

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة الجزائر
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE- ALGER



THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT
Option : Élevage et Pathologies aviaires et cunicoles

THÈME

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM) chez les
animaux de basse-cour :

Portage et sensibilité aux autres familles d'antibiotiques

Présentée par :

BOUNAR-KECHIH Saliha

Soutenue le 25 Septembre 2019

Devant la commission de Jury

Directeur de thèse : Pr HAMDY Taha Mossadak	ENSV
Président de jury : Pr KHELEF Djamel	ENSV
Examinateur : Dr BOUAYAD Leila	ENSV
Examinateur : Pr EL-GROUD Rachid	Université de Constantine
Examinateur : Dr BENSID Abdelkader	Université de Djelfa
Examinateur : Dr HOUICHER Abderrahmane	Université de Laghouat

Année Universitaire
2018-2019

Remerciements

Je remercie en premier lieu, Dieu le tout puissant de m'avoir fait naître musulmane et pour la volonté, la santé et surtout la patience qu'il m'a donné durant toutes ces longues années d'études afin que je puisse arriver là où je suis.

À Monsieur le Professeur HAMDY Taha Mossadak

Honorable Maître, votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre patience et votre amour du travail m'ont conquis. C'est le lieu ici pour vous dire merci pour tout.

Que Dieu vous donne longue vie. Soyez assuré cher Maître de ma gratitude et de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur KHELEF Djamel

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de bien vouloir présider le jury de cette thèse. Nous vous remercions pour votre disponibilité. Veuillez croire à notre profonde et sincère reconnaissance et à toute notre sympathie.

À Madame le Docteur BOUAYAD Leila

Votre parcours est un exemple pour moi ; c'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger à ce jury. Veuillez croire en ma profonde gratitude et mon profond respect.

À Monsieur le Professeur EL-GROUD Rachid

Enfin ; est venu le jour où je peux vous rencontrer ; votre thèse sur les salmonelles a été d'un grand apport pour moi lors de la préparation de mon magister. Merci d'avoir bien voulu vous intéresser à ce travail et accepter avec gentillesse de faire partie de ce jury.

À Monsieur le Docteur BENSID Abdelkader

Je vous suis extrêmement reconnaissante d'avoir accepté de participer au jury de soutenance de ma thèse.

À Monsieur le Docteur HOUICHER Abderrahmane

Toute ma reconnaissance pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail, je vous témoigne de mon profond respect.

À Monsieur le Docteur INTAKHAB ALLIM

Enfin ; le jour est venu pour remercier le scientifique qui, malgré les nombreuses occupations a porté un intérêt particulier à mon projet. Son aide compétente, sa patience et son encouragement, son œil critique m'ont été très précieux pour structurer et améliorer la qualité de ce travail. Je vous en suis profondément reconnaissante.

À Monsieur le Professeur AGGAD Habib

Pour sa gentillesse, son respect, sa disponibilité, travailler avec vous était un véritable plaisir

À Monsieur le Professeur ALLOUI Nadir

Professeur, vous avez toujours répondu présent à toutes mes sollicitations, je vous en suis très reconnaissante et vous remercie infiniment.

À Monsieur le Docteur Zafer CANTEKIN, qui n'a jamais cessé de répondre à toutes les questions que je me posais. Pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, merci pour tout et j'espère pouvoir travailler d'avantage avec vous dans le futur.

À Madame le Professeur RAMDANI –BOUGUESSA Nadjia, j'étais très honorée de la connaître, d'échanger les idées sur la thématique.

À Madame la Directrice générale de l'Institut National de la Médecine Vétérinaire Dr HADJ AMMAR Djamila pour son soutien, ses encouragements pour valoriser les travaux effectués au niveau des laboratoires de notre institut. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.

À tout le personnel du laboratoire vétérinaire régional de Draa-Ben-Khedda.

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

Dédicaces

Je dédie cette thèse,

À la mémoire de ma mère qui, restera à jamais dans mes pensées.

Que Dieu le tout puissant t'accueille dans son vaste paradis.

À mon père pour l'éducation qu'il nous a donnée, ses encouragements et l'amour de la science et du savoir qu'il nous a transmis. Merci pour tout.

