour les SARM d'origine clinique, quatre isolats portaient le gène *tst*. Les deux isolats d'origine alimentaire portant le gène *sea* codant l'entérotoxine SEA (habituellement impliquée dans les toxi-infections alimentaires) sont résistantes à la pénicilline et à la tétracycline. Il convient de noter que le profil *sed-tst* a été observé chez un isolat multirésistant. Les isolats résistants aux antibiotiques peuvent être transmises à l'homme par la consommation de produits alimentaires contenant des bactéries résistantes et multi-résistantes (Pereira et al.,2009). Pour cet effet, l'utilisation massive des antibiotiques en élevage, en particulier ceux communément utilisés en thérapeutique des maladies humaines doit être minimisé.

Conclusion et recommandations

Les objectifs tracés pour cette étude étaient l'évaluation de la contamination de quelques denrées alimentaires par les staphylocoques d'une part, et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des isolats d'une autre part. Ce travail constitue aussi une première investigation dans l'exploration des gènes codants les entérotoxines staphylococciques chez des isolats de *S. aureus* et d'autres staphylocoques à coagulase négative dans la région d'étude. Les objectifs visés dans cette étude ont été atteints, des résultats ont été obtenus, interprétés et publiés sous forme des articles de recherche.

A la lumière de résultats découlant de la présente étude, il s'avère que les matrices alimentaires soumises à l'analyse sont fréquemment contaminées par des staphylocoques à coagulase positive (SCP) avec un taux de 26,78% (30/112), parmi lesquelles 24 échantillons sont jugés comme non satisfaisants et présentant un risque potentiel pour les consommateurs. Parmi les trente (30) souches de SCP isolées, 24 ont été identifiées comme *Staphylococcus aureus*, ce qui confirme l'importance de cette espèce comme pathogène majeur au sein de groupe des SCP.

Parallèlement, l'investigation moléculaire qui a porté sur la détection des gènes codant les entérotoxines staphylococciques a montré que 27(52,94%) isolats alimentaires portaient au moins un gène codant pour les entérotoxines staphylococciques (*sea* à *see*), majoritairement dominé par le gène *sed* (70,37%). Seulement six (6/13,33%) isolats de *S.aureus* d'origine clinique possédaient un ou plusieurs gènes codant pour les entérotoxines staphylococciques. Ces résultats ne sont pas surprenants du fait que la croissance et/ou la toxinogénèse sont sous la dépendance des différents facteurs nutritionnels et des conditions physico-chimiques qui se trouvent réunis dans les produits alimentaires. Les résultats montrent l'absence du gène *tst* chez les isolats alimentaires, contrairement au taux élevé (55,55%) rencontré chez les isolats d'origine clinique. Or, plusieurs isolats portaient simultanément des gènes codant les entérotoxines et le gène *tst* de la toxine TSST-1.

Staphylococcus aureus est l'espèce la plus souvent incriminée dans les toxi-infections alimentaires, cependant, nos résultats révèlent un taux particulièrement élevé de isolats de SCP possédant les gènes codant pour les entérotoxines, ce qui est très inquiétant en matière d'hygiène alimentaire et souligne les risques potentiels encourus pour le

consommateur, particulièrement en l'absence de méthodes de détection des entérotoxines dans les matrices alimentaires.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a révélé une résistance quasi-totale de *S. aureus* vis-à-vis de la pénicilline; le taux de SARM observé chez les isolats d'origine clinique est nettement plus élevé que chez les isolats d'origine alimentaire. La pression de sélection imposée par l'utilisation des antibiotiques semble jouer un rôle important à cet égard. Ainsi, la résistance aux antibiotiques tels que les β -lactames, tétracyclines, macrolides et les aminoglycosides, pourrait être justifiée par leur utilisation courante et d'une manière abusive depuis longtemps en médecine humaine et vétérinaire. La détection de la résistance à certains antibiotiques comme la vancomycine est très alarmant, car cette molécule est principalement réservée au traitement des infections chez l'homme et rarement ou pas du tout utilisé chez les animaux. L'analyse moléculaire par PCR a permis de confirmer la présence des gènes de résistance aux antibiotiques suivants : *mecA*, *aacA-aphD*, *ermC*, *tetK*, *tetM* et *blaZ*, avec des pourcentages variables, aussi, les taux de corrélation entre la résistance phénotypique et le support génétique sont différents d'un antibiotique à un autre.

Des nombreux gènes de résistance retrouvés dans *S. aureus* sont portés sur des éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides et les transposons, ce qui favorise la propagation de ces gènes de résistance à travers la souche, espèces, et même du genre. Dans ce contexte, *S. aureus* peut agir en tant que donneur et destinataire des gènes de résistance et jouer ainsi un rôle important dans la dissémination des gènes de résistance au sein des bactéries à Gram positif.

Au terme de notre travail, et au vu des résultats obtenus, nous pouvons souligner l'importance de la contamination des matrices alimentaires par les staphylocoques potentiellement entérotoxigènes, et nous mettons l'accent sur l'émergence de l'antibiorésistance chez les isolats que ce soit dans le secteur médical ou dans les produits alimentaires. Afin de limiter les risques liés aux staphylocoques, il est recommandé ce qui suit :

- En hygiène alimentaire : la maîtrise de la contamination des aliments par les staphylocoques doit passer par l'éducation des personnels en matière d'hygiène, le respect des procédures de lavage des mains, ainsi qu'une politique cohérente des bonnes pratiques d'hygiène dans les ateliers de préparation, distribution et vente de

produits alimentaires. Pratiquement, la coopération permanente entre scientifiques et législateurs est nécessaire pour un double objectif: révision périodique des textes réglementaires relatifs aux contrôles des aliments et la proposition de nouvelles instructions pour rendre la recherche des entérotoxines staphylococciques obligatoire dans les produits alimentaires jugés contaminés et non satisfaisants.

- En ce qui concerne l'antibiorésistance : les principales mesures devraient concerner la réduction de l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire au minimum nécessaire «tout en réduisant celles à large spectre», et prendre soigneusement en considération des approches alternatives pour prévenir et contrôler les infections bactériennes. Le recours aux analyses de laboratoires et l'antibiogramme avant toute prescription d'un antibiotique, pour cela, une coopération permanente entre cliniciens et microbiologistes s'avère plus que nécessaire.
- Autre, on peut affirmer qu'aucun remède miracle ne permet d'éviter l'émergence des souches de staphylocoques virulentes et résistantes aux antibiotiques, ce phénomène est enrayé par des « mesures simples » d'hygiène et d'éducation sanitaire.
- Finalement, d'autres investigations portant sur l'étude de la clonalité des isolats de staphylocoques d'origine alimentaire, humaine et animale sont fortement recommandées pour mieux caractériser les souches isolées et établir les liens épidémiologiques entre les isolats de staphylocoques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

1. AARN, Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, 16ème Rapport d'évaluation (De janvier à décembre 2015) Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, 2017. www.sante.dz/aarn.
2. Akineden Ö, Annemüller C, Hassan AA, Lammler C, Wolter W, Zschöck M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clin Diagn Lab Immunol;2001, 8(5):959-964.
3. Akkou M, Antri K, Bachtarzi MA, Bes M, Tristan A, Dauwalder O, Kaidi R, Meugnier H, Tazir M, Etienne J, Laurent F, Ramdani-Bouguessa N, Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis and nasal carriage of workers in contact to animals in Algeria. Pak Vet J;2016, 36(2):184-188.
4. Aktas Z, Aridogan A, Kayacan C, Aydin D. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul. Turkey J Microbiol;2007, 45(4):286-290.
5. Alioua M, Labid A, Amoura K, Bertine M, Gacemi-Kirane D, Dekhil M. Emergence of the European ST80 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of healthcare-associated infections in Eastern Algeria. Med Mal Infect;2014, 44(4):180-183.
6. Al-Zoubi M, Al-Tayyar I, Hussein E, Jabali A, Khudairat S. Antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in Northern area of Jordan. Iran J Microbiol;2015, 7(5):265-272.
7. Amagai M, Matsuyoshi N, Wang AH, Andl C, Stanley JR. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. Nat Med;2000, 6:1275-1277.
8. André MCDPB, Campos MRH, Borges LJ, Kipnis A, Pimenta FC, Serafini AB. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers. Raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsedfield gel electrophoresis following Smal digestion. Food Control;2008, 19:200-207.
9. Andrernont A. Définition de la multi-résistance bactérienne, prévalence et incidence des bactéries multi-résistantes, Impact écologique, communication des experts. Rean Urg ;1997, 6(2 bis):175-182.
10. Anonyme 1. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 6ème Edition, version ;2011, pp 162-163.
11. Anonyme 2. Opinion of the scientific on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. SCVPH plenary meeting; European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 2003.
12. Antri K, Rouzic N, Boubekri I, Dauwalder O, Beloufa A, Ziane H, Djennane F, Neggazi M, Benhabyles B, Bes M, Tazir M, Etienne J, Ramdani-Bouguessa N. Forte prévalence des infections communautaires et nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et portant le gène de la leucocidine de Panton-Valentine dans l'Algérois. J patbio;2010, 58:15-20.
13. Antri K, Rouzic N, Dauwalder O, Boubekri I, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Tazir M, Ramdani-Bouguessa N, Etienne J. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. Clin Microbiol Infect;2011, 17(4):526-532.
14. Araj GF, Atamian RB. Reliability of rapid kits for *Staphylococcus aureus* identification. Laboratory Medicine;1997, 28(2).

15. Arbuthnott JP, Coleman DC, de Azavedo JS. Staphylococcal toxins in human disease. Soc Appl Bacteriol Symp Ser; 1990, 19:101S-107S.
16. Ardic N, Ozyurt M, Sareyyupoglu B, Haznedaroglu T. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. Int J Antimicrob Agents;2005, 26(3):213-218.
17. Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins;2010, 2:1751-1773.
18. Aydin A, Muratoglu K, Sudagidan M, Bostan K, Okuklu B, Harsa S. Prevalence and antibiotic resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in Turkey. Foodborne Pathog Dis;2011, 8(1):63-69.

B

19. Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. J Bacteriol;2008, 190:300-310.
20. Baird-Parker AC, Davenport E. The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after storage of frozen or dried cells. J Appl Bacteriol;1965, 28(3):390-402.
21. Baird-Parker AC. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive Staphylococci. J Appl Bacteriol;1962, 25(1):12-19.
22. Baird-Parker AC. Isolation methods for microbiologists, edited by DA Shapton and GW Gould. SAB Technical Series No. 3. Academic Press, London;1969, pp. 1-8.
23. Baird-parker agar, Progress in Industrial Microbiology;2003, 37: pp. 400-403.
24. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol;2000, 61(1):1-10.
25. Baron E. Genetic aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods used for its detection in clinical laboratories in the United States. J Chemother;1995, 7 Suppl 3:87-92.
26. Barrett FF, McGehee RF, Finland M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. N Engl J Med;1968, 279:441-448.
27. Batista JEC, Ferreira EL, de Oliveira Nascimento DC, Ventura RF, de Oliveira WLM, Leal NC, Lima-Filho JV. Antimicrobial resistance and detection of the *mecA* gene besides enterotoxin-encoding genes among coagulase-negative Staphylococci isolated from clam meat of *Anomalocardia brasiliensis*. Foodborne Pathog Dis;2013, 10:1044-1049.
28. Bautista L, Gaya P, Medina M, Nunez M. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. Appl Environ Microbiol;1988, 54:566-569.
29. Bayles KW, Iandolo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. J Bacteriol;1989, 171:4799-4806.
30. Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. J Clin Microbiol;2003, 41:1434-1439.
31. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev;2014, 27:870-926.
32. Becker K, Keller B, von Eiff C, Bruck M, Lubritz G, Etienne J, Peters G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. Appl Environ Microbiol;2001, 67:5551-5557.
33. Benito D, Gómez P, Aspiroz C, Zarazaga M, Lozano C, Torres C. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock

- farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: a zoonotic case. *Enferm Infecc Microbiol Clin*;2016, 34(5):280-285.
34. Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* in the United States, 1998-2008. *Clin Infect Dis*;2013, 57:425-433.
 35. Bergdoll MS, Surgalla MJ, Dack GM. Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. *J Immunol*;1959, 83:334-338.
 36. Bergdoll MS. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*;1990, 105(2):91-100.
 37. Bergdoll MS. Monkey feeding test for staphylococcal enterotoxins. *Methods enzymol*;1988, 165:324-333.
 38. Bergdoll MS. Staphylococcal intoxications. In: Riemann H, Bryan FL. Foodborne infections and intoxications. Academic press New York;1979, pp.443-494.
 39. Bergdoll MS. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker Inc. Doyle MP (eds.). New York USA;1989, pp.463-523.
 40. Betley MJ, Mekalanos JJ. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*;1985, 229:185-187.
 41. Bianchi DM, Gallina S, Bellio A, Chiesa F, Civera T, Decastelli L. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. *Lett Appl Microbiol*;2013, 58:190-196.
 42. Bjerketorp J, Håkansson S, Belkin S, Jansson JK, Advances in preservation methods: keeping biosensor microorganisms alive and active. *Current Opinion in Biotechnology*;2006,17:43-49.
 43. Blaiotta G, Ercolini D, Pennacchia C, Fusco V, Casaburi A, Pepe O, Villani F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. Strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of *seG* and *sel* in *S. aureus* AB- 8802. *J Applied Microbiol*;2004, 97:719-730.
 44. Bloemendaal ALA, Brouwer EC, Fluit AC. Methicillin resistance Transfer from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a patient during antibiotic therapy. *PLoS One*;2010, 5:e11841.
 45. Bockelmann W, Hoppe-seyler T. The surface flora of bacterial smear- ripened cheeses from cow's and goat's milk. *Int Dairy J*;2001,11:307-314.
 46. Bockelmann W. Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. *Int Dairy J*;2002, 12: 123-131.
 47. Bounar-Kechih S, Taha Hamdi M, Aggad H, Meguenni N, Cantekin Z. Carriage Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Poultry and Cattle in Northern Algeria. *Vet Med Int*; 2018, 2018:4636121.
 48. Borg M, de Kraker M, Scicluna E, van de Sande-Bruinsma N, Tiemersma E, Monen J, Grundmann H. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother*;2007, 60(6):1310-1315.
 49. Bradley SF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Geriatr Med*;1992, 8:553-868.
 50. Breche P, Gaillard J, Simonet M. Collection de la biologie à la clinique. Bactériologie“ Bactéries des infections humaines” Flammarion Médecine-Sciences, Paris;1988, pp.267-277.
 51. Brown AF, Leech JM, Rogers TR, McLoughlin RM. *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Front Immunol*;2013, 4:1-20.

52. Brun Y, Bes M, Vandenesch F. *Staphylococcus*. In : Freney J. Renaud F. Bollet C. Leclercq R. Actualités permanentes en bactériologie clinique. ESKA editions Lyon ;2003, p.55.
53. Bryan F, Guzewich J, Todd E. Surveillance of foodborne disease II. Summary and presentation of descriptive data and epidemiologic patterns; their value and limitations. J Food Prot;1997, 60:567-578.
54. Bulger RJ. A methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*: clinical and laboratory experience. Ann Intern Med;1967, 67:81-89.
55. Byrne ME, Rouch DA, Skurray RA. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. Gene ;1989, 81(2):361-367.

C

56. Capurro A, Aspan A, Ericsson UH, Persson WK, Artursson K. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. J dairy sci;2010, 93(1):180-191.
57. Carfora V, Caprioli A, Marri N, Sagrafoli D, Boselli C, Giacinti G, Giangolini G, Sorbara L, Dottarelli S, Battisti A, Amatiste S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. Int Dairy J;2015,42:12-15.
58. Carré N, Sillam NF, Herbreteau JP, Dabas C, Ortmans C, Pinchon F, Vandenesch Coignard B. Colonisation nasale et infections cutanées à *Staphylococcus aureus* PVL : quel dépistage lors d'une épidémie en milieu scolaire ? Journées de veille sanitaire 2008 – Institut de veille sanitaire; 2008.
59. CA-SFM. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie ;2009, <http://www.sfm-microbiologie.org/>
60. CA-SFM. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie; recommandations. In. France; 2010.
61. Casewell MW. The nose: an underestimated source of *Staphylococcus aureus* causing wound infection. J Hosp Infect;1998, 40:S4-S11.
62. Catry B, Van Duijkeren E, Pomba MC, Greko C, Moreno MA, Pyoralá S, Ruzauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Ungemach F, Torneke K, Muñoz-Madero C, Torren-Edo J, Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM). Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. Epidemiol Infect ;2010, 138:626-644.
63. Cetin E, Gunes H, Kaya S, Aridogan B, Demirci M. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcal isolates in a Turkish university hospital. J Microbiol Immunol Infect;2010, 43(6):524-529.
64. Chaalal W, Aggad H, Zidane K, Saidi N, Kihal M. Antimicrobial susceptibility profiling of *Staphylococcus aureus* isolates from milk. Brit Microbiol Res J;2016, 13(3):1-7.
65. Chaalal W. Occurrence et profil de l'antibiorésistance de *Staphylococcus aureus* isolées de produits alimentaires. Mémoire de magister en microbiologie fondamentale et appliqué. Université d'Es-Senia Oran faculté des sciences. 2013.
66. Chambers H. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev;1997, 10(4):781-791.
67. Chambers HF. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. J Infect Dis;1999, 179:S353–S359.
68. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis ;2001, 7:178-182.

69. Chao G, Zhou X, Jiao X, Qian X, Xu L. Prevalence and antimicrobial resistance of foodborne pathogens isolated from food products in China. *Foodborne Pathog Dis*;2007, 4(3):277-284.
70. Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (*ent*) and toxic Shock syndrome toxin-1 gene (*tst*) in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. *Arq Inst Biol*;2006, 73(2):165-169.
71. Cheung A, Koomey J, Butler C, Projan S, Fischetti B. Regulation of exoprotein expression in *staphylococcus aureus* by A locus (*sar*) distinct from *agr* PNAS;1992, 89:6462-6466.
72. Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int J Food Microbiol*;2008, 121:66-73.
73. Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton–Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect*;2006, 12:29-34.
74. Choi Y, Kotzin B, Herson L, Callahan J, Marrack P, Kappler J. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;1989, 86:8941-8945.
75. CLSI (2013). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23 (ISBN 1-56238-866-5). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2013.
76. Cohen M. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science (New York, NY)*;1992, 257(5073):1050-1055.
77. Coleman DC, Sullivan DJ, Russell RJ, Arbuthnott JP, Carey BF, Pomeroy HM. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J Gen Microbiol*;1989, 135:1679-1697.
78. Collery MM, Smyth DS, Tumilty JJ, Twohig JM, Smyth CJ. Associations between enterotoxin gene cluster types *egc1*, *egc2* and *egc3*, *agr* types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*;2009, 58:13-25.
79. Corbiere Morot-Bizot S. les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. *Biochimie [q-bio.BM]*. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2006.
80. Corbière Morot-Bizat S, Leroy S, Talon R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry sausages. *Int J Food Microbiol* ;2006, 108(2):210-217.
81. Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *Br Med J*;2010, 340:c2096.
82. Couture B. Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris ;1990, pp.15-32.
83. Craven DE, Reed C, Kollisch N, DeMaria A, Lichtenberg D, Shen K, McCabe WR. A large outbreak of infections caused by a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to oxacillin and aminoglycosides. *Am J Med*;1981, 71:53-58.
84. Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramenti G, Moroni P, Castiglioni B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol Cell Probes*;2005, 19:299-305.