À mon époux, pour son soutien tout le long de ma carrière.

À mes enfants chéris Yasmine, Mohamed Amine et Imane, avec tout mon amour et ma tendresse, j'espère que vous ferez mieux que maman.

À mes sœurs chéries qui ont toujours été à mes côtés Malika, Fatima et surtout ma tendre Zineb, mon exemple Ghania et ma douce Fatma Zehra.

À mes frères Bachir Kamel et Cherif mais surtout mon grand frère, exemple de la réussite : Khaled qui m'a été d'un grand apport pour la finalisation de ce travail et qui m'a toujours guidé depuis mon enfance sans oublier ma très chère et tendre belle-sœur Jane.

À toute ma famille et ma belle-famille.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Le genre <i>Staphylococcus</i>	3
1. Caractéristiques générales	3
2. Critères d'identification	6
2.1. Caractères morphologiques	6
2.2. Caractères cultureux.....	7
2.3. Caractères biochimiques	8
2.4. Caractères distinctifs des différentes espèces de <i>Staphylococcus</i>	10
2.4.1. Staphylocoagulase libre	10
2.4.2. ADNase thermostable	10
2.4.3. Les galeries d'identification.....	10
2.4.3.1. API Staph.....	10
2.4.3.2. ID 32 Staph	11
2.4.4. VITEK 2.....	11
3. Facteurs de virulence et Pathogénie.....	11
3.1. Protéines de surface : colonisation.....	12
3.2. Facteurs protégeant la bactérie de la phagocytose	12
3.3. Facteurs conduisant à l'extension de l'infection.....	12
3.3.1. Extension locale.....	12
3.3.2. Diffusion hématogène.....	13
3.4. Les toxines	13
3.4.1. Les entérotoxines, TSST1 (toxine du choc staphylococcique) et exfoliatines.....	13
3.4.2. La gamma-toxine (toxine γ) et la Leucocidine de Pantón-Valentine (LPV).....	14
3.4.3. Les hémolysines.....	14
3.4.4. Les entérotoxines.....	15
4. Transmission	15
5. Pouvoir pathogène naturel	16

6. Flores commensales animales.....	16
7. Flore normale du système respiratoire.....	16
8. Portage de <i>Staphylococcus spp</i>	17
II. Diagnostic de laboratoire	18
1. Méthodes de détection des staphylocoques	18
1.1. Méthodes phénotypiques.....	19
1.1.1. Résistance aux principaux antibiotiques anti-staphylococciques	20
1.1.1.1. Résistance à la pénicilline G.....	20
1.1.1.2. Résistance à l'oxacilline	20
1.1.1.3. Résistance aux aminosides.....	23
1.1.1.4. Résistance aux glycopeptides.....	23
1.1.1.5. Résistance aux Macrolides, Lincosamides, Streptogramine (MLS).....	24
1.1.1.6. Résistance aux fluoroquinolones.....	25
1.1.1.7. Autres résistances	25
1.2. Identification de l'espèce des staphylocoques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	26
1.3. Méthodes génotypiques	26
1.3.1. Application de la PCR	26
1.3.1.1. Techniques d'identification	27
1.3.1.2. Techniques de caractérisation de la virulence	28
1.3.1.3. Techniques de typage.....	30
1.3.1.4. Techniques d'analyse de la résistance aux antibiotiques	32