85. Crossley KB, Archer GL. The staphylococci in human disease, 1st edn. New York: Churchill Livingstone Inc ;1997.

D

86. Da Cunha M de LRS, Calsolari-Regina AO, Araújo-Júnior JP. Detection of Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Genes in *Staphylococcus*, with Emphasis on Coagulase-Negative Staphylococci. *Microbiol Immunol*;2007, 51(4):381-390.
87. Da Cunha M de LRS, Peresi E, Oliveira-Calsolari RA, Araújo-Júnior JP. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. *Braz J Microbiol*;2006, 37:70-74.
88. Dancer SJ, Noble WC. Nasal, axillary, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* among women: identification of strains producing epidermolytic toxin. *J Clin Pathol*;1991,44:681-684.
89. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*;2010, 74(3):417-433.
90. De Boer E, Zwartkruis-Nahuis J, Wit B, Huijsdens X, de Neeling A, Bosch T, van Oosterom R, Vila A, Heuvelink A. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol*;2009, 134(1-2):52-56.
91. De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V. Implication of milk and milk products in foodborne diseases in France and in different industrialized countries. *Int J Food Microbiol*;2001, 67:1-17.
92. Delmas G, Gallay A, Espié A, Haeghebaert S, Pihier N, Weill FX, De Valk H, Vaillant V, Désenclos JC. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *BEH* ;2006, 51-52:418-422.
93. Demir C, Aslantaş Ö, Duran N, Ocak, Özer B. Investigation of toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated in Mustafa Kemal University Hospital. *Turk J Med Sci*;2011, 41(2):343-352.
94. Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E, Quentin R. Bactériologie médicale: techniques usuelles, 3rd edition. Elsevier Masson Sas Edition, 2011.
95. Dennesen PJW, Bonten MJM, Weinstein RA. Multiresistant bacteria as a hospital epidemic problem. *Ann Med*;1998, 30:176-185.
96. Derzelle S, Dilasser F, Duquenne M, Deperrois V. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiol*;2009, 26:896-904.
97. Desmarchelier PM, Higgs GM, Mills L, Sullivan AM, Vanderlinde PB. Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australian abattoirs. *J of Food Microbiology*;1999, 47:221-229.
98. Devriese LA, Baele M, Vaneechoutte M. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramammary infections of dairy cows. *Vet Microbiol*;2002, 87:175-82.
99. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*;2000, 13:16-34.
100. Djoudi F, Bonura C, Benallaoua S, Touati A, Touati D, Aleo A, Cala C, Fasciana T, Mammina C. Panton-Valentine leukocidin positive sequence type 80 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a staphylococcal cassette chromosome *mec* type IVc is dominant in neonates and children in an Algiers hospital. *New Microbiol*;2013, 36:49-56.
101. Doyle ME, Hartmann FA, Lee Wong AC. Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply. *Anim Health Res Rev*;2012, 13:157-180.
102. Drougka E, Foka A, Koutinas CK, Jelastopulu E, Giornezis N, Farmaki O, Sarrou S, Anastassiou ED, Petinaki E, Spiliopoulou I. Interspecies spread of *Staphylococcus aureus*

clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece. *Prev Vet Med*;2016, 126(4):190-198.

103. Dubois D, Leyssene D, Chacornac J, Kostrzewa M, Schmit P, Talon R, Bonnet R, Delmas J. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*;2010, 48(3):941-945.
104. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown EL, Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol*;2001, 183:7341-7353.

E

105. Eady E, Ross J, Tipper J, Walters C, Cove J, Noble W. Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. *J Antimicrob Chemother*;1993, 31(2):211-217.
106. El-Ghodban A, Ghenghesh KS, Marialigeti K, Esahli H, Tawil A. PCR detection of toxic shock syndrome toxin of *Staphylococcus aureus* from Tripoli, Libya. *J Med Microbiol*;2006, 55:179-182.

F

107. Feßler A, Scott C, Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother*;2010, 65(4):619-625.
108. Fenollar F. «Les antibiotiques» cours on ligne sur les antibiotiques ; 2016, 04/05/2016 <http://www.aem2.org/wp-content/uploads/2011/05/AIH-04.05-11h12h.pdf>
109. Fijałkowski K, Peitler D, Karakulska J. Staphylococci isolated from ready-to-eat meat. Identification, antibiotic resistance and toxin gene profile. *Int J Food Microbiol*; 2016, 238:113-120.
110. Fitzgerald JR, Monday SR, Foster TJ, Bohach GA, Hartigan PJ, Meaney WJ, Smyth CJ. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol*; 2001,183:63-70.
111. Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ. Antibiotics and chemotherapy, 8th ed. Churchill Livingstone, London;2003.
112. Fitzgerald JR, Reid SD, Ruotsalainen E, Tripp TJ, Liu M, Cole R, Kuusela P, Schlievert PM, Järvinen A, Musser JM. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin-like family of proteins. *Infect Immun* ;2003, 71:2827-2838.
113. Fluit A, Wielders C, Verhoef J, Schmitz F. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *J Clin Microbiol*;2001, 39(10):3727-3732.
114. Fluit ADC, Visser MR, Schmitz F. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*;2001, 14:836–871.
115. Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev*;2008, 225:226-243.
116. Frazee BW, Lynn J, Charlebois ED, Lambert L, Lowery D, Perdreau-Remington F. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections. *Ann Emerg Med*;2005, 45:311-320.

G

117. Gade ND, Qazi MS. Recent trend of aminoglycoside resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in tertiary care hospital. *J Microbiol Antimicrob.* 2014;6(6):94-96.
118. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*;2011, 11(8):595-603.
119. Gaudy C, Buxeraud, J. « Antibiotiques pharmacologie et thérapeutiques », Elsevier/Masson SAS ;2005, p.21.
120. Gemmell CG. Exo-proteins of coagulase-negative Staphylococci as possible virulence factors. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg Abt 1 Suppl* ;1987, 16: 93-102.
121. Genigeorgis CA. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int J Food Microbiol*;1989, 9:327-360.
122. Gharsa H, Ben Slama K, Lozano C, Gómez-Sanz E, Klibi N, Ben Sallem R, Gómez P, Zarazaga M, Boudabous A, TorresB. Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia. *Vet Microbiol* ;2012, 156(3-4):367-373.
123. Gilmore KS, Gilmore MS, Sahn DF. Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*,. *In: Wax RG, Lewis K, Salyers AA, Taber H. Bacterial Resistance to Antimicrobials*, Second eds. CRC Press, Boca Raton; 2008, pp. 291-312.
124. Goff DA, Dowzicky MJ. Prevalence and regional variation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the USA and comparative *in vitro* activity of tigecycline, a glycolcycline antimicrobial. *J Med Microbiol*;2007, 56(Pt 9):1189-1193.
125. Gonzalez-Zorn B, Courvalin P. VanA-mediated high-level glycopeptide resistance in MRSA. *Lancet Infect Dis*;2003, 3:67-68.
126. Grøntvedt CA, Elstrom P, Stegger M, Skov RL, Skytt Andersen P, Larssen KW, Urdahl AM, Angen O, Larsen J, Amdal S, Lotvedt SM, Sunde M, Bjørnholt JV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in humans and pigs in Norway: a “One Health” perspective on introduction and transmission. *Clin Infect Dis*;2016, 63(11):1431-1438.
127. Grumann D, Nübel U, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* toxins. Their functions and genetics. *Infect Genet Evol*;2014, 21:583-592.
128. Guinan ME, Dan BB, Guidotti RJ. Vaginal colonization with *Staphylococcus aureus* in healthy women: a review of four studies. *Ann Intern Med*;1982,96:944-947.
129. Guiraud, J. P., 2003: Microbiologie alimentaire. Dunod.
130. Gundogan N, Citak S, Yucel N, Devran A. A note on the incidence and the antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. *Meat Sci*;2005, 69:807-810.
131. Gustafson JE., Muthaiyan A, Dupre JM, Ricke SC. *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review. *Food Control* 2015; 1-14.(in press)
132. Guven K, Mutlu M, Gulbandilar A, Cakir P. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in turkey. *Food Safet*;2010, 30(1):196-212.

H

133. Hamiroune M, Berber A, Boubekeur S. Contribution à l'étude de la contamination du lait bovin par les staphylocoques dans certaines fermes de la région d'Alger et son impact sur la santé humaine. *Rev sci tech Off int Epiz* ;2014, 33 (3):1-18.
134. Hammes WP, Hertel C. New developments in meat starter culture. *Meat sci*;1998, 49:125-138.
135. Harvey J, Gilmour A. *Staphylococcus aureus*. In: Batt CA , Patel PD. *Encyclopedia of Food*. Academic press, London;2000, pp.2066-2071.
136. Haveri M, Suominen S, Rantala L, Honkanen-Buzalski T, Pyorala S. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. *Vet Microbiol*;2005, 106(1-2):97-102.
137. Hayakawa Y, Hayashi M, Shimano T, Komae H, Takeuchi K, Endou M, Igarashi H, Hashimoto N And Takeuchi S. Production of Exfoliative Toxin A by *Staphylococcus aureus* isolated from Mastitic Cow's Milk and Farm Bulk Milk. *J Vet Med Sci*;1998, 60(11): 1281-1283.
138. Hayakawa Y, Akagi M, Hayashi M, Shimano T, Komae H, Funaki O, Kaidoh T, Takeuchi S. Antibody response to toxic shock syndrome toxin-1 of *Staphylococcus aureus* in dairy cows. *Vet Microbiol*;2000, 72:321-327.
139. Heikkila MP, Saris PE. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol*;2003, 95:471-478.
140. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev*;2012, 36:815–836.
141. Hennekinne JA, De Buyser ML. problèmes sanitaires liés à la présence de *S.aureus*. In : Le Loir Y, Gautier M (Eds), *Staphylococcus aureus*, Lavoisier, Paris ;2010, pp. 157-197.
142. Hennekinne JA, Kerouanton A, Brisabois A, De Buyser ML. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J Appl Microbiol*;2003, 94(2):321-329.
143. Herold BC, Irrnnergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, Leitch CD, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA*;1998, 279:593-598.
144. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycine. *Lancet* 1997;350:1670-1673.
145. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*;2001, 9:486–493.
146. Hiramatsu K. Molecular evolution of MRSA. *Microbiol Immunol*;1995, 39(8):531-543.
147. Hiramatsu K. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. *Am J Med*; 1998, 104(5A):7S-10S.
148. Howden BP, Davies K, Johnson PDR, Stinear TP, Lindsay Grayson M. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*;2010, 23(1):99-139.
149. Howden BP, Grayson ML. Dumb and dumber-the potential waste of a useful antistaphylococcal agent: emerging fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*;2006, 42(3):394-400.

150. Hu DL, Omoe K, Sasaki S, Yokomizo Y, Sashinami H, Sakuraba H, Shinagawa K, Nakane A. Vaccination with nontoxic TSST-1 protects *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis*;2003, 188:743-752.
151. Hu DL, Omoe K, Shimura, H, Ono K, Sugii S, Shinagawa K. Emesis in the shrew mouse (*Suncus murinus*) induced by peroral and intraperitoneal administration of staphylococcal enterotoxin A. *J Food Prot*;1999, 62:1350-1353.
152. Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, Koo HC, Jung WK, Kim JM, Park YH. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *Int J Food Microbiol*;2007, 117:99-105.

I

153. INSP. Situation épidémiologique de l'année 2015 sur la base des cas déclarés à l'INSP. Relevés Epidémiologiques Mensuels, Institut National de Santé Publique ;2015, Vol. XXVI.
154. InVS (2012). Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012. Institut de Veille Sanitaire (InVS); 2012.
155. IWG-SCC. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec): guidelines for report ing novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother*;2009, 53(12):4961-4967.
156. Isigidi BK, Devriese LA, Godard C, Van Hoof J. Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with meat products and meat workers. *Lett Appl Microbiol*;1990, 11:145-147.

J

157. Jablonski LM, Bohach GA. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food microbiology fundamentals and frontiers. America society of microbiology Press, Washington DC;2001, pp.411-434.
158. Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*;2006, 70:140-150.
159. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougél C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G. A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*;2001, 166:669-677.
160. Jensen SO, Lyon BR. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol* 2009; 4: 565-582.
161. JORA, 1999. Arrêté interministériel du 19 Jomada Ethania 1420 correspondant au 29 septembre 1999 fixant les règles de préparation et de mise à la consommation des viandes hachées à la demande, p.11. (N° JORA : 076 du 31-10-1999)
162. Joffin JN, Leyral G. Microbiologie technique Tome 1. Dictionnaire des techniques. CRDP AQUITAINE. Bordeaux;2006, pp.189-250.
163. JORADP: Journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire N35, Annexe I : critères microbiologiques relatifs à certaines denrées alimentaires, 27 mai 1998.
164. Jorgensen HJ, Mork T, Caugant DA, Kearns A, Rorvik LM. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. *Appl Environ Microbiol*;2005, 71:8352-8361.

180. Krakauer T, Vilcek J, Oppenheim JJ. Proinflammatory cytokines: TNF and IL-1 families, chemokines, TGF β and others. In: Fundamental Immunology, 4th ed.; Paul, W., Ed.; Lippincott-Raven: Philadelphia, PA, USA;1998, pp. 775-811.
181. Krakauer T. The induction of CC Chemokines in human peripheral blood mononuclear cells by staphylococcal exotoxins and its prevention by pentoxifylline. J Leukoc Biol;1999, 66:158-164.
182. Kralovic SM, Danko LH, Roselle GA. Laboratory reporting of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in United States Department of Veterans Affairs facilities. Emerg Infect Dis;2002, 8(4):402-407.
183. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet;2001, 357:1225-1240.

L

184. Lancette GA, Bennett RW. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th edition. American Public Health Association (APHA). Downes FP and Ito K (ed.). Washington, D.C. USA. 2001.
185. Lappin E, Ferguson AJ. Gram-positive toxic shock syndromes. Lancet Infect Dis;2009, 9:281-290.
186. Laurent F, Chardon H, Haenni M, Bes M, Reverdy ME, Madec JY, Lagier E, Vandenesch F, Tristan A. MRSA harboring *mecA* variant gene *mecC*, France. Emerg Infect Dis;2012, 18(9):1465-1467.
187. Ławrynowicz-Paciorek M, Kochman M, Piekarska K, Grochowska A, Windyga B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. Int J Food Microbiol;2007, 117:319-323.
188. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res;2003, 2:63-76.
189. Leclercq R, Bismuth R, pierre J. Sensibilité et résistance aux antibiotiques des staphylocoques à coagulase négative. Med Mal Infect (Hors-série) ;1990, 29-40.
190. Lee YT, Chou TD, Peng MY, Chang FY. Rapidly progressive necrotizing fasciitis caused by *Staphylococcus aureus*. J Microbiol Immunol Infect;2005, 38:361-364.
191. Lepelletier D, Lucet JC. Controlling methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: not simply methicillin-resistant *S. aureus* revisited. J Hosp Infect;2013, 84(1):13-21.
192. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol;2003, 95:38-43.
193. Li SJ, Hu DL, Maina EK, Shinagawa K, Omoe K, Nakane A. Superantigenic activity of toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzymes. J Appl Microbiol;2011, 110:729-736.
194. Licitra G. Etymologia, *Staphylococcus*. Emerg Infect Dis;2013, 19(9) :1553.
195. Lina CAA, Eliziani MK, Karina S, Marcia GS, Ary FJ, Ricardo R, Vera LMR. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. Food Control;2007, 18:630-634.

196. Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. J Infect Dis;2004, 189:2334-2336.
197. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F and Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and Streptogramins among staphylococci. Antimicrob Agents Chemother ;1999, 43(5):1062-1066.
198. Lina G, Cattoir V. « Les bactéries à Gram positives multirésistantes : probabilités de résistance ? Que craindre ? » Bull Acad Natle Méd ;2014, 198(3):427-438.
199. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol;1998, 29:527-543.
200. Lindsay JA, Holden MTG. *Staphylococcus aureus*: Superbug, super-genome. Trends Microbiol;2004, 12:378-385.
201. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol;2010, 300:98-103.
202. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections.N Engl J Med ;1998, 339:520-532.
203. Lüthje P, Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. J Antimicrob Chemother;2006, 57(5): 966-969.
204. Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*. Genet Basis Microbiol Rev;1987, 51(1):88-134.

M

205. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother;2002, 46:1147-1152.
206. MacGowan AP. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. J Antimicrob Chemother;2008, 62(2):105-114.
207. Madan AK, Raafat A, Hunt JP, Rentz D, Wahle MJ, Flint LM. Barrier precautions in trauma: is knowledge enough? J Trauma;2002, 52:540-543.
208. Maravic G. Macrolide resistance based on the Erm-mediated rRNA methylation. Curr Drug Targets Infect Disord;2004, 4:193-202.
209. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science;1990, 248:705-709.
210. Martin SE, Iandolo JJ. *Staphylococcus*. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press. Robinson RK, Batt CA and Patel PD (eds.);2000, pp. 2062- 2065.
211. Martineau F, Picard F, Lansac N, Menard C, Roy P, Ouellette M, Bergeron M. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother;2000, 44(2):231-238.
212. Mattsson E, Herwald H, Egsten A. Superantigen from *Staphylococcus aureus* induce procoagulant activity and monocyte tissue factor expression in whole blood and mononuclear cells via IL-1. J Thromb Haemost;2003, 1:2569-2575.
213. Mazzariol A, Lo Cascio G, Kocsis E, Maccacaro L, Fontana R, Cornaglia G. Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit. Eur J Clin Microbiol Inf Dis;2012, 31:523-527.
214. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu Rev Microbiol;2001, 55:77-104.

215. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med*; 2017,23;90(2):269-281
216. McKenzie T, Hoshino T, Tanaka T, Sueoka N. A revision of the nucleotide sequence and functional map of pUB110. *Plasmid*;1987,17(1):83-85.
217. Medhus A, Sletteveas J, Marstein L, Larssen K, Sunde M. MRSA with the novel *mecC* gene variant isolated from a cat suffering from chronic conjunctivitis. *J Antimicrob Chemother*;2013, 68(4):968-969.
218. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin-1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol*;2000, 38(3):1032-1035.
219. Miralles MC, Flores J, Perez-Martinez G. Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiol*;1996, 13(3):227-236.
220. Mitchel DH, Howden BP. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Intern Med J*;2005, 35 Suppl 2:S17-24.
221. Mitchell DT, Levitt DG, Schlievert PM, Ohlendorf DH. Structural evidence for the evolution of pyrogenic toxin superantigens. *J Mol Evol* ;2000, 51:520-531.
222. Monday SR, Bohach GA. Genes encoding staphylococcal enterotoxins G and I are linked and separated by DNA related to other staphylococcal enterotoxins. *J Nat Toxins*;2001, 10:1-8.
223. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, Chow H, Ip M, Jatzwauk L, Jonas D, Kadlec K, Kearns A, Laurent F, O'Brien FG, Pearson J, Ruppelt A, Schwarz S, Scicluna E, Slickers P, Tan HL, Weber S, Ehricht R. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*;2011, 6(4):e17936.
224. Monecke S, Ruppelt A, Wendlandt S, Schwarz S, Slickers P, Ehricht R, Jäckel SC. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from diseased poultry. *Vet Microbiol*;2012, 162(2-4):806-812.
225. Monnet DL. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its relationship to antimicrobial use: possible implications for control. *Infect Control Hosp Epidemiol*;1998, 19:552-559.
226. Moon D, Tamang M, Nam H, Jeong J, Jang G, Jung S, Park Y, Lim S. Identification of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Korea and molecular comparison between isolates from animal carcasses and slaughterhouse workers. *Foodborne Pathog Dis*;2015, 12(4):327-334.
227. Moon J, Lee A, Jaw S, Kang H, Joo Y, Park Y, Kim M, Koo H. Comparison of antibiogram, staphylococcal enterotoxin productivity, and coagulase genotypes among *Staphylococcus aureus* isolated from animal and vegetable sources in Korea. *J Food Prot*;2007, 70(11):2541-2548.
228. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med*;2006, 355:666-674.
229. Mossel DAA, Corry JEL, Struijk CB, Baird RM. Essentials of the microbiology of foods. In: A textbook for advanced studies. J Wiley and Sons, Chichester;1995, 146-150.
230. Mouffok F. Situation en matière de TIA en Algérie de 2010 à 2011. 2^{ème} congrès Maghrébin sur les TIA, Tunis le 14-15 décembre, 2011.
231. Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA, Kaufman CA, Yu VL. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med*;1993, 94:313-328.

232. Murray RJ. *Staphylococcus aureus* infective endocarditis: diagnosis and management guidelines. Intern Med J;2005, 35 Suppl 2:S25-44.

N

233. Naffa RG, Bdour SM, Migdadi HM, Shehabi AA. Enterotoxicity and genetic variation among clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Jordan. J Med Microbiol;2006, 55:183-187.
234. Nashev D, Toshkova K, Bizeva L, Akineden Ö, Lämmler C, Zschöck M. Distribution of enterotoxin genes among carriage- and infection-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett;2007, 45:681-685.
235. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests— Sixth Edition: Approved Standard M2-A6. NCCLS, Wayne, PA, 1997.
236. Nawaz MS, Khan SA, Khan AA, Khambaty FM, Cerniglia CE. Comparative molecular analysis of erythromycin-resistance determinants in staphylococcal isolates of poultry and human origin. Mol Cell Probes;2000, 14(5):311-319.
237. Nemati M, Hermans K, Lipinska U, Denis O, Deplano A. Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: First detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. Antimicrob Agents Chemother;2008, 52:3817-3819.
238. NF EN ISO 6888-1/A1: Microbiology of food and animal feeding stuffs -Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)-Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium; Geneva,Switzerland , 2003.
239. Ng JS, Holt DC, Lilliebridge RA, Stephens AJ, Huygens F, Tong SYC, Currie BJ, Giffard PM. A phylogenetically distinct *Staphylococcus aureus* lineage prevalent among Indigenous communities in Northern Australia. J Clin Microbiol;2009, 47:2295-2300.
240. Niemeyer D, Pucci M, Thanassi J, Sharma V, Archer G. Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol;1996, 178(18):5464-5471.
241. Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G, Di-Giannatale E, Salinetti AP, La-Salandra G, Bartoli M, Zuccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia NC, Celano GV. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. Int J Food Microbiol; 2005, 98:73-79.
242. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia N, Corrente M, Parisi A et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. Int J Food Microbiol;2007, 115(3):290-296.
243. Novick RP, Subedi A. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. Chem. Immunol. Allergy;2007, 93:42-57.

O

244. Omoe K, Hu DL, Ono HK, Shimizu S, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K, Imanishi K. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. Infect Immun ;2013, 81:3627-3631.
245. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagaw K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect Immun;2003, 71:6088-6094.

246. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. FEMS Microbiol Lett;2005, 246:191-198.
247. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shianagawa K. Detection *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S.aureus* isolates harbouring *seg*, *she* and *eri* genes. J Clin Microbiol;2002, 40:857-862.
248. OMS, manuel de sécurité biologique en laboratoire Troisième édition, Genève ; 2005.
249. Ono HK, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu DL, Kato H, Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. Infect Immun;2008, 76: 4999-5005.
250. Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DY, Gutierrez JA, Bohach GA, Schlievert PM. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. Infect Immun;2003, 71:2916-2919.
251. Orwin PM, Leung DY, Donahue HL, Novick RP, Schlievert PM. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. Infect Immun;2001, 69:360-366.
252. Orwin PM, Leung DY, Tripp TJ, Bohach GA, Earhart CA, Ohlendorf DH, Schlievert PM. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. Biochemistry ;2002, 41:14033-14040.
253. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*, the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol;2009, 7:555-567.
254. Ouchenane Z, Smati F, Rolain JM, Raoult D. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Algeria. Pathol Biol;2011, 59:129-132.

P

255. Padmanabhan R, Fraser T. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community. Cleve Clin J Med;2005, 72(3):235-241.
256. Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, Sicho WM, Bohach GA. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. Vet Microbiol;2011, 147:149-154.
257. Paterson GK, Larsen AR, Robb A, Edwards GE, Pennycott TW, Foster G, Mot D, Hermans K, BaertK, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA. The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of hostspecies. J Antimicrob Chemother;2012, 67(12):2809-2813.
258. Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, Keresztúri P, Kardos G, Turcsányi I, Béri B, Szabó A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. Int J Food Microbiol;2007, 118(2):186-193.
259. Pellerin JL, Gautier M, Le Loir Y. Identification de l'espèce au sein du genre In : Le Loire Y, Gautier M (Eds), *Staphylococcus aureus*, Lavoisier, Paris ;2010, pp.1-22.
260. Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiol;2009, 26(3):278-282.
261. Pesavento G, Ducci B, Comodo N, Nostro A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Food Control;2007, 18(3):196-200.

262. Place RB, Hiestand D, Gallmann HR, Teuber M. *Staphylococcus equorum* subsp. Linens, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. Syst Appl Microbiol;2003, 26(1):30-37.
263. Podkowik M, Bystron J, Bania J. Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food. Foodborne Pathog Dis. 2012;9(1):91-103.
264. Podkowik M, Bystron J, Bania J. Prevalence of antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from ready-to-eat meat products. Pol J Vet Sci ;2012, 15:233-237.
265. Podkowik M, Park JY, Seo KS, Bystron J, Bania J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. Int J Food Microbiol;2013, 163:34-40.
266. Poutrel B. Les staphylocoques et les streptocoques de mammites. In : Les groupes microbiens d'intérêt laitier. CEPIL, Paris ;1992, pp.415-453.
267. Prescott JF, Boggot JD, Walker RD. Antimicrobial Therapy, Third ed. Iowa State University Press / Ames, Danvers;2000.
268. Pu S, Han F, Ge B. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. Appl Environ Microbiol; 2009,75(1):265-267.
269. Pu S, Wang F, Ge B. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from Louisiana retail meats. Foodborne Pathog Dis;2011, 8(2):299-306.

R

270. Rahimi E. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. Braz J Microbiol;2013, 44(2):393-399.
271. Rall VLM, Sforcin JM, Augustini VCM, Watanabe MT, Fernandes Jr A, Rall R, Silva MG, Araújo-Júnior JP. Detection of enterotoxin genes of *staphylococcus sp* isolated from nasal cavities and hands of food handlers. Braz J Microbiol;2010, 41:59-65.
272. Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes Jr A, Candeias JMG, Cardoso KFG, Araújo-Júnior JP. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. Vet Microbiol ;2008, 132:408-413.
273. Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, Vandenesch F, Tazir M, Etienne J. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. Antimicrob Agents Chemother;2006, 50(3):1083-1085.
274. Rebiahi SA, Abdelouahid DE, Rahmoun M, Abdelali S, Azzaoui H. Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria). Med Mal Infect;2011, 41:646-651.
275. Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J Dairy Sci;1994, 77:3354-3364.
276. Roberson JR, Fox Lk, Hancock DD, Gay JM, Besser TE. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in Dairy Heifers at first parturition. J Dairy Sci;1998, 81:687-693.
277. Robert S, Chambers S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. Infect Med J;2005, 35 Suppl 2:S97-105.
278. Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiol. Rev;1996, 19(1):1-24.

279. Rodriguez M, Nunez F, Cordoba JJ, Bermudez E, Asensio MA. Gram-Positive, Catalase-Positive Cocci from Dry Cured Iberian Ham and Their Enterotoxigenic Potential. *Appl Environ Microbiol*;1996, 62(6):1897-1902.
280. Rosec JP, Guiraud JP, Dalet C, Richard N, Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int J Food Microbiol*;1997, 35:213-221.
281. Rosenbach AJ. Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. JF Bergmann Wiesbaden;1884, p. 18.
282. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol*;1990, 4(7):1207-1214.
283. Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol*;1992, 17:37-45.
284. Rouch DA, Byrne ME, Kong YC, Skurray RA. The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J Gen Microbiol* ;1987, 133(11):3039-3052.
285. Rowland SJ, Dyke KG. Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. *EMBOJ*;1989, 8 (9):2761-2773.

S

286. Saidi R, CantekIn Z, Khelef D, Ergün Y, Solmaz H, Kaidi R. Antibiotic susceptibility and molecular identification of antibiotic resistance genes of staphylococci isolated from bovine mastitis in Algeria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*;2015, 21(4):513-520.
287. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 1–V
288. Savas L, Duran N, Nlen Y, Savas N, Erayman M. Prospective Analysis of Antibiotic Susceptibility Patterns of MRSA in a Turkish University Hospital. *Turk J Med Sci*. 35 (2005) 323-327.
289. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United Statesmajor pathogens. *Emerg Infect Dis*;2011, 17:7-15.
290. Schelin J, Wallin-Carlquist N, CohnMT, Lindqvist R, Barker GC, Radstrom P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*;2011, 2:580-592.
291. Schlegelova J, Babak V, Klimova E, Lukasova J, NavratilovaP, Sustackova A, Sediva I, Rysanek D. Prevalence of and resistance to anti-microbial drugsin selected microbial species isolated from bulk milk samples. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*;2002, 49:216-225.
292. Schlegelova J, Napravnikova E, Dendis M, Horvath R, Benedik J, Babak V, Klimova E, Navratilova P, Sustackova A. Beef carcass contamination in a slaughterhouse and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates of selected microbial species. *Meat Sci*;2004, 66:557-565.
293. Schlievert PM, Jablonski LM, Roggiani M, Sadler I, Callantine S, Mitchell DT, Ohlendorf DH, Bohach.A. Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. *Infect Immun*;2000, 68:3630-3634.
294. Schmitz F, Fluit A, Gondolf M, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J, Heinz H, Jones M. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *J Antimicrob Chemother*;1999, 43(2):253-259.

295. Schmitz F, Krey A, Sadurski R, Verhoef J, Milatovic D, Fluit A. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother*;2001, 47(2):239-240.
296. Schmitz FJ, Petridou J, Milatovic D, Verhoef J, Fluit AC, Schwarz S. In vitro activity of new ketolides against macrolide-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* isolates with defined resistance gene status. *J Antimicrob Chemother*;2002, 49(3):580-582.
297. Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. SENTRY Participants Group. *J Antimicrob Chemother*;1999, 43:783-92.
298. Schnellmann C, Gerber V, Rossano A, Jaquier V, Panchaud Y, Doherr MG, Thomann A, Straub R, Perreten V. Presence of new *mecA* and *mph(C)* variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. *J Clin Microbiol*;2006, 44(12):4444-4454.
299. Schwarz S, Feßler AT, Hauschild T, Kehrenberg C, Kadlec K. Plasmid-mediated resistance to protein biosynthesis inhibitors in staphylococci. *Ann NY Acad Sci*;2011, 1241:82-103.
300. Schwarz S, Loeffler A, Kadlec K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Vet Dermatol*;2017, 28 (1):82-19.
301. Schwarz S, Roberts MC, Werckenthin C, Pang Y, Lange C. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic and pet animals. *Vet Microbiol*;1998, 63:217-228.
302. Schwarz S, Shen J, Wendlandt S, Febler AT, Wang Y, Kadlec K, Wu CM. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in staphylococci and other firmicutes. *Microbiol Spectr*;2014, 2(6):PLAS -0020-2014.
303. Seo KS, Bohach GA. *Staphylococcus aureus*. In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Doyle MP and Beuchat LR (Ed). Washington, DC: ASM Press;2007, pp.518.
304. Shephard MA, Fleming VM, Connor TR, Corander J, Feil EJ, Fraser C. Historical Zoonoses and other changes in host tropism of *Staphylococcus aureus*, identified by phylogenetic analysis of a population dataset. *PLoS One* ;2013, 8(5):e62369.
305. Shittu AO, Lin J. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. *BMC Infect Dis*;2006, 6:125.
306. Sina H, Ahoyo T, Moussaoui W, Keller D, Bankole H, Barogui Y. Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from skin, soft tissue, and bone related infections. *BMC Microbiol*;2013, 13:188.
307. Smith AJ, Jackson M.S, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol*;2001, 50:940-946.
308. Smith TC, Gebreyes WA, Abley MJ, Harper AL, Forshey BM, Male MJ, Martin HW, Molla BZ, Sreevatsan S, Thakur S, Thiruvengadam M, Davies PR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA. *PLoS One*;2013, 8(5):e63704.
309. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DY, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin Microbiol Rev*;2013, 26 (3):422-447.
310. Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev*;1992, 5:387-399.
311. Spicer WJ. *Pratique clinique en bactériologie, mycologie et parasitologie* Flammarion Médecine-Sciences, Paris;2003, pp.28-29.

312. Steinberg JP, Clark CC, Hackman BO. Nosocomial and Community-Acquired *Staphylococcus aureus* Bacteremias from 1980 to 1993: Impact of Intravascular Devices and Methicillin Resistance. *Clin Infect Dis*;1996, 23(2):255-259.
313. Stephen F. Freeze-Drying and Cryopreservation of Bacteria. In: Day JG, Pennington MW. (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 38. Humana Press, Totowa, NJ;1995.
314. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*;2003, 41(9):4089-4094.
315. Sugeng MW, Ang P, Tan HH, Goh CL. characteristics of bacterial skin infections in children compared to adult at tertiary dermatologic center. *Int J Dermatol*;1999, 38:582-586.
316. Sumbly P, Waldor MK. Transcription of the toxin genes present within the Staphylococcal phage phiSa3ms is intimately linked with the phage's life cycle. *J Bacteriol*;2003, 185:6841-6851.

T

317. Takayama Y, Tanaka T, Oikawa K, Fukano N, Goto M, Takahashi T. Prevalence of *blaZ* gene and performance of phenotypic tests to detect penicillinase in *Staphylococcus aureus* isolates from Japan. *Ann Lab Med*;2018, 38(2):155-159.
318. Tallent SM, Langston TB, Moran RG, Christie GE. Transducing particles of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 are comprised of helper phage-encoded proteins. *J Bacteriol*;2007, 189:7520-7524.
319. Talon R, Chastagnac C, Vergnais L, Montel MC, Berdague JL. Production of esters by *Staphylococci*. *Int J Food Microbiol* ;1998, 45:143-150.
320. Tan HH, Tay YK, Goh CL. Bacterial skin infections at a tertiary dermatological center. *Singapore Med J*;1998,39:353-356.
321. Tang J, Tang C, Chen J, Du Y, Yang XN, Wang C, Zhang H, Yue H. Phenotypic characterization and prevalence of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from outbreaks of illness in Chengdu City. *Foodborne Pathog Dis*;2011,8(12):1317-1320.
322. Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy*;2007, 93:24-41.
323. Thomas DY, Jarraud S, Lemercier B, Cozon G, Echasserieau K, Etienne J, Gougeon ML, Lina G, Vandenesch F. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect Immun*;2006, 74:4724-4734.
324. Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. *Lancet*;1978, 2:1116-1118.
325. Torres Garcia M, Tejedor Junco M, Gonzalez Martin M, Gonzalez Lama Z. Selection of subpopulations resistant to amikacin and netilmicin of gentamicin-resistant clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralbl Bakteriol*;1996, 284(1):58-66.
326. Trzcinski K, Cooper BS, Hryniewicz W, Dowson CG. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* ;2000, 45:763-770.
327. Tsen HY, Yu GK, Wang KC, Wang SJ, Chang MY, Lin LY. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. *Food Microbiol*;1998, 15:33-41.

U

328. Udo E, Jacob L, Mokadas E. Conjugative transfer of high-level mupirocin resistance from *Staphylococcus haemolyticus* to other staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*;1997, 41(3):693-695.
329. Unal N, Cinar OD. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Trop Anim Health Prod* ;2012, 44:369-375.

V

330. Valero A, Perez-Rodriguez F, Carrasco E, Fuentes- Alventosa JM, Garcia-Gimeno RM, Zurera G. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int J Food Microbiol*;2009, 133:186-194.
331. Vandenesch F, Naimi T, Enright M, Lina G, Nimmo G, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*;2003, 9(8):978-984.
332. Vasconcelos NG, Pereira VC, Araújo-Júnior JP, Da Cunha M. Molecular detection of entérotóxicas E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *J Appl Microbiol*;2011, 111:749-762
333. Veras JF, Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Santos DA, Cerqueira, MMOP, Cantini A, Nicoli JR and Jett M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int J Infec Di*; 2008,12:410-415.
334. Verdier II, Durand G, Bes M, Taylor KL, Lina G, Vandenesch F, Fattom AI, Etienne J. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *J Clin Microbiol*;2007, 45(3):725-729.
335. Verkade E, Kluytmans J. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: animal reservoirs and human infections. *Infect Genet Evol*;2014, 21:523-530.
336. Vernozy-Rozand C, Mazuya C, Prevostb G, Lapeyrec C, Besd M, Brund Y, Fleurettd J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats milk and cheese. *Int J Food Microbiol*;1996, 30:271-280.
337. Vial T, Descotes J. Immune-mediated side-effects of cytokines in human. *Toxicology*;1995, 105:31-57.
338. Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med*;2001, 344: 6-11.