PARTIE EXPERIMENTALE

Objectifs	33
------------------------	-----------

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

1. Méthodologie	34
2. Lieu et période de l'étude	35
3. Zone d'étude	35

4. Échantillonnage.....	36
5. Méthode	36
5.1. Prélèvements nasaux.....	36
5.1.1. Chez la volaille et la dinde.....	36
5.1.2. Chez le bovin	36
6. Transport et conservation des prélèvements	37
7. Étude bactériologique	37
7.1. Milieux d'enrichissement	37
7.2. Milieux d'isolement.....	37
7.3. Isolement.....	38
7.3.1. Isolement direct.....	38
7.3.2. Isolement après enrichissement.....	38
7.4. Caractéristiques des colonies	38
7.4.1. Aspect macroscopique	38
7.4.2. Coloration de Gram	39
7.4.3. Purification des isolats.....	39
7.4.4. Identification biochimique	40
8. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	46
8.1. Technique de l'antibiogramme par diffusion des disques en milieu gélosé de Muller- Hinton	46
8.2. Choix des antibiotiques.....	46
8.3. Antibiotiques testés.....	46
8.4. Antibiogramme	48
8.5. Application des disques d'antibiotiques	48
9. Recherche des CMI	48
10. Recherches complémentaires obligatoires de la résistance de <i>S. aureus</i> à l'oxacilline.....	49
10.1. Recherche de la résistance de <i>Staphylococcus</i> spp. à l'oxacilline.....	49
10.2. Test de screening à l'oxacilline pour <i>Staphylococcus aureus</i>	49
10.3. Recherche de la bêta-lactamase	51
11. Conservation des isolats	51
12. Caractérisation génotypique des isolats de <i>Staphylococcus spp</i>	52
12.1. Préparation des isolats pour l'étude moléculaire	52

12.2. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	53
13. Caractérisation des gènes de résistances.....	56
13.1. Extraction d'ADN bactérien	56
13.2. Détection du gène <i>mecA</i> , <i>mecC</i> (<i>mecALGA251</i>), <i>SPA</i> et <i>PVL</i>	56
13.2.1. Chez les <i>Staphylococcus aureus</i>	56
13.2.2. Chez les isolats <i>Staphylococcus</i> à coagulase négative	59
14. Exploitation des résultats.....	64

CHAPITRE II : RESULTATS

1. Répartition des <i>Staphylococcus</i> spp. par espèce animale	65
2. Répartition des <i>Staphylococcus aureus</i> par espèces animales.....	67
3. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	70
3.1. Étude de la sensibilité aux antibiotiques des isolats de <i>S aureus</i> par espèce animale	72
3.1.1. Chez les bovins	72
3.1.2. Chez les poules pondeuses.....	73
3.1.3. Chez les poulets de chair	74
3.1.4. Chez les dindes de chair	75
4. SARM et SASM : Caractérisation phénotypique	76
4.1. Répartition des <i>S. aureus</i> méthicillino résistant par espèce animale	76
4.2. Répartition du portage et des résistances aux antibiotiques des SARM et des SASM selon l'espèce animale	77
4.2.1. Profils de résistance des SARM et des SASM aux antibiotiques chez les bovins	77
4.2.2. Chez les gallinacées.....	78
4.2.2.1. Phénotypes de multi résistance des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> chez les poules pondeuses	78
4.2.2.2. Phénotypes de multi résistance des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> chez les poulets de chair	80
4.2.2.3. Phénotypes de multi résistance des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> chez la dinde de chair.....	82
5. Caractéristiques moléculaire des isolats de <i>Staphylococcus</i> sp. isolées chez les différentes espèces animales	84
5.1. Confirmation génotypique du genre et de l'espèce.....	84

5.1.1. Caractéristiques des isolats d'origine bovine.....	87
5.1.2. Caractéristiques des isolats d'origine aviaire	88
5.2. Quantification de produits de PCR purifiés par migration sur gel d'agarose	90

CHAPITRE III : DISCUSSION

1. Prévalence de <i>Staphylococcus aureus</i> chez les espèces étudiées	93
1.1. Bovins	93
1.2. Volaille.....	93
1.2.1. Chez l'espèce <i>Gallus gallus</i>	93
1.2.1.1. Chez les poules pondeuses.....	94
1.2.1.2. Chez le poulet de chair.....	94
1.2.2. Chez l'espèce <i>Meleagris</i> (Dinde).....	95
2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	96
2.1. Choix des antimicrobiens.....	96
2.2. Résultats phénotypiques.....	96
2.2.1. β -Lactamines.....	96
2.2.1.1. Bovins	97
2.2.1.2. Volaille.....	98
2.2.2. Résultats des tests complémentaires : Prévalence des <i>Staphylococcus aureus</i> méthicillino-résistants (SARM) chez les espèces étudiées	99
2.2.2.1. Bovins	99
2.2.2.2. Volaille.....	100
2.2.3. Aminosides	102
2.2.3.1. Macrolides et Lincosamides.....	103
2.2.3.2. Érythromycine et la clindamycine	103
2.2.4. Tétracyclines	105
2.2.4.1. Bovins	105
2.2.4.2. Volaille.....	106
2.2.5. Association triméthoprine/sulfaméthoxazole.....	106
2.2.5.1. Bovins	107
2.2.5.2. Volaille.....	107

2.2.6. Fluoroquinolones	108
2.2.6.1. Bovins	108
2.2.6.2. Volaille.....	109
2.2.6. Glycopeptides	109
2.2.6.1. Bovins	110
2.2.6.2. Volaille.....	110
2.2.7. Profil de multi résistance des <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques	111
2.2.7.1. Bovins	111
2.2.7.2. Poules pondeuses	113
2.2.7.3. Poulet de chair	114
2.2.7.4. Chez la dinde de chair.....	115
3. Caractéristiques moléculaires des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées à partir de différentes espèces animales	115
3.1. Phénotype de résistance et profil pathogénique des isolats d'origine bovine.....	116
3.2. Phénotype de résistance et profil pathogénique des isolats d'origine aviaire : Poulet de chair et poules pondeuses.....	117
CONCLUSION.....	119
PERSPECTIVES	121

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RESUMÉS

ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
Agr	Accessory Gene Regulator
AMC	Amoxicilline + acide clavulanique
ARN	Acide Ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
CA-MRSA	Community-Acquired Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CCR	Cassette Chromosome Recombinase
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institut
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMN	Clindamycine
DBK	Draa-Ben-Khedda
DC	Dinde de chair
ENR	Enrofloxacin
ES	Entérotoxines Staphylococciques
E-Test	Epsilometer Test
Fc	Fragment constant
FOX	Céfoxitine
GEN	Gentamicine
GSC	Gélose au Sang Cuit
GSF	Gélose au Sang Frais
HA-MRSA	Healthcare-Associated Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
IgG	Immunoglobuline de classe G
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
KAN	Kanamycine
kDa	kilodalton
LA-MRSA	Livestock-Associated Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
LPV	Leucocidine de Panton-Valentine
LVR	Laboratoire Vétérinaire Régional
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight
MLST	Multilocus Sequence Typing

M-PCR	Multiplex PCR
NEO	Néomycine
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la méticilline
NaCl	Chlorure de sodium
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OXA	Oxacilline
PBP / PLP	Penicilline Binding Protein / Protéine de Liaison à la Pénicilline
PC	Poulets de Chair
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEN	Pénicilline
PLP2 a	Protéine de Liaison à la Pénicilline Additionnelle
PM	Poids Moléculaire
PNOV	Pénicilline + Novobiocine
PP	Poules Pondeuses
RT-PCR	Real Time PCR
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méthicilline
SARM-C	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méticilline d'origine communautaire
SARM-H	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méticilline Hospitalier
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> Sensible à la Méticilline
SCCmec	<i>Staphylococcal</i> Cassette Chromosome <i>mec</i>
SCN	Staphylocoques à Coagulase Négative
SCP	Staphylocoques à coagulase positive
SE	<i>Staphylococcal</i> Enterotoxins
TSST	Toxic Shock Syndrom Toxin
UI	Unité Internationale
SHT	Synergo-Hyménotropes Toxines
Spa	<i>Staphylococcus aureus</i> protein A gene
SSSS	Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
SXT	Triméthoprim/Sulfamethoxazole
TCY	Tétracycline
Triplex RT-PCR	Triplex Real Time PCR
TSS	Toxic Shock Syndrome

TSST1	Toxine du choc staphylococcique
UDG	Uracil-DNA Glycosylase
UFC	Unité Formant Colonie
VAN	Vancomycine
VISA	Vancomycine-Intermediate <i>S. aureus</i>
VRSA	Vancomycine Resistant <i>S. aureus</i>