W

339. Wallin-Carlquist N, Cao R, Marta D, da Silva AS, Schelin J, Radstrom P. Acetic acid increases the phageencoded enterotoxin A expression in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* ;2010, 10:147.
340. Walther B, Monecke S, Ruscher C, Friedrich AW, Ehricht R, Slickers P, Soba A, Wleklinski CG, Wieler LH, Lübke-Becker A. Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* ;2009, 47(3):704-710.
341. Walther B, Wieler LH, Vincze S, Antão EM, Brandenburg A, Stamm I, Kopp PA, Kohn B, SemmlerT, Lübke-Becker A. MRSA variant in companion animals. *Emerg Infect Dis*;2012, 18 (12):2017-2020.

342. Waters A, Contente-Cuomo T, Buchhagen J, Liu C, Watson L, Pearce K. Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US meat and poultry. *Clin Infect Dis*;2011, 52(10):1227-1230.
343. Wax K, Lewis A, Salyers A, Taber H. *Bacterial Resistance to Antimicrobials*, Second ed. CRC Press, Boca Raton;2008, p.294.
344. Weese JS, DickH, Willey BM, McGeer A, Kreiswirth BN, Innis B., Low DE. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Vet Microbiol* ;2006, 115:148-55.
345. Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Killgore GE, Tenover FC. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*;2003, 302(5650):1569-1571.
346. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*;2005, 5(12):751-762.
347. Wertheim HFL, Kleef M, Vos MC, Ott A, Verbrugh H, Fokkens W. Nosepicking and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*;2006 Aug, 27(8):863-7.
348. Williams REO. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev*;1963, 27:56-71.
349. Williams RJ, Ward JM, Henderson B, Poole S, O'Hara BP, Wilson M, Nair SP. Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins: characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1. *Infect Immun*;2000, 68:4407-4415.
350. Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, Connelley T, Chuang-Smith ON, Merriman JA, Guinane CM, Park JY, Bohach GA, Schlievert PM, Morrison WI, Fitzgerald JR. A novel core genome encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathog*;2011, 7:e1002271.
351. Wise RI, Ossman EA, Littlefield DR. Personal reflections on nosocomial staphylococcal infections and the development of hospital surveillance. *Rev Infect Dis*;1989, 11(6):1005-1019.
352. Wulf M, Voss A. MRSA in livestock animals-an epidemic waiting to happen? *Clin Microbiol Infect*;2008, 14:519-21.

Y

353. Yamasaki O, Yamaguchi T, Sugai M, Chapuis-Cellier C, Arnaud F, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. Clinical manifestation of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. *J Clin Microbiol*;2005, 43(4):1890-1893.

Z

354. Zarakolu P, Metan G, Altun B, Haşçelik G and Ünal S. Antimicrobial susceptibility, inducible macrolide-lincosamide-streptogramin B, and clonal diversity patterns of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Hacettepe University adult hospital. *Turk J Med Sci* 2009; 39 (5): 783-789.
355. Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C, Gotz F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from foods and starter cultures. *Int J Food Microbiol*;2008, 127:246-251.

356. Zhang K, Sparling J, Chow BL, et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol; 2004,42(11):4947-4955.
357. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, and Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005;43:5026–5033.
358. Zimakoff J, Kjelsberg AB, Larsen SO. A multicenter questionnaire investigation of attitudes toward hand hygiene, assessed by the staff in fifteen hospitals in Denmark and Norway. Am J Infect Control; 1992, 20:58-64.
359. Zinn C, Westh H, Rosdahl V. An international multicenter study of antimicrobial resistance and typing of hospital *Staphylococcus aureus* isolates from 21 laboratories in 19 countries or states. Microb Drug Resist; 2004, 10(2):160-168.
360. Zmantar T, Bekir K, Elgarsadi S, Hadad O, Bakhrouf A. Molecular investigation of antibiotic resistance genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from nasal cavity in pediatric service. Afr J Microbiol Res; 2013, 7(34):4414-4421
361. Zouharova M, Rysanek D. Multiplex PCR and RPLA Identification of *Staphylococcus aureus*. Enterotoxigenic Strains from Bulk Tank Milk. Zoonoses Public Health ; 2008, 55:313-319.

Annexes

Annexe 01 :

1. Milieux de culture

Bouillon cœur-cervelle :

- Composition :

Infusion de cervelle de veau..... 12.5 g
Infusion de coeur de boeuf..... 5.0 g
Peptone..... 10.0 g
Glucose..... 2.0 g
Chlorure de sodium..... 5.0 g
Phosphatase disodique..... 2.5 g

pH= 7.4

- Préparation :

37 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20 min.

Gélose hypersalée au mannitol (Chapman) :

- Composition :

Peptone..... 11.0 g
Extrait de viande..... 1.0 g
Chlorure de sodium..... 75.0 g
Mannitol..... 10.0 g
Agar..... 15.0 g

Rouge de phénol

(solution sodique à 0.25 p. 100)..... 20 ml

pH = 7.6

- Préparation :

111 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20 min.

Gélose Mueller-Hinton :

- Composition :

Infusion de viande de boeuf..... 300 ml
Peptone de caséine..... 17.5 g
Amidon de maïs..... 1.5 g
Agar..... 10.0 g

pH= 7.4

- Préparation :

37 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 116°C, 15 min.

Gélose nutritive :

- Composition :

Peptone 10.0 g

Extrait de viande..... 4.0 g

Chlorure de sodium..... 5.0 g

Agar..... 13.0 g

pH=7.2

- Préparation :

29 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min.

Base pour Gélose au Sang : Columbia :

- Composition :

Mélange spéciale de peptones..... 23.0 g

Amidon..... 1.0g

Chlorure de sodium..... 5.0 g

Agar..... 0.7 g

pH = 7.3

- Préparation :

42.5 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20 min.

Le sang (5%) est ajouté stérilement dans le milieu stérile en surfusion

Gélose pour la conservation :

- Composition :

Peptone..... 10.0 g

Extrait de viande..... 5.0 g

Chlorure de sodium..... 5.0 g

Agar..... 10.0 g

pH= 7.3

- Préparation :

Prêt à l'emploi en petits tubes fins.

2. Réactifs

Bleu de méthylène :

| | |
|------------------------|---------------------|
| Bleu de méthylène..... | 20.0g |
| Phénol..... | 20.0g |
| Éthanol à 0.95..... | 100 cm ³ |
| Eau distillée..... | 1dm ³ |

Plasma de lapin :

- Composition :

| | |
|----------------------------------|------------------|
| Plasma de lapin lyophilisé..... | 1 flacon: 10 ml |
| Diluant (oxalate de sodium)..... | 1 ampoule: 10 ml |

- Préparation :

10 ml de solvant additionné stérilement dans le flacon de plasma de lapin lyophilisé.
Agiter pour favoriser la dissolution en évitant la formation de mousse.

Réactifs de la coloration de Gram

Violet de gentiane:

| | |
|-------------------------|--------|
| Phénol..... | 2.0 g |
| Violet de gentiane..... | 1.0 g |
| Éthanol à 90°..... | 10 ml |
| eau distillée..... | 100 ml |

Lugol:

| | |
|--------------------------|--------|
| Iodure de potassium..... | 2.0 g |
| Iode métalloïde..... | 1.0 g |
| Eau distillée | 300 ml |

Alcool (éthanol)

Fuschine

| | |
|----------------------|--------|
| Fuchine basique..... | 1.0g |
| Phénol..... | 5.0 g |
| Éthanol à 90°..... | 10 ml |
| Eau distillée | 100 ml |

Annexe 02:

Contrôle de l'inoculum:

- Préparer l'étalon 0,5 Mc Farland, en versant 0,5 ml d'une solution de Ba Cl₂ dihydraté à 1% (10 g/l), dans une éprouvette de 100ml. Compléter à 100 ml avec du H₂ SO₄ à 1% (10ml/l). Ainsi préparé, il doit avoir une D.O. de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm.
- Aliquoter la solution en volumes de 10ml, dans des tubes identiques à ceux qui serviront à la préparation des inoculums (le nombre d'aliquots sera fonction du nombre de manipulateurs).
- Sceller ces tubes de façon à éviter toute évaporation (parafilm, ruban adhésif).
- Repérer le niveau du liquide à l'aide d'un marqueur, et le contrôler régulièrement en prenant la densité optique.
- Conserver les tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière (papier aluminium).
- Homogénéiser le tube étalon avant de le comparer à l'inoculum préparé : Inoculum et étalon doivent avoir la même turbidité lorsqu'ils sont examinés sur un fond rayé.
- Privilégier l'utilisation des densitomètres.

Annexe 03: valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus spp.*)

Annexes

Table de lecture 4 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus spp.*

| Antibiotiques testés | Charge des disques | Diamètres critiques (mm) | | | CMI critiques (µg/ml) | | | Commentaires |
|--|--------------------|--------------------------|---------|------|-----------------------|-------|------|--|
| | | R | I | S | R | I | S | |
| Pénicilline | 10 UI | 28 | --- | 29 | 0,25 | ----- | 0,12 | Le test de la β-lactamase confirme les cas douteux (voir « Tests complémentaires ».) Interprétation valable pour toutes les pénicillines inactivées par les β-lactamases (ampicilline, ticarcilline, pipéracilline....) |
| Oxacilline (<i>S.aureus</i>) | 1 µg | 10 | 11 – 12 | 13 | 4 | ----- | 2 | Tester le disque de céfoxitine 30 µg pour détecter la résistance à la méticilline de <i>S.aureus</i> et des staphylocoques à coagulase négative. En cas de résultat intermédiaire ou de discordance entre les disques d'oxacilline et de céfoxitine, se référer au chapitre « Tests complémentaires ». La résistance à la céfoxitine (et à l'oxacilline) signifie la résistance à toute la famille des β- lactamines. |
| Oxacilline (<i>S.lugdunensis</i>) | 1 µg | ---- | ---- | ---- | 4 | ----- | 2 | |
| Céfoxitine (<i>S.aureus</i> et <i>S.lugdunensis</i>) | 30 µg | 21 | --- | 22 | 8 | ----- | 4 | |
| Oxacilline (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i>) | 1 µg | ---- | --- | ---- | 0,5 | ----- | 0,25 | |
| Céfoxitine (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i>) | 30 µg | 24 | --- | 25 | --- | ---- | --- | |
| Gentamicine | 10 µg | 12 | 13 – 14 | 15 | 16 | 8 | 4 | Les souches résistantes à la gentamicine sont résistantes à tous les autres aminosides sauf à la streptomycine.** |
| Kanamycine | 30 µg | 13 | 14 – 17 | 18 | 64 | 32 | 16 | Pour <i>S.aureus</i> , les souches résistantes à la Kanamycine doivent être interprétées « R » à l'amikacine quelque soit le diamètre autour de l'amikacine**. |
| Amikacine | 30 µg | 14 | 15 – 16 | 17 | 64 | 32 | 16 | |
| Erythromycine | 15 µg | 13 | 14 – 22 | 23 | 8 | 1-4 | 0,5 | Détecter la résistance inductible en plaçant le disque d'érythromycine à côté du disque de clindamycine. En présence d'une image d'antagonisme, répondre « Résistance à érythromycine et clindamycine » |
| Clindamycine | 2µg | 14 | 15 – 20 | 21 | 4 | 1-2 | 0,5 | |

Annexes

Suite tableau n° 4: Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus spp.*

| Antibiotiques testés | Charge des disques | Diamètres critiques (mm) | | | CMI critiques (µg/ml) | | | Commentaires |
|---------------------------------|--------------------|--------------------------|---------|------|-----------------------|-------|------|--|
| | | R | I | S | R | I | S | |
| Vancomycine | CMI | --- | --- | ---- | 32 | 8-16 | 4 | Le disque de vancomycine ne permet pas de différencier les souches vanco « S » et « I » de <i>Staphylococcus aureus</i> , ni de différencier les souches vanco « S », « I » et « R » de S.C.N., car les diamètres d'inhibition sont similaires. La détermination de la CMI de vancomycine est obligatoire. |
| Teicoplanine | 30 µg | 10 | 11 – 13 | 14 | 32 | 16 | 8 | |
| Ofloxacine | 5µg | 14 | 15 – 17 | 18 | 4 | 2 | 1 | Interprétation valable pour péfloxacin, lévofloxacine et Ciprofloxacine |
| Triméthoprime+ sulfaméthoxazole | 1.25/23.75µg | 10 | 11 – 15 | 16 | 4/76 | ----- | 2/38 | |
| Rifampicine | 5µg | 16 | 17 – 19 | 20 | 4 | 2 | 1 | |
| Tétracycline | 30µg | 14 | 15 – 18 | 19 | 16 | 8 | 4 | Les souches sensibles à la tétracycline, sont sensibles à la doxycycline et à la minocycline. |
| Chloramphénicol | 30µg | 12 | 13 – 17 | 18 | 32 | 16 | 8 | |
| Pristinamycine | 15 µg | < 19 | 19 – 21 | ≥ 22 | > 2 | | ≤ 1 | Réponse de la pristinamycine est valable pour la quinupristine-dalfopristine |
| Acide fusidique** | 10 µg | < 24 | ----- | ≥ 24 | > 1 | | ≤ 1 | Tester ces molécules avec un inoculum 0,5MF dilué au 1/10 ^{ème} |
| Fosfomycine** | 50 µg | < 14 | ----- | ≥ 14 | > 32 | | ≤ 32 | |

Annexes

Table de lecture 23 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus spp.* (En médecine vétérinaire) :

| Antibiotiques testés | Charge du disque | Diamètres critiques (mm) | | | CMI critiques (µg/ml) | | | Commentaires |
|----------------------------------|------------------|--------------------------|-------|-----|-----------------------|-------|-------|--|
| | | R | I | S | R | I | S | |
| Pénicilline | 10UI | ≤28 | - | ≥29 | ≥0,25 | - | ≤0,12 | |
| Pénicilline+Novobiocine | 10UI/30 µg | ≤14 | 15-17 | ≥18 | ≥4/8 | 2/4 | ≤1/2 | Traitement des mammites pendant la lactation |
| Amoxicilline+Acide clavulanique* | 20/10 µg | ≤19 | - | ≥20 | ≥8/4 | - | ≤4/2 | |
| Oxacilline | | | | | | | | |
| <i>S.aureus</i> | 1 µg | ≤10 | 11-12 | ≥13 | ≥4 | - | ≤2 | Tester le disque de céfoxitine à 30 µg pour détecter la résistance à la meticilline des <i>S.aureus</i> et S.C.N La résistance à la céfoxitine (et à l'oxacilline) signifie la résistance à toutes les β-lactamines |
| S.C.N | 1 µg | ≤17 | - | ≥18 | ≥0,5 | - | ≤0,25 | |
| Céfoxitine*** | 30 µg | ≤21 | - | ≥22 | ≥8 | - | ≤4 | N/B : **** recommandation pour la mise en évidence de la résistance à la meticilline |
| <i>S.aureus</i> | | | | | | | | |
| <i>S. lugdunensis</i> | | | | | | | | |
| Erythromycine | 15 µg | ≤13 | 14-22 | ≥23 | ≥8 | 1-4 | ≤0,5 | |
| Néomycine/ Kanamycine | 30 µg | ≤13 | 14-17 | ≥18 | ≥64 | 32 | ≤16 | La réponse pour la néomycine est valable pour la kanamycine |
| Gentamicine** | 10 µg | ≤12 | 13-14 | ≥15 | ≥16 | 8 | ≤4 | |
| Enrofloxacin | 5 µg | ≤16 | 17-22 | ≥23 | ≥4 | 1-2 | ≤0,5 | |
| Sulfisoxazole | 250 ou 300 µg | ≤12 | 13-16 | ≥17 | ≥512 | - | ≤256 | La réponse pour le sulfisoxazole est valable pour les sulfonamides |
| Triméthoprime+Sulfaméthoxazole | 1,25/23,75 µg | ≤10 | 11-15 | ≥16 | ≥4/76 | - | ≤2/38 | -Valable pour Triméthoprime/ Sulfadiazine -La valeur ≤2/38 peut être utilisée pour les isolats des infections du tractus urinaire. |
| Tétracyclines | 30 µg | ≤14 | 15-18 | ≥19 | ≥16 | 8 | ≤4 | Valables pour chlortétracyclines, oxytétracyclines et doxycyclines. |
| Vancomycine** | 30 µg | - | - | ≥15 | ≥16 | 4 - 8 | ≤2 | La détection de la résistance à la vancomycine exige une incubation de 24h. |
| Bacitracine | 130 µg | <15 | - | ≥15 | ≥2 | - | <2 | |
| Clindamycine | 2 µg | <14 | 15-20 | ≥21 | ≥4 | 1-2 | ≤0,5 | La réponse pour la Clindamycine est valable pour la lincomycine. La clindamycine est plus active sur la plupart des souches de Staphylocoques |

Annexes

Table de lecture 24 : Valeurs critiques de la céfoxitine pour la détection des souches de souches de *Staphylococcus spp.* et *aureus* **meticillino résistantes** ^a (En médecine vétérinaire):

| Antibiotiques testés | Organismes | Diamètres critiques (mm) | | Commentaires |
|----------------------|--|--------------------------|-----|---|
| | | R | S | |
| Cefoxitine (30µg) | <i>S.aureus</i> and <i>S.lugdunensis</i> | ≤21 | ≥22 | <ul style="list-style-type: none"> - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≤ 21 mm, la souche de <i>S.aureus</i> est résistante à l'oxacilline - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≥22 mm, la souche de <i>S.aureus</i> est sensible à l'oxacilline |
| | S.C.N sauf <i>S.lugdunensis</i> | ≤24 | ≥25 | <ul style="list-style-type: none"> - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≤ 24 mm, la souche de S.C.N est résistante à l'oxacilline - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≥25 mm, la souche de S.C.N est résistante à l'oxacilline |

Annexe 4 :

Mode opératoire Pastorex Staph Plus

Bien homogénéiser les réactifs latex.

- Déposer une goutte de réactif latex dans un des cercles de la carte d'agglutination.
- Déposer une goutte de réactif latex témoin négatif sur un autre cercle.
- Prélever 1 colonie de dimension moyenne avec l'öse et l'émulsionner dans la goutte de latex pendant 10 secondes.
- Procéder de la même façon pour le latex témoin négatif.
- Homogénéiser par rotation douce de la carte et observer durant 30 secondes en tenant la carte sous un éclairage normal puis effectuer la lecture.
- **Réaction positive** : Formation d'agrégat uniquement avec le latex test.
- **Réaction négative** : Pas de formation d'agrégat et garde un aspect laiteux avec le latex test et le latex témoin négatif (Figure IV.6).
- **Résultat non interprétable** : Si agglutination de suspension dans les 2 réactif latex dans ce cas il faut rechercher la présence de la coagulase libre et de la DNase thermostable.