LISTE DES TABLEAUX		
N°	Titre	Page
Tableau 1	Espèces et sous-espèces du genre <i>Staphylococcus</i> et hôtes associés.....	4
Tableau 2	Marqueurs biochimiques permettant de différencier <i>S. aureus</i> et <i>S. à coagulase négative</i>	9
Tableau 3	Flores commensales des cavités nasales et du pharynx	17
Tableau 4	Liste des antibiotiques testés	47
Tableau 5	Origine, date de prélèvements et matrice des différentes souches caractérisées	52
Tableau 6	Amorces utilisées pour la PCR.....	58
Tableau 7	Protocole d'amplification d'une triplex RT-PCR.....	61
Tableau 8	Répartition des cultures positives et négatives par espèce animale.....	65
Tableau 9	Répartition des <i>S.aureus</i> par espèce animale	67
Tableau 10	Résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des isolats de <i>S. aureus</i> isolés chez les différentes espèces animales étudiées.....	71
Tableau 11	Taux des SARM isolés par espèce animale	76
Tableau 12	Profils de résistance des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> SASM et SARM chez l'espèce bovine	77
Tableau 13	Profil de résistance des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> chez les gallinacés : poules pondeuses.....	79
Tableau 14	Profil de résistance des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> chez les gallinacés : poulets de chair	81
Tableau 15	Profil de résistance des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> chez la dinde de chair	83
Tableau 16	Synthèse des profils génotypiques de l'ensemble des isolats testés par PCR multiplexe.....	85
Tableau 17	Synthèse des profils génotypiques des souches testées par PCR multiplexe isolées chez l'espèce bovine.....	87
Tableau 18	Synthèse des profils génotypiques des souches testées par PCR multiplexe isolées chez le poulet de chair.....	89

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
Figure 1	Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie ordinaire et électronique à balayage	7
Figure 2	Schématisation du principe de la puce à ADN	29
Figure 3	Colonies de Staphylocoques sur gélose Chapman.....	38
Figure 4	Colonies de Staphylocoques sur gélose au sang	39
Figure 5	Test d'agglutination Pastorex.....	42
Figure 6	Galerie Api <i>Staph</i> et réactifs.....	43
Figure 7	Protocole de recherche des Staphylocoques dans les écouvillons.....	45
Figure 8	E. Test : Concentration inhibitrice, minimale.....	49
Figure 9	Détection de la résistance à la méthicilline.....	49
Figure 10	Test de la recherche de la résistance à l'oxacilline chez <i>S. aureus</i>	51
Figure 11	Principes et étapes d'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF.....	55
Figure 12	Migration sur gel d'agarose pour la détection des gènes <i>mecA</i> , <i>mecC</i> (<i>mecALGA251</i>), <i>lukF-PV (PVL)</i> and <i>spa</i>	59
Figure 13	Protocole d'amplification d'une triplex RT-PCR.....	63
Figure 14	Total des cultures positives et négatives sur l'ensemble des prélèvements analysés par espèce animale.....	66
Figure 15	Répartition des <i>Staphylococcus aureus</i> par espèce animale.....	68
Figure 16	Figure récapitulative de l'ensemble des prélèvements.....	69
Figure 17	Sensibilité aux antibiotiques des isolats de <i>S. aureus</i> d'origine bovine.	72
Figure 18	Sensibilité aux antibiotiques des isolats de <i>S. aureus</i> isolées chez les poules pondeuses.....	73
Figure 19	Sensibilité aux antibiotiques des isolats de <i>S. aureus</i> isolées chez les poulets de chair	74
Figure 20	Sensibilité aux antibiotiques des isolats de <i>S. aureus</i> isolées chez la dinde de chair.....	75
Figure 21	Distribution des SARM par espèce animale.....	76
Figure 22	Gel électrophorétique d'agarose montrant les produits d'amplification des gènes <i>spa</i> ; <i>mecA</i> , <i>mecC</i> et <i>PVL</i> extrait à partir de souche de <i>S. aureus</i> de portage isolées à partir des bovins et du poulet de chair.....	91

INTRODUCTION

La propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques multiplie les situations d'impasse thérapeutique, et entraîne des dizaines de milliers de décès humains par an, cette situation suscite aujourd'hui une inquiétude mondiale (Berger, 2016).

Ennemi intime et permanent depuis la nuit des temps ; le *Staphylococcus aureus* fut démasqué dès la fin du XIX^{ème} siècle. Son habitat naturel est constitué par les flores cutanées et muqueuses animales et humaines et également environnementales (Jehl *et al.*, 2010) ; avec une importante variabilité survenant à différentes périodes et lieux avec divers types de clones et profils de résistance aux antibiotiques selon les régions et les pays (Kopp *et al.*, 2004) .