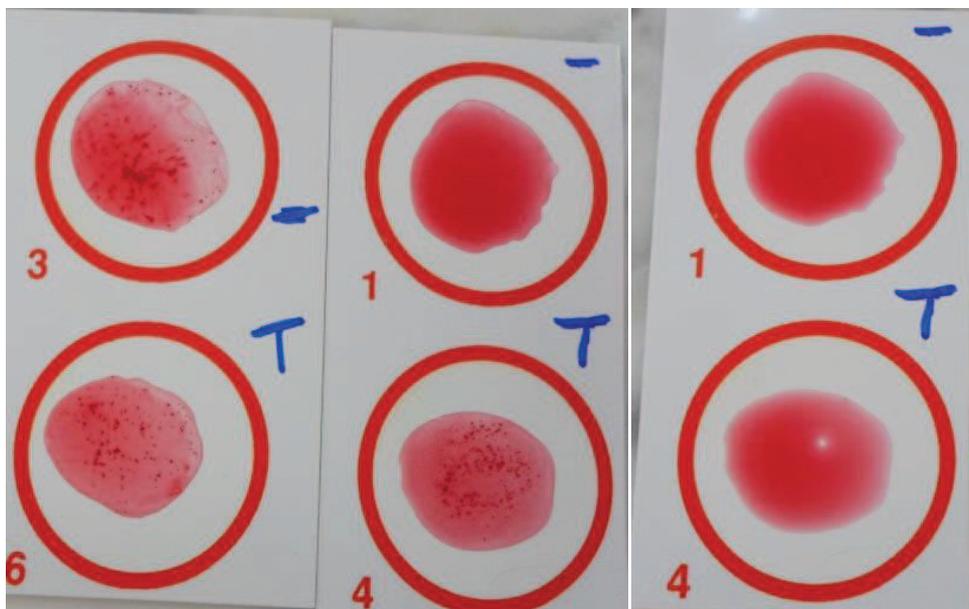
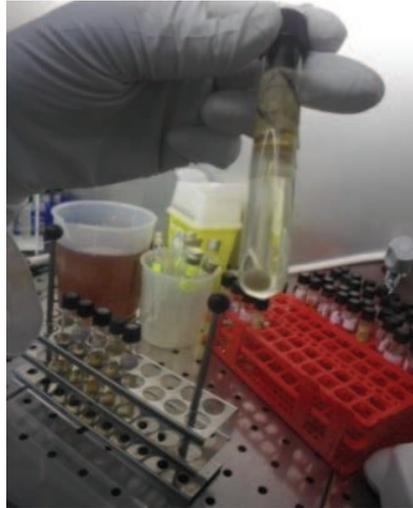


Figure IV.6 : Test d'agglutination pour confirmer *S. aureus* (Photo personnelle)

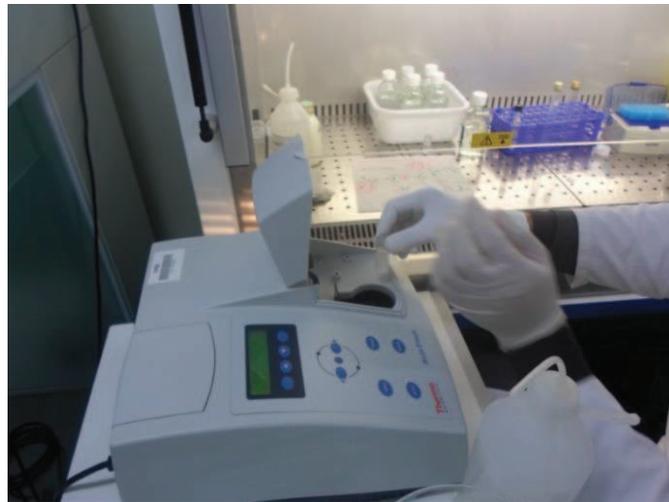
Annexe 5 :

Protocol utilisé pour la conservation des souches par Lyophilisation :

- A partir d'une culture pure de staphylocoques sur gélose Chapman ou gélose nutritive, ensemercer un bouillon nutritif ou bouillon BHIB.
- Incuber les tubes à 37°C pendant 18 h, afin que les cellules bactériennes atteignent la phase exponentielle de croissance.
- Centrifuger les tubes à 3900 rpm pendant 5 min, puis éliminer le surnageant et garder le culot qui contient les cellules bactériennes.
- Réhydrater le culot par l'ajout de 10 ml d'eau distillée stérile et bien homogénéiser au vortex.
- Mesurer la charge bactérienne par un spectrophotomètre réglé à 625nm de longueur d'onde, ne considérer que les tubes qui ont une charge minimale de 10^6 cellule/ml (DO=0,08-0,1).
- Centrifuger les tubes de nouveau à 3900 rpm pendant 5 min, éliminer le surnageant et garder le culot qui contient les cellules bactériennes.
- Dans des fioles stériles, ajouter aux cellules bactériennes un volume déterminé de lait écrémé stérilisé UHT. Le volume du lait est calculé selon la concentration bactérienne du culot. Généralement 20 ml de lait est suffisante afin que la concentration en cellules bactériennes dans la poudre obtenue après élimination de l'eau permet d'avoir une activité bactérienne rapide et efficace.
- Placer les fioles rapidement dans un congélateur régler à -20°C afin d'inhiber toute activité bactérienne de dégradation du lactose du lait.
- Après congélation, transférer les fioles dans le lyophilisateur, laisser l'appareil fonctionner pendant au moins 24 pour avoir une bonne sublimation, le couple température/pression utilisé est de :-40°C/0,12mbar.
- Après dessiccation totale, et à l'intérieur d'une enceinte de biosécurité type 2, transférer la poudre obtenue dans des croytubes et des flacons de 10ml, bien encapsuler les flacons.
- Etiqueter les tubes et les flacons, emballer dans de sachets individuels et les placer à température ambiante à l'abri de la lumière et de l'humidité. La durée de conservation peut aller jusqu'à 6 à 8 ans dans ces conditions.



Culot d'une culture bactérienne après centrifugation (photo personnelle)

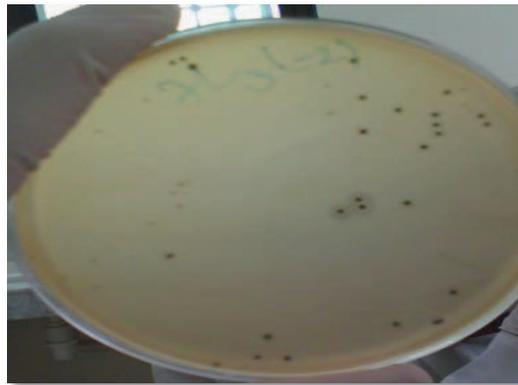


Détermination de la charge bactérienne par spectrophotométrie
(Photo personnelle)



Emplacement des fioles dans le lyophilisateur (Photo personnelle)

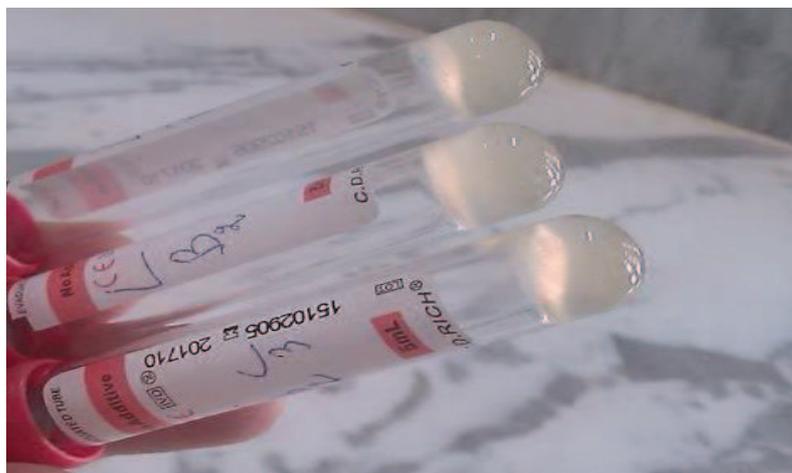
Annexe 6 :



Aspect des colonies caractéristiques et non caractéristiques sur gélose Baird Parker



Mise en évidence de catalase chez les staphylocoques



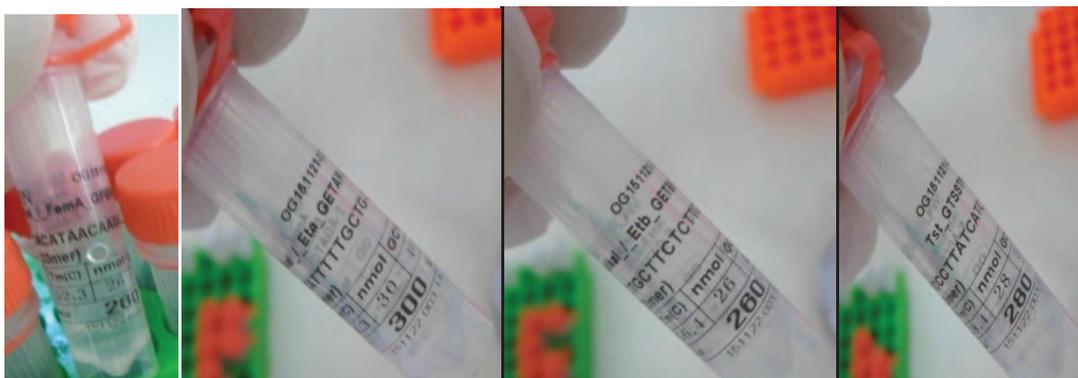
Mise en évidence de la coagulase libre chez les staphylocoques



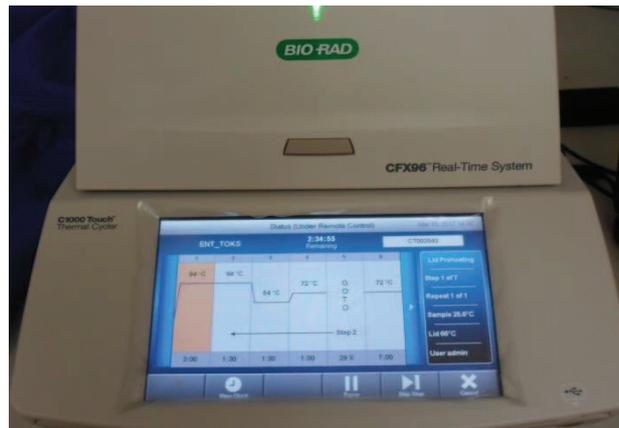
Extraction de l'ADN par la méthode de Sambrook et Russel (2001)



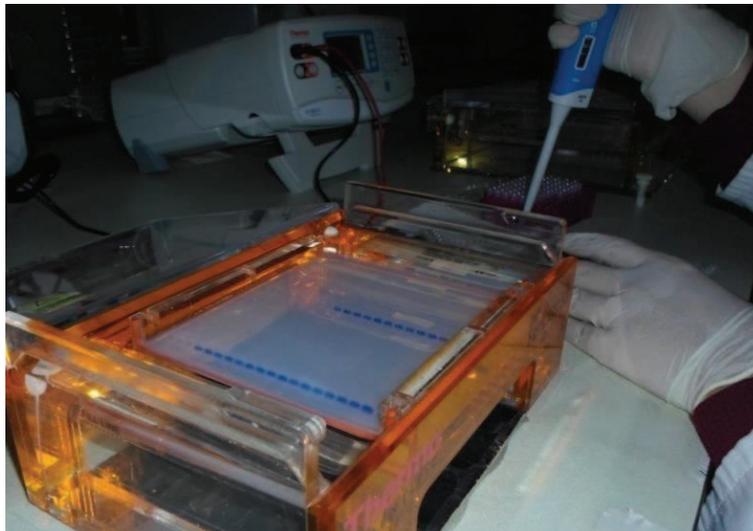
Amorces utilisées pour l'amplification des gènes des entérotoxines (A-E)



Amorces utilisées pour l'amplification des gènes (*femA*, *eta*, *etb* et *tst*)



Thermocycleur et programme utilisé pour l'amplification des fragments d'ADN (CFX 96 thermal cycler, Bio-Rad)



Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Publications scientifiques

Occurrence of enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin-1 genes in *Staphylococcus aureus* and CoNS isolated from clinical and food samples in Algeria

^{1,3}Rachid Achek, ²Zafer Cantekin, ³Mustapha Oumouna, ³Amira Mahdi, ¹Taha-Mossadak Hamdi

¹ High National Veterinary School, Algiers, Algeria; ² Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey; ³ Faculty of sciences, Yahia Farès University, Médéa, Algeria.

Abstract. The aim of this study was to determine the occurrence of toxin-genes carried by strains of *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) in Algeria. The present study performed two set multiplex PCR assay using specific primers for screening of 8 genes encoding for classical enterotoxins (SEs) (*sea* to *see*), Exfoliative Toxins (*eta*, *etb*) and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (*tst*). We analyzed 51 strains isolated from food samples and 45 strains originated from clinical cases. We observed that more than half of food strains (52.94%) possessed at least one of SEs genes; where *S. aureus* appears to be potentially enterotoxigenic than CoNS (68.18% vs 41.37%). From all the SEs genes amplified (27), *sed* gene (19;70.37%) was the most frequently detected. In clinical isolates, only 6 (13%) *S. aureus* harboured at least one SEs genes. However, 55.55% of clinical isolates (*S. aureus* or CoNS) possessed *tst* gene for Toxic Shock Syndrome Toxin-1. There were no foods or clinical isolates detected to possess exfoliative toxins genes (*eta*, *etb*). In conclusion, this study showed high frequency of SEs genes in food isolates, and *tst* gene in clinical isolates; our findings provide updated data on the Staphylococci toxins carriage in Algeria.

Key Words: *Staphylococcus aureus*; Enterotoxins; PCR; CoNS; TSST-1.

Copyright: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Corresponding Author: R. Achek, email: achekrachid@gmail.com

Introduction

Staphylococci are responsible for nosocomial/community acquired infections and foodborne illnesses worldwide (Le Loir et al 2003). This bacterium remains a persistent opportunistic of the respiratory tract and skin, either for human or animals (Monecke et al 2011) and constitutes a contamination source in food or health-care facilities (Kluytmans et al 1997; Von Eiff et al 2001).

Staphylococci produce a variety of toxins responsible for foodborne illness or toxic affections in patients with serious health problems (Hennekinne et al 2010). Consumption of contaminated meals with enterotoxins causes vomiting, diarrhoea and enteritis within six hours (Le Loir et al 2003; Seo and Bohach 2007). In addition, Staphylococci cause severe systemic affections (pneumonia, endocarditis), associated with variety of exotoxins such as toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), exfoliative toxins A and B, and Panton-Valentine leucocidin (PVL) (Balaban and Rasooly 2000; Dinges et al 2000).

Moreover, Staphylococci have a wide ability to acquire toxin-encoding genes. Most of these genes are located and transmitted via mobile genetic elements. For example, plasmids for *seb* (SEB), *sed* (SED) and *etb* (exfoliative toxin B) genes (Bayles and Iandolo 1989; Argudin et al 2010); prophages for *sea* (SEA)

and *see* (SEE) genes (Balaban and Rasooly 2000; Le Loir et al 2003); Staphylococcal pathogenicity islands for *sec* (SEC) and *tst* (TSST-1) gene (Dinges et al 2000; Argudin et al 2010). These aspects of mobile carriage accentuate horizontal transmission among isolates as well as modify their virulent ability and their evolution state (Becker et al 2003; Argudin et al 2010; Grumann et al 2014).

Coagulase positive Staphylococci (CoPS) especially *Staphylococcus aureus* were considered as the most pathogenic species (Hennekinne et al 2010), while, Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) had gained little attention and thought to be non-pathogenic (Kloos and Schleifer 1975). However, recently, CoNS ability to carry multiple pathogenic factors such as enterotoxins and TSST-1 toxin have been demonstrated (da Cunha et al 2007; Zell et al 2008; Vasconcelos et al 2011; Batista et al 2013). Toxin-associated genes carried by CoNS can be transmitted by cohabitation with other pathogenic Staphylococci (Ławrynowicz-Paciorek et al 2007; Vasconcelos and da Cunha 2010). Nevertheless, CoNS can contaminate foodstuffs and their clinical importance and toxigenic capacity cannot be ignored (Kloos and Bannerman 1995; Otto 2009).

Algerian studies were focused on Staphylococci antibiotic resistance (Ramdani-Bougouessa et al 2006; Rebiahi et al 2011;

Table 1. Characteristics of primers used for PCR analysis

| Gene | Primer | Oligonucleotide sequence (5'-3') | Location within gene | Size of amplified product (bp) |
|-------------|-------------------|----------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| <i>sea</i> | GSEAR-1 GSEAR-2 | GGTTATCAATGTGCGGGTGG | 349–368 | 102 |
| | | CGGCACTTTTTTCTCTTCGG | 431–450 | |
| <i>seb</i> | GSEBR-1 GSEBR-2 | GTATGGTGGTGTAAGTACTGAGC | 666–685 | 164 |
| | | CCAAATAGTGACGAGTTAGG | 810–829 | |
| <i>sec</i> | GSECR-1 GSECR-2 | AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG | 432–455 | 451 |
| | | CACACTTTTAGAATCAACCG | 863–882 | |
| <i>sed</i> | GSEDR-1 GSEDR-2 | CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG | 492–514 | 278 |
| | | ATTGGTATTTTTTTCGTTTC | 750–769 | |
| <i>see</i> | GSEER-1 GSEER-2 | AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC | 237–257 | 209 |
| | | CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC | 425–445 | |
| <i>femA</i> | GFEMAR-1 GFEMAR-2 | AAAAAAGCACATAACAAGCG | 1444–1463 | 132 |
| | | GATAAAGAAGAAACCAGCAG | 1556–1575 | |
| <i>eta</i> | GETAR-1 | GCAGGTGTTGATTTAGCATT | 775–794 | 93 |
| | GETAR-2 | AGATGTCCCTATTTTTGCTG | 848–867 | |
| <i>etb</i> | GETBR-1 | ACAAGCAAAAAGAATACAGCG | 509–528 | 226 |
| | GETBR-2 | GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG | 715–734 | |
| <i>tst</i> | GTSSTR-1 | ACCCCTGTTCCCTTATCATC | 88–107 | 326 |
| | GTSSTR-2 | TTTTTCAGTATTTGTAACGCC | 394–413 | |

Ouchenane et al 2011) and rarely on virulence factors such as: TSST-1 and PVL toxins (Ramdani-Bouguessa et al 2006). The aim of the present study was to determine by PCR the frequency of genes encoding staphylococcal enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin-1 genes, in Staphylococci strains isolated from food and clinical samples in Algeria.

Materials and methods

Bacterial Strains

A total of 96 *Staphylococcus* spp. isolates were used. Fifty one (53.13%) isolates were obtained from food matrix, samples including raw milk, minced beef meat, sausages and creamy cake were collected from retail market (supermarkets, conventional markets, or bazaars) in large cities at two regions of Médéa and Ain defla provinces, Algeria.

Forty five (46.88%) strains were isolated from clinical samples, clinical samples included: pus, sperm, urine, vaginal discharge, wound, catheter tips and secretions in general were aseptically collected in different services of Mohamed Boudiaf hospital, Médéa, Algeria. Clinical samples were taken to the microbiology laboratory of the same hospital for analysis.

Detection and enumeration of coagulase-positive Staphylococci in food matrix was done according to ISO 6888-1:1999/A1:2003. Baird Parker agar plates were incubated for 24 to 48 h at 37 °C. Microbiological analysis of clinical samples was done according to Quinn et al (1994). For coagulase-positive Staphylococci (CoPS) confirmation, catalase and coagulase tests were used (Rabbit plasma, Oxoid, UK). *Staphylococcus aureus* identification for both food and clinical isolates was made by Pastorex staph plus (Bio-Rad, France 2016).

DNA extraction

All isolates were purified by inoculation in Trypticase Soya Broth (TSB), and then transferred to Trypticase Soya Agar (TSA) plates for 18h incubation at 37°C. For bacterial cell lyses, lysozyme (100mg/ml) and proteinase-K (10mg/ml) were used. Nucleic acid extraction was performed with Phenol/chloroform extraction method according to Sambrook and Russel (2001). DNA pellet was re-suspended in Diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water and stored at –20 °C until PCR analyses.

PCR Procedure

Specific primers were used for the amplification of the *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* (SEs) genes; *eta*, *etb* (Exfoliative Toxins A, B associated genes), and *tst* (Toxic Shock Syndrome Toxin-1 gene) (Table 1). The *femA* primers were used for confirmation of *S. aureus* among studied strains. PCR procedures were applied according to Mehrotra et al (2000). For the PCR analysis, positive control DNAs were obtained from Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Microbiology Department.

Two sets of multiplex PCR procedures were performed according to Mehrotra et al (2000) with minor modifications. Briefly, for SEs, amplification mix containing 200µM deoxynucleoside triphosphates; 5 µl of 10X reaction buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.3], 500 mM KCl); 1.5 mM MgCl₂; 20 pmol of each *sea*, *seb*, *sec*, *see*, and *femA* primers; 40 pmol of *sed* primer; 2.5 U of Taq DNA polymerase (Thermo scientific), was added to 3 µl of template DNA. For others toxins genes, PCR reaction had the same constituents as in SEs except for the MgCl₂ concentration (2.0 mM) and the primers, which were used at 50 pmol for *eta* and 20 pmol for *etb* and *tst*. The final volume was adjusted to 25 µl by adding sterile ultrapure water. Amplification (CFX 96 thermal cycler, Bio-Rad) programme was as follows:

Table 2. Distribution of the enterotoxins, Exfoliative toxins and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 genes for food isolates.

| Target genes Amplicon size (bp) | Food isolates (n = 51) | | P value | Samples origin |
|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------|--|
| | <i>S. aureus</i> (n = 22; 43.14%) | CoNS (n = 29; 56.86%) | | |
| <i>femA</i> (132) | 22 | - | ND | (10) Raw milk (2) Creamy cake (2) Sausages (8) Minced beef meat |
| <i>sea</i> (102) | 2 (9.09%) | - | 0.181 | (2) Creamy cake |
| <i>seb</i> (164) | - | - | ND | - |
| <i>sec</i> (451) | 1(4.55%) | 2(6.90%) | 1 | (1) Creamy cake (2) Minced beef meat |
| <i>sed</i> (278) | 11(50%) | 8(27.59%) | 0.145 | (10) Raw milk (1) Creamy cake (2) Sausages (6) Minced beef meat |
| <i>see</i> (208) | 1(4.55%) | 2(6.90%) | 1 | (3) Raw milk |
| <i>eta</i> (93) | - | - | ND | - |
| <i>etb</i> (266) | - | - | ND | - |
| <i>tst</i> (326) | - | - | ND | - |

initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 29 cycles of amplification (denaturation at 94°C for 1.5 min, annealing at 54°C for 1.5 min, and extension at 72°C for 1 min). A final extension step (72°C for 7 min) was performed after the completion of cycles.

PCR products, were loaded into 2% agarose gel (BioMax) stained with 5 µl of RedSafe™ nucleic acid (iNtROn Biotechnology, Korea) and visualized using a UV transluminator (EC3, UVP Bioimaging systems, Inc).

Statistical analysis

Fisher's exact test was used to compare the frequency of each enterotoxin, exfoliative toxin and TSST-1 toxin genes. P value of <0.05 was considered as statistically significant.

Results

In the present study, the amplification of SEs, other toxin-associated genes and *femA* was successfully obtained. Table 2 and Table 3 show the PCR results for the detection of classic enterotoxins encoding genes; exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin-1 encoding genes of all Staphylococci isolates. According to phenotypic methods and *femA* gene detection, 61 isolates (63.54%) (22 food, 39 clinical) were confirmed as *Staphylococcus aureus*.

Among food isolates (n=51), 27 (52.94%) had at least one gene encoding for SEs production. The detection of *sed* gene was the most predominant (70.37%) being found in 19 isolates (11 in *S. aureus* and 8 in CoNS strains). However, three isolates carried *sec* and *see* genes. Also, *sea* gene was confirmed in only two *S. aureus* isolates, while *seb* gene was not detected.

Regarding to food-matrix origins, raw milk and minced beef meat were the most common matrix which contained Staphylococci harbouring *sed* gene (10 and 6 isolates, respectively) (Table 2). In addition, three *see* genes were detected in raw milk isolates only. However, the two *S. aureus* isolates possessing the *sea* gene were exclusively isolated from creamy cake samples. In all food isolates, *S. aureus* was more enterotoxigenic than CoNS (68.18% vs 41.37% respectively) but not significantly different (P=0.089), this difference was remarkably observed for *sed* and *sea* genes (P=0.145, P=0.181). However, the frequency of *sec* and *see* genes in CoNS (6.9%) was higher but not significant compared to *S. aureus* isolates (4.54%) (P=1.000). The exfoliative encoding genes (*eta*, *etb*) and *tst* gene were not detected in any food isolates.

Regarding clinical isolates, the rate of staphylococcal-harbouring enterotoxin genes isolated from clinical samples was significantly lower (6/13.33%) compared to that of food isolates (27/55.94%) (P<0.001). All clinical CoNS isolates were negative for SEs genes. Among the six SEs genes positive isolates, three hospital acquired isolates possessed the *sed* gene and one isolate harboured *seb* gene. Exceptionally, one community acquired *S. aureus* isolate had the *seb* gene.

The exfoliative encoding genes (*eta*, *etb*) were not found in any clinical isolates. Nevertheless, a high percentage of the *tst* gene (55.55%) was detected, with predominance of pus samples (9 isolates) (Table 3). For all clinical CoNS isolates, the *tst* gene was found only in one community acquired strain.

Table 4 lists the genotype profiles for all isolates harbouring one or multiple toxin genes. Among all profiles observed, the most commonly identified gene profiles were those containing a single

Table 3. Distribution of the enterotoxins, Exfoliative toxins and Toxic Shock Syndrome

| Target genes Amplicon size (bp) | Clinical isolates (n = 45) | | | P value | Samples origin |
|------------------------------------|--|---|--------------------------|---------|--|
| | Hospital acquired Isolates (n = 18) | Community acquired Isolates (n = 27) | | | |
| | <i>S. aureus</i> (n = 18; 40%) | <i>S. aureus</i> (n = 21; 46.67%) | CoNS (n = 06; 13.33%) | | |
| <i>femA</i> (132) | 18 | 21 | - | ND | - |
| <i>sea</i> (102) | - | - | - | ND | - |
| <i>seb</i> (164) | 1(5.56%) | 1(4.76%) | - | 1 | (1)Sperm (1) Vaginal discharge |
| <i>sec</i> (451) | 1(5.56%) | - | - | 1 | (1) Throat samples |
| <i>sed</i> (278) | 3(16.67%) | - | - | 1 | (1) Blood culture (1) Urinary probe (1)Vaginal discharge |
| <i>see</i> (208) | - | - | - | ND | - |
| <i>eta</i> (93) | - | - | - | ND | - |
| <i>etb</i> (266) | - | - | - | ND | - |
| <i>tst</i> (326) | 9(50%) | 15(71.43%) | 1(16.67%) | 0.558 | (9) Pus (5) Urine (5) Sperm (3) Vaginal discharge (1) Joint fluid (1) Surgical wound (1) Urinary probe |

Table 4. Genotypes of Staphylococcal enterotoxins, exfoliative and toxins of toxic shock syndrome toxin-1 genes

| Genotypic profiles | Food isolates (n = 51) | | Clinical isolates (n = 45) | |
|---------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| | <i>S. aureus</i> (n = 22) (43.14%) | CoNS (n = 29) (56.86%) | <i>S. aureus</i> (n = 39) (86.67%) | CoNS (n = 06) (13.33%) |
| | <i>sea</i> | 1 | - | - |
| <i>seb</i> | - | - | 1 | - |
| <i>sec</i> | - | 2 | 1 | - |
| <i>sed</i> | 9 | 8 | - | 1 |
| <i>see</i> | 1 | 2 | - | - |
| <i>sed-sea</i> | 1 | - | - | - |
| <i>sed-sec</i> | 1 | - | - | - |
| <i>sed-seb- tst</i> | - | - | 1 | - |
| <i>sed -tst</i> | - | - | 1 | - |
| <i>tst</i> | - | - | 22 | 1 |

toxin gene (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* and *tst*). Twenty six (27.08%) isolates had one type of enterotoxins gene, and 23 (23.95%) possessed only the *tst* gene. Besides, the *sed* and *tst* genotypes were the most observed with 18 (%) and 23 (%) strains, respectively. Combinations genes had been found in four genotypes (*sed-sea*, *sed-sec*, *sed-tst*, *sed-seb-tst*); each multi-toxin genotype had only one strain.

The present results showed that *sea*, *seb*, *sed-sea*, *sed-sec*, *sed-seb-tst* and *sed-tst* genotypes had occurred in *S. aureus* isolates. The remaining genotypes included both *S. aureus* and CoNS isolates.

Discussion

In Algeria, few studies have focused on the toxigenic potential of staphylococcal strains and their occurrence in food poisoning

or hospital/community acquired infections. Algerian reports had studied PVL and TSST-1 genes carriage in MRSA (Ramdani-Bouguessa et al 2006; Bittar et al 2009; Ouchenane et al 2010). Antri et al (2010) studied the *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes carriage isolated in hospital and recorded a low frequency for classical enterotoxin genes (8.6%). For the knowledge of the authors, no data has been published about the frequency of toxins genes carriage in Staphylococci isolated from food matrix. Our results showed that the staphylococcal isolates harbouring genes for classical enterotoxins were responsible for more than half of all cases of food contamination. These results are in accordance with many previous works (Chapaval et al 2006; Pereira et al 2009; Carfora et al 2015). In the present study, *sed* was the most frequent toxin-encoding gene (19 of 51 isolates, 37.25%) isolated from food. This gene was mainly detected in Staphylococci isolated from raw milk and minced beef meat. These results are in agreement with other studies, such as those of Pu et al (2011) and Bianchi et al (2013) who reported that 15% (23/152) and 25% (120/481) of retail meat isolates and dairy product isolates had amplified the *sed* gene. In contrast, Zouharova and Rysanek (2008) reported that a low percentage of *S. aureus* isolates encoding the *sed* gene (2/70; 2.9%) in raw milk, whereas Balaban and Rasooly (2000) and Normanno et al (2005) found no evidence that the SED enterotoxin was involved in Staphylococcal food poisoning (SFP).

In our study, no isolates taken from raw milk encoded the *sea* gene. The only detected *sea* gene came from isolates which originated from cream cake samples. In contrast, Chapaval et al (2006) and Rall et al (2008) reported that *sea* was the most common toxin gene detected in raw milk isolates, finding 67.78% (61 out of 90 isolates) and 28.9% (11 out of 38 isolates), respectively. Omoe et al (2005), Chiang et al (2008) and Tang et al (2011) detected the *sea* gene mainly in Staphylococci isolated from food matrix. They reported that it was responsible for 5.8%, 29.2% and 50% of cases of SFP, respectively. However, Pereira et al (2009) did not detect the *sea* gene in 20 *S. aureus* isolated from raw milk, which is in accordance with our results.

In terms of the frequency of *seb* gene detection, our results are in accordance with those of Cremonesi et al (2005) and Bianchi et al (2013), who reported that all of Staphylococcal strains isolated from milk and dairy products were negative for the *seb* gene. In our study, *see* gene was harboured only by three Staphylococci strains isolated from raw milk; Rall et al (2008) detected the *see* gene in 5.26% (2 out of 38 isolates) *S. aureus* isolated from raw milk, while Zouharova and Rysanek (2008) did not. For *sec* gene carriage, we reported two strains isolated from minced beef meat, while Pu et al (2011) did not detect any *sec* gene in 152 *S. aureus* isolates.

Regarding clinical isolates, the rate of staphylococcal-harbouring enterotoxin genes observed in our study was lower than that reported in earlier clinical investigations (Becker et al 2003; Nashev et al 2007; Chiang et al 2008). Our clinical samples consisted mainly of samples obtained from patients with hospital- and community-acquired infections. Thus, the discordance may be explained by differences in the origin of the specimens, which included samples from food poisoning cases, or potential contamination by carriage sources of Staphylococci (nasal cavities and hands). However, some authors (Naffa et al 2006; da Cunha et al 2007 and Demir et al 2011) reported a high

percentage of staphylococcal-positive SE-encoding genes obtained from samples population similar to ours: 23/100 (23%), 56/120 (47.5%) and 66/120 (55%), respectively. Moreover, considering that our results are in concordance with a local report of Antri et al (2010), we can consider that geographical location might explain the large difference between our findings and those reported earlier.

Irrespective of the clinical sampling origin, several studies reported a high frequency of the *sea* gene in Staphylococci isolates (Naffa et al 2006; Nashev et al 2007; Demir et al 2011). However, it should be pointed out that in the present study, *sea* gene was not detected in any of the clinical isolates. The frequency of *see* gene found in our study was in accordance with that of all the above studies, except the study by Becker et al (2003). The occurrence enterotoxin-encoding genes detected in CoNS isolated from food samples was 41.37% (12 out of 29 CoNS isolates), which was higher than reported in other studies (Blaiotta et al 2004; da Cunha et al 2006) but similar to another (Fijałkowski et al 2016). In our study, the most frequently detected enterotoxin gene was *sed*, and neither *sea* nor *seb* were detected in the CoNS isolates. Da Cunha et al (2006) reported that 15% (3 out of 20 isolates) of CoNS isolated from foods harboured the *sea* gene. Other studies also detected enterotoxin genes in CoNS strains from both dairy and meat products (Vernozy-Rozand et al 1996; Rodriguez et al 1996).

In the present study we did not detect *eta* or *etb* genes in any of the tested samples. Some studies reported that *S. aureus* produced one or both exfoliative toxins (Hayakawa et al 2000; Becker et al 2003; Demir et al 2011). Jarraud et al (2001) did not detect *eta* and *etb* genes in 58 *S. aureus* isolates responsible for suppurative diseases.

In our study, *tst* gene was not detected in the food origin isolates, this result corroborate the Fijałkowski et al (2016) works. In contrast, we observed a high frequency of the *tst* gene (25/45; 55.55%) in clinical isolates, this result being similar to that found by Chiang et al (2008), who reported a frequency of 59.1% (87 out of 147 isolates). This was higher than that detected in earlier studies of Becker et al 2003; da Cunha et al 2007 and Demir et al 2011, who reported frequencies of (87/429; 20.3%), (11/104; 10.58%) and (17/120; 14.17%), respectively.

The TSST-1 toxin is a causative agent of systemic infections, such as the staphylococcal toxic shock syndrome (Dinges et al 2000) but is rarely implicated in SFP. A number of studies reported that TSST-1, was frequently detected in *S. aureus* clinical isolates but rarely in food isolates (Lappin and Ferguson 2009; Tsen et al 1998; El-Ghodban et al 2006).

In the present study, most genotypes contained a single toxin gene, regardless of the origin of the sample, with *tst* and *sed* as the most common genes. This result is in accordance with those of several other studies (Nashev et al 2007; Zouharova and Rysanek 2008; Rall et al 2010), although the *sea* genotype was predominant in these studies. However, in other studies (Bianchi et al 2013; Pu et al 2011) the *sed* genotype was the most common genotype detected. In the present study, in clinical samples, the frequency of the *tst* genotype was in agreement with that found in an earlier study (Chiang et al 2008).

In the current study, frequency of toxin gene combinations was low, being observed in only four isolates. The *tst* gene was detected in combination with enterotoxin genes in two genotypes

(*sed-seb-tst* and *sed-tst*). A number of previous studies reported that Staphylococci strains harboured the *tst* gene, either alone or in combination with SE-encoding genes (Becker et al 2003; Chapaval et al 2006; da Cunha et al 2007; Chiang et al 2008; Demir et al 2011). Others studies recorded a *tst* combination with *sec*, but not with *sed* or *seb* (Hwang et al 2007).

The toxins production by Staphylococci strains is complex and involves gene carriage and gene promoters, such as multiple global regulators of virulence (e.g. *agr*, *sarA*, *rot* and *sigB*). Previous studies suggested that toxin-encoding genes (SEs, TSST-1 and exfoliative toxins) could be located on a mobile genetic carrier, which would provide potential support for horizontal transfer or genotype combination (Omoe et al 2005; Chiang et al 2008, Grumann et al 2014). Jarraud et al (2001) suggested that SEs and TSST-1 share common structural and biological properties and those that are derived from a common ancestor.

To conclude, this study reports the occurrence of the toxin genes in staphylococcal isolates from food and clinical samples in Algeria. Using a multiplex PCR method, a high frequency of SEs genes in food isolates and *tst* gene in clinical isolates were recorded. The pathogenic potential of CoNS points to the need for a greater surveillance in the area of hygiene and public health. There is an urgent need to establish legal standardized methods to be able to verify and quantify the degree of Staphylococci enterotoxins contamination in foods in Algeria. Further research is needed in order to investigate the contamination routes of food consumed in Algeria and the distribution of newly described Staphylococcal toxin genes.

Acknowledgments

Authors expressed their grateful acknowledgement to Dr. Yasar Ergün and other staff members of Veterinary Faculty, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey for their help and supportive assistance during the preparation of this work.

References

- Antri K, Rouzic N, Boubekri I, Dauwalder O, Beloufa A, Ziane H, et al. Forte prévalence des infections communautaires et nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et portant le gène de la leucocidine de Panton-Valentine dans l'Algerois. *J pat-bio* 2010;58:15–20.
- Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* 2010;2:1751–1773.
- Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 2000;61:1–10.
- Batista JEC, Ferreira EL, de Oliveira Nascimento DC, Ventura RF, de Oliveira WLM, Leal NC, Lima-Filho JV. Antimicrobial resistance and detection of the *mecA* gene besides enterotoxin-encoding genes among coagulase-negative Staphylococci isolated from clam meat of *Anomalocardia brasiliana*. *Foodborne Pathog Dis* 2013;10:1044–1049.
- Bayles KW, Iandolo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol* 1989;171:799–806.
- Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:1434–1439.
- Bianchi DM, Gallina S, Bellio A, Chiesa F, Civera T, Decastelli L. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. *Lett Appl Microbiol* 2013;58:190–196.
- Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain JM. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34(5):467–470.
- Blaiotta G, Ercolini D, Pennacchia C, Fusco V, Casaburi A, Pepe O, Villani F. PCR detection of staphylococcal enterotoxigenes in *Staphylococcus* spp. Strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB- 8802. *J Applied Microbiol* 2004;97:719–730.
- Carfora V, Caprioli A, Marri N, Sagrafoli D, Boselli C, Giacinti G, et al. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *Int Dairy J* 2015;42:12–15.
- Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (*ent*) and toxic Shock syndrome toxin-1 gene (*tst*) in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. *Arq Inst Biol* 2006;73(2):165–169.
- Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int J Food Microbiol* 2008;121:66–73.
- Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol Cell Probes* 2005;19:299–305.
- DaCunha M de LRS, Calsolari-Regina AO, Araújo-Júnior JP. Detection of Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Genes in *Staphylococcus*, with Emphasis on Coagulase-Negative Staphylococci. *Microbiol Immunol* 2007;51(4):381–390.
- DaCunha M de LRS, Peresi E, Oliveira-Calsolari RA, Araújo-Júnior JP. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. *Braz J Microbiol* 2006;37:70–74.
- Demir C, Aslantaş Ö, Duran N, Ocağ, Özer B. Investigation of toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated in Mustafa Kemal University Hospital. *Turk J Med Sci* 2011;41(2):343–352.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:16–34.
- El-Ghodban A, Ghenghesh KS, Marialigeti K, Esahli H, Tawil A. PCR detection of toxic shock syndrome toxin of *Staphylococcus aureus* from Tripoli, Libya. *J Med Microbiol* 2006;55:179–182.
- Fijałkowski K, Peitler D, Karakulska J. Staphylococci isolated from ready-to-eat meat – Identification, antibiotic resistance and toxin gene profile. *Int J Food Microbiol* 2016;238:113–120.
- Grumann D, Nübel U, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. *Infect Genet Evol* 2014;21:583–592.
- Hayakawa Y, Akagi M, Hayashi M, Shimano T, Komae H, Funaki O, et al. Antibody response to toxic shock syndrome toxin-1 of *Staphylococcus aureus* in dairy cows. *Vet Microbiol* 2000;72: 321–327.
- Hennekinne JA, Ostyn A, Guillier F, Herbin S, Pruffer AL, Dragacci S. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized. *Toxins* 2010;2:2106–2116.
- Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, Koo HC, et al. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *Int J Food Microbiol* 2007;117: 99–105.
- ISO 6888-1/A1: 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.

•Mustapha Oumouna, Faculty of sciences, YahiaFarès University, Urban pole, Médéa, Algeria, email: oumouna@Gmail.com.

•Amira Mahdi, Faculty of sciences, YahiaFarès University, Urban pole, Médéa, Algeria, email:amiramahdi5@gmail.com

•Taha-Mossadak Hamdi, High National Veterinary School, Issad Abbes Avenue, Oued Smar, Algiers, Algeria, email: moussa-hamdi@hotmail.com

Citation

Achek R, Cantekin Z, Oumouna M, Mahdi A, Hamdi TM. Occurrence of enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin-1 genes in *Staphylococcus aureus* and CoNS isolated from clinical and food samples in Algeria. *HVM Bioflux* 2018;10(2):85-92.

Editor Stefan C. Vesa

Received 24 February 2018

Accepted 4 May 2018

Published Online June 2018

Funding None reported

**Conflicts/
Competing
Interests** None reported

RESEARCH NOTE

Open Access



Emerging of antimicrobial resistance in staphylococci isolated from clinical and food samples in Algeria

Rachid Achek^{1,2*}, Helmut Hotzel⁴, Zafer Cantekin³, Ibrahim Nabi¹, Taha Mossadak Hamdi², Heinrich Neubauer⁴ and Hosny El-Adawy^{4,5*} 

Abstract

Objective: The antimicrobial resistance of staphylococci rose worldwide. In total, 96 *Staphylococcus* isolates from food and clinical samples were collected from two provinces in Algeria. The antimicrobial susceptibility testing was performed and resistance-associated genes were detected.

Results: Fifty-one strains were isolated from food samples and differentiated into 33 *Staphylococcus aureus* and 18 coagulase-negative staphylococci. Forty-five staphylococci were collected from hospital and community-acquired infection cases. All *S. aureus* isolated from food were resistant to penicillin and 45.5% were resistant to tetracycline. The resistance rates of 45 clinical *Staphylococcus* isolates were 86.7%, 48.9%, 37.8% and 20.0% to penicillin, tetracycline, erythromycin and kanamycin, respectively. Nine isolates were confirmed as MRSA from food and clinical isolates. One *S. aureus* originated from food was confirmed as vancomycin-resistant. Multidrug-resistance was observed among 25.5% and 53.3% of food and clinical staphylococci, respectively. The *tetM/K*, *blaZ*, *aacA-aphD*, *ermC* and *mecA* genes were detected in food and clinical isolates. *ermA* gene was not found. This study provided insight into the status of antimicrobial resistance of staphylococci isolated from food and clinical samples in Algeria. Further investigations and surveillance programmes are mandatory.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, Coagulase-negative staphylococci, Antimicrobial resistance, Algeria

Introduction

Staphylococci are the most isolated bacteria in nosocomial infections and foodborne illnesses globally and involved in severe systemic affections [1–6].

The mechanism of antimicrobials resistance in staphylococci was due to the acquisition of mobile genetic elements like plasmids and/or transposons [7–10]. Penicillin-resistance was due to the production of beta-lactamases which is encoded by the *blaZ* gene located chromosomally or on plasmids [11, 12]. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) where resistance is encoded by *mecA* gene is an important cause of

human nosocomial infections worldwide [13, 14]. In *S. aureus* and CoNS tetracycline resistance is mediated by ribosomal encoded *tetM* gene and/or by *tetK* encoded efflux protein [15–17]. Ribosomal target modification, mediated by the presence of *ermA*, *ermB* and *ermC* in *S. aureus* and CoNS is associated with resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramins [17, 18]. For aminoglycoside resistance *aacA-aphD* genes are conferring cross-resistance to aminoglycosides such as gentamicin, tobramycin, kanamycin and amikacin [19–21].

Food is considered as an important vehicle for the spread of antibiotic-resistant bacteria [6, 22]. In meat-producing animals such as cattle, poultry and swine, antibiotics are mainly used for the treatment and prevention of several bacterial diseases which may lead to arise of antimicrobial resistance in various bacteria like

*Correspondence: achekrachid@gmail.com; hosny.eladawy@fli.de

¹ Faculty of Sciences, Yahia Farès University, Urban Pole, Médéa, Algeria

⁴ Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Friedrich-Loeffler-Institut, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



Campylobacter, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus* [23].

In Algeria, antimicrobial susceptibility of *S. aureus* was commonly investigated. [24–26]. Less attention was given to *S. aureus* and CoNS in community-acquired infections or those isolated from food samples [27].

The aim of this study was to determine phenotypic antimicrobial resistance and associated genes of staphylococci isolates from clinical and food samples in Algeria.

Main text

Methods

Sample collection and processing

One hundred and twelve food samples, including raw milk (n=30), minced beef meat (n=25), chicken meat (n=18), creamy cake (n=14), pizza (n=10), beef meat (n=10) and sausages (n=5) were collected from retail markets in cities of Médéa and Ain Defla provinces, Algeria.

Forty-five *S. aureus* isolates from clinical samples like pus, sperm, urine, vaginal discharge, wounds, catheter tips and secretions were kindly provided from Mohamed Boudiaf hospital, Médéa.

Bacterial isolation and identification

Microbiological analysis of food samples was done according to NF EN ISO 6888-1/A1 standard procedure according to the IOS [28] and for clinical samples was done by the method described previously [29]. The identification of coagulase-positive *S. aureus* (CoPS) was made by biochemical tests (Rabbit plasma, Oxoid, Dardilly, France). Identity of *S. aureus* was confirmed by agglutination test (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Susceptibility test of antimicrobial agents

The antimicrobial susceptibility testing to 12 antimicrobial agents was performed using the disc diffusion test according to CLSI recommendations [30] and the guidelines established by the Antibiogram Committee of the French Microbiology Society [31]. The antibiotic discs (Bio-Rad; Oxoid) were used according to instructions of the manufacturer's (Table 1). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used as quality control.

Oxacillin and/or cefoxitin were confirmed as MRSA using E-test method (Liofilchem, Loc Piane Vomano, Italy).

Detection of resistance-associated genes by PCR

Genomic DNA was extracted using phenol/chloroform extraction method [32].

PCR amplifications were carried out for *aacA-aphD*, *ermA*, *ermC*, *tetK* and *tetM*, *blaZ* and *mecA* genes

according to methods described previously [16, 33, 34], respectively.

The DNA fragments were visualized using an UV transilluminator (EC3, UVP BioImaging Systems, Cambridge, UK) and read using AlphaEaseFC software (Genetic Technologies Ltd., Fitzroy, Australia).

Statistical analysis

Possible relationships between the presence of resistance genes among *S. aureus* and CoNS isolated from food and clinical samples were statistically analysed using Fisher's exact test. *P*-value of <0.05 was considered as statistically significant difference.

Results

Ninety-six staphylococci were isolated, identified and classified as 51 staphylococci (33 *S. aureus* and 18 CoNS) from food samples, 27 staphylococci (21 *S. aureus* and 6 CoNS) from community-acquired clinical samples and 18 *S. aureus* from hospital-acquired clinical samples, respectively.

Out of 51 staphylococci isolated from food samples, 49 staphylococci (33 *S. aureus* and 15 CoNS) were resistant to at least one tested antibiotic (96.1%) (Table 1). The resistance rates to penicillin and tetracycline were 94.1% and 49.0%, respectively. Two *S. aureus* (6.1%) and three CoNS (16.7%) were phenotypically resistant to methicillin by disc diffusion test while MIC determination by E-test confirmed only one isolate as MRSA and another as methicillin-resistant CoNS.

Vancomycin resistance was detected in one *S. aureus* (3.0%). The resistance rates of CoNS to clindamycin and erythromycin were 33.3% and 27.8%, respectively. All staphylococci isolated from food samples were susceptible to gentamicin.

The antimicrobial resistance rates were remarkably higher in clinical isolates than in staphylococci isolated from food samples (Table 1). The resistance rates of *S. aureus* and CoNS isolated from clinical samples to penicillin were 92.3% and 50.0%, respectively while those to tetracycline were 48.7% and 50.0% for *S. aureus* and CoNS, respectively. The prevalence of MRSA obtained by disc diffusion test was 38.9% and 52.4% for hospital and community-acquired isolates, respectively. However, the detected MRSA rate by E-test was 11.1% and 23.8%. *Staphylococcus aureus* showed considerable resistance to erythromycin for both hospital-acquired (27.8%) and community-acquired isolates (52.4%). *Staphylococcus aureus* isolates from hospital were susceptible to gentamicin, however, those isolated from community infection showed 14.3% resistance to gentamicin. All clinical staphylococci isolates were susceptible to vancomycin.

Table 1 Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from food and clinical samples

| Antibiotic agent | Food isolates (n = 51) | | | | | | Clinical isolates (n = 45) | | | | | | | | |
|---------------------|---------------------------|------------|------------|---------------|------------|------------|-------------------------------------|------------|------------|--------------------------------------|------------|------------|---------------|------------|------------|
| | | | | | | | Hospital acquired isolates (n = 18) | | | Community acquired isolates (n = 27) | | | | | |
| | <i>S. aureus</i> (n = 33) | | | CoNS (n = 18) | | | <i>S. aureus</i> (n = 18) | | | <i>S. aureus</i> (n = 21) | | | CoNS (n = 06) | | |
| | S rate (%) | R rate (%) | I rate (%) | S rate (%) | R rate (%) | I rate (%) | S rate (%) | R rate (%) | I rate (%) | S rate (%) | R rate (%) | I rate (%) | S rate (%) | R rate (%) | I rate (%) |
| P (10U) | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 16.67 | 83.33 | 0.00 | 5.56 | 94.44 | 0.00 | 9.52 | 90.48 | 0.00 | 50.00 | 50.00 | 0.00 |
| OX (1 µg) | 93.94 | 6.06 | 0.00 | 83.33 | 16.67 | 0.00 | 61.11 | 38.89 | 0.00 | 33.33 | 66.67 | 0.00 | 66.67 | 16.67 | 16.67 |
| FOX (30 µg) | 93.94 | 6.06 | 0.00 | 83.33 | 16.67 | 0.00 | 61.11 | 38.89 | 0.00 | 47.62 | 52.38 | 0.00 | 83.33 | 16.67 | 0.00 |
| AMC (20/10 µg) | 100.00 | 0.00 | 0.00 | 94.44 | 5.56 | 0.00 | 94.44 | 5.56 | 0.00 | 80.95 | 19.05 | 0.00 | 83.33 | 16.67 | 0.00 |
| GM (10 µg) | 100.00 | 0.00 | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 0.00 | 94.44 | 0.00 | 5.56 | 85.71 | 14.29 | 0.00 | 83.33 | 16.67 | 0.00 |
| E (15 µg) | 81.82 | 9.09 | 9.09 | 55.56 | 27.78 | 16.67 | 72.22 | 27.78 | 0.00 | 47.62 | 52.38 | 0.00 | 66.67 | 16.67 | 16.67 |
| K (30 µg) | 54.55 | 9.09 | 36.36 | 83.33 | 11.11 | 5.56 | 66.67 | 27.78 | 5.56 | 85.71 | 14.29 | 0.00 | 83.33 | 16.67 | 0.00 |
| TE (30 µg) | 54.55 | 45.45 | 0.00 | 44.44 | 55.56 | 0.00 | 55.56 | 44.44 | 0.00 | 47.62 | 52.38 | 0.00 | 50.00 | 50.00 | 0.00 |
| VA (30 µg) | 96.97 | 3.03 | 0.00 | 100 | 0.00 | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 0.00 |
| CL (2 µg) | 90.91 | 6.06 | 3.03 | 61.11 | 33.33 | 5.56 | 94.44 | 0.00 | 5.56 | 95.24 | 0.00 | 4.76 | 100.00 | 0.00 | 0.00 |
| RIF (5 µg) | 96.97 | 3.03 | 0.00 | 88.89 | 11.11 | 0.00 | 88.89 | 11.11 | 0.00 | 85.71 | 9.52 | 4.76 | 100.00 | 0.00 | 0.00 |
| STX (1.25/23.75 µg) | 100.00 | 0.00 | 0.00 | 83.33 | 5.56 | 11.11 | 100.00 | 0.00 | 0.00 | 80.95 | 14.29 | 4.76 | 83.33 | 0.00 | 16.17 |

P penicillin, OX oxacillin, FOX cefoxitin, AMC amoxicillin + clavulanic acid, GM gentamicin, E erythromycin, K kanamycin, TE tetracycline, VA vancomycin, CL clindamycin, RIF rifampicin, STX trimethoprim/sulfamethoxazole, S susceptible, R resistant, I intermediate

The antibiotic resistance-associated genes were demonstrated in Table 2. In food isolates *tetM* was the most prevalent gene detected in *S. aureus* and CoNS with 66.7% and 88.9%, respectively. Both *tetM* and *tetK* genes were detected in 11 *S. aureus* (33.3%) and 4 CoNS (22.2%). In food samples, *mecA* gene was observed in 15 *S. aureus* (46.9%) and 10 CoNS (88.9%) isolates, respectively. Six *S. aureus* (18.2%) and 3 CoNS (16.7%) isolates harboured *aacA-aphD* gene associated with gentamicin-resistance. Fifteen *S. aureus* (46.9%) and 10 CoNS (88.9%) isolates possessed *blaZ* gene encoding resistance to penicillin. No significant difference for the detection of antibiotics resistance genes was observed between *S. aureus* and CoNS isolated from food samples ($P > 0.05$).

Regarding staphylococci from clinical samples, *mecA* was the most detectable resistance-associated gene in *S. aureus* originated from the hospital with 17 isolates (94.4%) and in the community with 19 isolates (90.5%). The *tetM* gene was found in 10 hospital isolates (55.6%)

and 17 community-acquired isolates (81.0%). The *tetK* and *tekM* genes were detected together in 10 *S. aureus* isolates (25.6%). Six *S. aureus* from the hospital (16.7%) harboured *ermC* gene. The *aacA-aphD* gene was found by PCR in 12 *S. aureus* isolates (3 from hospital and 9 were community-acquired). The *blaZ* gene detection rate was significantly higher in hospital-acquired *S. aureus* with 15 isolates (81.0%) than in community-acquired isolates with only 6 (55.6%) ($P = 0.025$). No statistical differences were observed for the detection of remaining antibiotic genes.

The correlation between phenotypic resistance and detection of resistance-associated genes for food and clinical isolates was demonstrated in Table 3. In *S. aureus* from food samples correspondence between phenotypic resistance and associated genes was 45.5% and 50.0% concerning penicillin and methicillin, respectively. For tetracycline resistant isolates 46.7% and 53.3% harboured *tetK* and *tetM*, respectively. Both genes were detected in

Table 2 Distribution of antimicrobial resistance genes of food and clinical isolates

| Antibiotic agent | Target genes | Food isolates (n = 51) | | P value | Clinical isolates (n = 45) | | | P value |
|------------------|------------------|---------------------------|---------------|---------|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------|
| | | <i>S. aureus</i> (n = 33) | CoNS (n = 18) | | Hospital acquired isolates (n = 18) | Community acquired isolates (n = 27) | | |
| | | | | | | <i>S. aureus</i> (n = 18) | <i>S. aureus</i> (n = 21) | |
| Tetracycline | <i>tetM</i> | 22 (66.67%) | 16 (88.89%) | 0.103 | 10 (55.56%) | 17 (80.95%) | 2 (33.33%) | 0.162 |
| | <i>tetK</i> | 13 (39.39%) | 4 (22.22%) | 0.351 | 6 (33.33%) | 11 (52.38%) | 1 (16.67%) | 0.333 |
| Erythromycin | <i>ermA</i> | 0 (0.00%) | 0 (0.00%) | ND | 0 (0.00%) | 0 (0.00%) | 0 (0.00%) | ND |
| | <i>ermC</i> | 2 (6.06%) | 1 (5.56%) | 1.000 | 1 (5.56%) | 5 (23.81%) | 0 (0.00%) | 0.189 |
| Gentamicin | <i>aacA-aphD</i> | 6 (18.18%) | 3 (16.67%) | 1.000 | 3 (16.67%) | 9 (42.86%) | 2 (33.33%) | 0.095 |
| Penicillin | <i>blaZ</i> | 15 (46.87%) | 10 (88.89%) | 0.565 | 6 (33.33%) | 15 (80.95%) | 2 (33.33%) | 0.025 |
| Methicillin | <i>mecA</i> | 15 (46.87%) | 10 (88.89%) | 0.565 | 17 (94.44%) | 19 (90.48%) | 6 (100%) | 1.000 |

Table 3 Correlation between phenotypic resistance and detection of resistance-associated genes of food and clinical isolates

| Antibiotic | Gene(s) | Food isolates (n = 51) | | | | Clinical isolates (<i>S. aureus</i> n = 39) | | | |
|--------------|---------------------------|---------------------------|----------------|-----------------------|----------------|--|----------------|--------------------------------------|----------------|
| | | <i>S. aureus</i> (n = 33) | | CoNS (n = 18) | | Hospital-acquired isolates (n = 18) | | Community-acquired isolates (n = 21) | |
| | | Phenotypic resistance | Gene detection | Phenotypic resistance | Gene detection | Phenotypic resistance | Gene detection | Phenotypic resistance | Gene detection |
| Penicillin | <i>blaZ</i> | 33 | 15 (45.5%) | 15 | 7 (46.7%) | 17 | 6 (35.3%) | 19 | 13 (68.4%) |
| Methicillin | <i>mecA</i> | 2 | 1 (50.0%) | 3 | 1 (33.3%) | 7 | 7 (100%) | 14 | 13 (92.8%) |
| Gentamicin | <i>aacA-aphD</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 (33.3%) |
| Erythromycin | <i>ermC</i> | 3 | 0 | 1 | 1 (100%) | 5 | 1 (20.0%) | 11 | 4 (36.4%) |
| Tetracycline | <i>tetM</i> | 15 | 8 (53.3%) | 10 | 9 (90.0%) | 8 | 4 (50.0%) | 10 | 9 (90.0%) |
| | <i>tetK</i> | | 7 (46.7%) | | 2 (20.0%) | | 4 (50.0%) | | 8 (80.0%) |
| | <i>tetM</i> + <i>tetK</i> | | 5 (33.3%) | | 2 (20.0%) | | 2 (25.0%) | | 7 (70.0%) |

33.3%. In clinical isolates the correlation between resistance and *mecA* gene was very high with 100% and 92.8% in hospital-acquired and community-acquired *S. aureus*.

Discussion

The results of this study showed less prevalence of *S. aureus* resistant to oxacillin in food isolates (6.1%) compared to those reported previously 67.5% [35], 38.0% [36] and 17.3% [37].

The prevalence of oxacillin-resistance in clinical isolates was slightly similar to previous study in Algiers [38] but lower than another study in eastern Algeria [39].

Staphylococcus aureus from food and clinical samples were phenotypically oxacillin-resistant with 6.1% and 46.2%, respectively. From isolates 46.8% and 92.3% of them harboured the *mecA* gene, respectively. In contrast, 38.0% of Portuguese *S. aureus* strains from food samples were resistant to oxacillin but only 0.7% of them harboured *mecA* gene [36] and in Libya, *mecA* gene was not detected by PCR in MRSA isolated from hospitalized patients [40].

In Morocco, Kenya, Nigeria and Cameroun relatively high occurrence rates of MRSA were reported [41]. In Algeria, the majority of MRSA did not represent a high multidrug resistance rate [41, 42].

All isolates from food were resistant to penicillin which was in agreement with previous reports [37, 43, 44] but significantly higher than reported in other studies [35, 36, 45].

Staphylococcus aureus isolated from clinical samples were highly resistant to penicillin (>90.0%) which is in agreement with previous studies [46–49].

The presence of the *blaZ* gene did not influence production of β -lactamase alone [50, 51]. Here, not all penicillin-resistant *S. aureus* isolates from food (45.5%) and clinical samples (52.8%) possessed *blaZ* gene.

All *S. aureus* isolates from food samples were susceptible to gentamicin, which agrees with several reports [36, 52, 53]. In all clinical isolates, the resistance rate of *S. aureus* to gentamicin was 7.7% which was similar (7.0%) with a study performed in Algeria [25]. In Algeria, no resistance to gentamicin was found in staphylococci in milk [54, 55]. One *S. aureus* isolate exhibiting phenotypic resistance to gentamicin harboured the *aacA-aphD* gene which is in contrast to previous studies [16, 33]. In this study, *aacA-aphD* was detected more often in staphylococci isolates from clinical (31.1%) than those of food origin (17.6%).

Staphylococcus aureus isolates from food were slightly resistant to erythromycin (9.1%) which was higher than 5% reported previously in Portugal [36], but significantly lower than detected in China and Turkey [37, 56].

The resistance of clinical *S. aureus* to erythromycin was higher than reported previously in Algerian hospitals [25]. The *ermA* gene encoded erythromycin-resistance could not be detected in both *S. aureus* and CoNS from clinical and food origin. In contrast, high rate of *ermA* and *ermC* genes in MRSA isolates from hospitalized patients was determined [57]. The correlation between phenotypic susceptibility testing and detection of *ermC* gene was 31.3% which was lower than obtained previously [16, 33]. In Libya, *ermA* and *ermC* genes could not be detected in erythromycin-resistant *S. aureus* [40].

The resistance of *S. aureus* isolated from food samples to tetracycline was higher than reported formerly in China [56], in Italy [6], in Portugal [36] and in Turkey [45]. Tetracycline resistance of *S. aureus* isolated from clinical samples was considered lower than reported before [25, 48]. There was no significant difference between tetracycline resistance in staphylococci isolated from food and clinical samples. In contrast, a higher resistance rate to tetracycline in food isolates compared to clinical isolates was described [52]. The *tetK* and *tetM* genes were detected in 53.3% and 60.0% in resistant *S. aureus* from food samples, respectively. In clinical *S. aureus* isolates, the correlation rate between phenotypic resistance and prevalence of *tetM* and *tetK* genes was 72.2% and 66.7%, respectively. The discrepancy between phenotypic resistance to tetracycline and resistance determinants may attributed to other mechanisms [15, 58].

Vancomycin was the most effective antimicrobial agent against MRSA [41, 59]. In this study, three *S. aureus* strains from food showed resistance to vancomycin. In Turkey, 21.7% of *S. aureus* isolated from food samples were resistant to vancomycin [37].

Most of CoNS isolates were resistant to penicillin, tetracycline and erythromycin. In addition, 16.7% of CoNS isolated from food samples were confirmed phenotypically as methicillin-resistant CoNS (MR-CoNS). The *mecA* gene was detected in 75.0% of isolated CoNS which was in agreement with previous study [33]. The *ermC* gene was detected only in one CoNS isolate (5.6%) which was in accordance with formerly reports [33, 60]. In contrast, staphylococci isolated in Turkey showed high detection rate of *ermC* and *ermA* [61, 62].

In conclusion, the high prevalence of resistance to penicillin, tetracycline and erythromycin was particularly alarming. The knowledge about antibiotic resistance of staphylococci originated from daily food from markets and of community-acquired *S. aureus* is not fully addressed in Algeria, yet. Information concerning resistance in CoNS is very limited in this country. Vancomycin-resistant isolates were found in food isolates not in clinical ones. This study considered a first impression on existing situation concerning antibiotic

resistance on staphylococci from food and clinical sources. Surveillance on antibiotic resistance and characterization of staphylococci in Algeria is mandatory.

Limitations

This study used exclusively samples from cities of Médéa and Ain Defla provinces, Algeria which limits the generalisation of the results.

Abbreviations

CoNS: coagulase negative Staphylococcus; PCR: polymerase chain reaction; P: penicillin; OX: oxacillin; FOX: cefoxitin; AMC: amoxicillin + clavulanic acid; GM: gentamicin; E: erythromycin; K: kanamycin; TE: tetracycline; VA: vancomycin; CL: clindamycin; RIF: rifampicin; STX: trimethoprim/sulfamethoxazole; S: susceptible; R: resistant; I: intermediate.

Authors' contributions

RA, ZC, IN and TMH participated in the conception and design of the study. RA and ZC performed the farm and laboratory work. RA, HE, ZC, IN, TMH, HN and HH analyzed the data, wrote the manuscript and contributed to manuscript discussion. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Faculty of Sciences, Yahia Farès University, Urban Pole, Médéa, Algeria. ² High National Veterinary School, Issad Abbes Avenue, Oued Smar, Algiers, Algeria. ³ Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University, Tayfur Sokmen Campus, 31000 Hatay, Turkey. ⁴ Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Friedrich-Loeffler-Institut, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Germany. ⁵ Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Kafrelsheikh University, Kafr El-Sheikh 35516, Egypt.

Acknowledgements

The authors thank Byrgit Hofmann at Friedrich-Loeffler-Institut, Institute of Bacterial Infections and Zoonoses Germany for her excellent technical assistance.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Study protocol was approved by Medical Ethics Research Committee of the Yahia Farès University, Urban Pole, Médéa, Algeria and from the managers of the hospital in which the study was conducted. Informed written consent was obtained from each participant in the study. Confidentiality and personal privacy was respected in all levels of the study. Collected data will not be used for any other purpose.

Funding

Not applicable.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 14 June 2018 Accepted: 1 September 2018

Published online: 12 September 2018

References

- Booth M, Pence L, Mahasreshti P, Callegan M, Gilmore M. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect Immun*. 2001;69:345–52.
- Chiang Y, Liao W, Fan C, Pai W, Chiou C, Tsen H. PCR detection of staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int J Food Microbiol*. 2008;121:66–73.
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*. 2003;2:63–76.
- Helmy YA, El-Adawy H, Abdelwhab EM. A comprehensive review of common bacterial, parasitic and viral zoonoses at the human-animal interface in Egypt. *Pathogens*. 2017;6(3):1–28.
- Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt T, Cookson B, Kearns A. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2384–90.
- Pesavento G, Ducci B, Comodo N, Nostro A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: a research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control*. 2007;18:196–200.
- Kennedy A, Otto M, Braughton K, Whitney A, Chen L, Mathema B, et al. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105:1327–32.
- El-Adawy H, Ahmed M, Hotzel H, Monecke S, Schulz J, Hartung J, et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from healthy turkeys and broilers using DNA microarrays. *Front Microbiol*. 2016;7:2019.
- Lozano C, Aspiroz C, Rezusta A, Gomez-Sanz E, Simon C, Gomez P, et al. Identification of novel *vga(A)*-carrying plasmids and a Tn5406-like transposon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* of human and animal origin. *Int J Antimicrob Agent*. 2012;40:306–12.
- Waters A, Contente-Cuomo T, Buchhagen J, Liu C, Watson L, Pearce K, et al. Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US meat and poultry. *Clin Infect Dis*. 2011;52:1227–30.
- Olsen J, Christensen H, Aarestrup F. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:450–60.
- Berger-Bächi B, Senn M, Ender M, Seidl K, Hübscher J, Schulthess B, et al. Resistance to β -lactam antibiotics. In: Crossley B, Jefferson K, Archer G, Fowler V, editors. *Staphylococci in human disease*. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009.
- David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23:616–87.
- Baron E. Genetic aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods used for its detection in clinical laboratories in the United States. *J Chemother*. 1995;7(Suppl 3):87–92.
- Schmitz F, Krey A, Sadurski R, Verhoef J, Milatovic D, Fluit A. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47:239–40.
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4089–94.
- Trzcinski K, Cooper B, Hryniewicz W, Dowson C. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2000;45:763–70.
- Maravic G. Macrolide resistance based on the Erm-mediated rRNA methylation. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2004;4:193–202.
- Schmitz F, Fluit A, Gondolf M, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J, et al. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 1999;43:253–9.
- Torres Garcia M, Tejedor Junco M, Gonzalez Martin M, Gonzalez Lama Z. Selection of subpopulations resistant to amikacin and netilmicin of gentamicin-resistant clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralbl Bakteriol*. 1996;284:58–66.
- Vanhoof R, Godard C, Content J, Nyssen H, Hannecart-Pokorni E. Detection by polymerase chain reaction of genes encoding

- aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. Belgian study group of hospital infections (GDEPIH/GOSPIZ). J Med Microbiol. 1994;41:282–90.
22. Khan S, Nawaz M, Khan A, Cerniglia C. Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strains of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2000;38:1832–8.
 23. Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. Infect Drug Res. 2015;8:49–61.
 24. Ouchenane Z, Smati F, Rolain JM, Raoult D. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Algeria. Pathol Biol. 2011;59:e129–32.
 25. Ramdani-Bougoussa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:1083–5.
 26. Rebiahi S, Abdelouahid D, Rahmoun M, Abdelali S, Azzaoui H. Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria). Med Mal Infect. 2011;41:646–51.
 27. Hamiroune M, Berber A, Boubekeur S. Contribution to the study of *Staphylococcus* contamination of cows' milk on a number of farms in Algiers: its impact on human health. Rev Sci Tech. 2014;33(1035–41):27–34.
 28. ISO. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)—Part 1: technique using Baird-Parker agar medium. Geneva: ISO; 1999.
 29. Karmakar A, Dua P, Ghosh C. Biochemical and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from hospitalized patients. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2016;2016:7.
 30. CLSI. Clinical and laboratory standards institute, performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th ed. Wayne: CLSI; 2007.
 31. CA-SFM. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie; recommandations. France; 2014.
 32. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 1–V
 33. Martineau F, Picard F, Lansac N, Menard C, Roy P, Ouellette M, et al. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:231–8.
 34. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol. 2000;38:1032–5.
 35. Gundogan N, Citak S, Yucel N, Devren A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. Meat Sci. 2005;69:807–10.
 36. Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Characterization of enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiol. 2009;26:278–82.
 37. Guven K, Mutlu M, Gulbandilar A, Cakir P. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. Food Saf. 2010;30:196–212.
 38. Antri K, Rouzic N, Dauwalder O, Boubekri I, Bes M, Lina G, et al. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. Clin Microbiol Infect. 2011;17:526–32.
 39. Alioua M, Labid A, Amoura K, Bertine M, Gacemi-Kirane D, Dekhil M. Emergence of the European ST80 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of healthcare-associated infections in Eastern Algeria. Med Mal Infect. 2014;44:180–3.
 40. Zmantar T, Bekir K, Elgarsadi S, Hadad O, Bakhrouf A. Molecular investigation of antibiotic resistance genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from nasal cavity in pediatric service. Afr J Microbiol Res. 2013;7:4414–21.
 41. Kesah C, Ben Redjeb S, Odugbemi T, Boye C, Dosso M, Ndinya Achola J, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. Clin Microbiol Infect. 2003;9:153–6.
 42. Borg M, de Kraker M, Scicluna E, van de Sande-Bruinsma N, Tiemersma E, Momen J, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother. 2007;60:1310–5.
 43. Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. Int J Food Microbiol. 2007;118:186–93.
 44. Moon J, Lee A, Jaw S, Kang H, Joo Y, Park Y, et al. Comparison of antibiogram, staphylococcal enterotoxin productivity, and coagulase genotypes among *Staphylococcus aureus* isolated from animal and vegetable sources in Korea. J Food Prot. 2007;70:2541–8.
 45. Aydin A, Muratoglu K, Sudagidan M, Bostan K, Okuklu B, Harsa S. Prevalence and antibiotic resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in Turkey. Foodborne Pathog Dis. 2011;8:63–9.
 46. Goff DA, Dowzicky MJ. Prevalence and regional variation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the USA and comparative in vitro activity of tigecycline, a glycylcycline antimicrobial. J Med Microbiol. 2007;56:1189–93.
 47. Denton M, O'Connell B, Bernard P, Jarlier V, Williams Z, Henriksen A. The EPISA study: antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing primary or secondary skin and soft tissue infections in the community in France, the UK and Ireland. J Antimicrob Chemother. 2008;61:586–8.
 48. Sina H, Ahoyo T, Moussaoui W, Keller D, Bankole H, Barogui Y, et al. Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from skin, soft tissue, and bone related infections. BMC Microbiol. 2013;13:188.
 49. Cohen M. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. Science. 1992;257:1050–5.
 50. Haveri M, Suominen S, Rantala L, Honkanen-Buzalski T, Pyorala S. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. Vet Microbiol. 2005;106:97–102.
 51. Takayama Y, Tanaka T, Oikawa K, Fukano N, Goto M, Takahashi T. Prevalence of *blaZ* gene and performance of phenotypic tests to detect penicillinase in *Staphylococcus aureus* isolates from Japan. Ann Lab Med. 2018;38:155–9.
 52. El-Ghodban A, Ghenghesh K, Marialigeti K, Esahli H, Tawil A. PCR detection of toxic shock syndrome toxin of *Staphylococcus aureus* from Tripoli. Libya. J Med Microbiol. 2006;55:179–82.
 53. Pu S, Wang F, Ge B. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from Louisiana retail meats. Foodborne Pathog Dis. 2011;8:299–306.
 54. Saidi R, Cantekln Z, Khelef D, Ergun Y, Solmaz H, Kaidi R. Antibiotic susceptibility and molecular identification of antibiotic resistance genes of staphylococci isolated from bovine mastitis in Algeria. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2015;21:513–20.
 55. Chaalal W, Aggad H, Zidane K, Saidi N, Kihal M. Antimicrobial susceptibility profiling of *Staphylococcus aureus* isolates from milk. Br Microbiol Res J. 2016;13:1–7.
 56. Chao G, Zhou X, Jiao X, Qian X, Xu L. Prevalence and antimicrobial resistance of foodborne pathogens isolated from food products in China. Foodborne Pathog Dis. 2007;4:277–84.
 57. Ardic N, Ozyurt M, Sareyyupoglu B, Haznedaroglu T. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. Int J Antimicrob Agents. 2005;26:213–8.
 58. Schwarz S, Roberts M, Werckenthin C, Pang Y, Lange C. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. Vet Microbiol. 1998;63:217–27.
 59. Al-Zoubi M, Al-Tayyar I, Hussein E, Jabali A, Khudairat S. Antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in Northern area of Jordan. Iran J Microbiol. 2015;7:265–72.
 60. Eady E, Ross J, Tipper J, Walters C, Cove J, Noble W. Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. J Antimicrob Chemother. 1993;31:211–7.
 61. Aktas Z, Aridogan A, Kayacan C, Aydin D. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. J Microbiol. 2007;45:286–90.
 62. Cetin E, Gunes H, Kaya S, Aridogan B, Demirci M. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcal isolates in a Turkish university hospital. J Microbiol Immunol Infect. 2010;43:524–9.