Depuis sa description initiale au Royaume-Uni en 1961, *S. aureus* résistant à la Méthicilline (SARM) (Prescott *et al.*, 2014) s'est propagé au niveau mondial (Pantosti, 2009).

Initialement, les isolats de SARM n'étaient détectés qu'en milieu hospitalier (hospital-acquired methicillin-resistant *S. aureus* -HA-MRSA). Dans les années 1990, sont apparues des infections communautaires dues à des isolats identifiés comme community-acquired (CA)-MRSA. La troisième vague de ce « paysage dynamique » de l'évolution des SARM a été la découverte inattendue de isolats associées au bétail livestock-associated (LA)-MRSA (Prescott *et al.*, 2014). Il est maintenant retrouvé colonisant plusieurs espèces animales, comme les chevaux (Robinson *et al.*, 2003 ; Stein *et al.*, 2009), les bovins (Labro *et al.*, 2014), les chiens et chats (Schijffelen *et al.*, 2010 ; Köck *et al.*, 2013), les lapins (Köck *et al.*, 2013), les poulets (Duquette *et al.*, 2004 ; Couto *et al.*, 2011 ; Walther *et al.*, 2012), les porcs (Loeffler *et al.*, 2005) et l'homme en contact avec eux.

Le développement des outils de biologie moléculaire a permis de préciser l'épidémiologie des SARM (Prescott *et al.*, 2014) en identifiant les séquence types (ST) et les complexes clonaux (CC) caractéristiques des isolats humains et animaux, d'en définir ainsi les grands clades pandémiques et de montrer leur diffusion au niveau national et international (Pantosti *et al.*, 2009 ; Robinson, *et al.*, 2003). Un certain nombre de lignées « multi-hôtes » de SARM ont été identifiées, capables de coloniser et infecter un large éventail d'espèces de mammifères et d'oiseaux, et la possibilité que les animaux puissent servir de réservoirs de SARM a fait évoquer l'existence d'une zoonose émergente (Stein, 2009 ; Labro *et al.*, 2014 ; Prescott *et al.*, 2014). Ainsi, des isolats caractéristiques de LA-MRSA

peuvent coloniser les personnels agricoles, leur famille ou les vétérinaires (Schijffelen *et al.*, 2010 ; Köck *et al.*, 2013 ; Prescott *et al.*, 2014).

En général, les isolats de ces animaux ont des caractéristiques génétiques de SARM communautaires ou hospitaliers, d'origine humaine (Haenni *et al.*, 2012 ; Walther *et al.*, 2012 ; Prescott *et al.*, 2014). La première publication analysée démontre le brassage des souches du clade pandémique (EMRSA-15, epidemic MRSA-15) entre l'homme et les animaux et a examiné la prévalence du portage nasal de staphylocoques (Pantosti, 2009). Ces études renforcent l'idée qu'il existe un réservoir commun pour l'homme et les animaux à l'origine d'échanges bidirectionnels de SARM responsables de colonisations et d'infections (Prescott *et al.*, 2014). Les données moléculaires disponibles en Afrique du Nord, notamment dans certains hôpitaux en Algérie confirment la présence du clone ST80-SCCmec lié aux SARM-H avec des taux pouvant atteindre 75 % (Antri *et al.*, 2011 ; Ben Nejma *et al.*, 2013). Par ailleurs, des enquêtes ont été effectuées dans le secteur médical et ont confirmé la présence de tels isolats dans les lieux de confinement avec les animaux (Luini *et al.*, 2015). D'où l'intérêt d'effectuer une étude en médecine vétérinaire chez certains animaux de basse-cour qui contribuera à apporter des informations indispensables et qui serviront de base pour étudier d'autres espèces animales dans le but de recommander des mesures pratiques efficaces et adéquates pour combattre l'émergence de telles isolats chez l'homme. Ce travail a été réalisé pendant la période allant de 2009 à 2014 dans la région nord de l'Algérie regroupant les wilayas de Tizi-Ouzou, Boumerdès, Bouira et Bejaia qui constituent une région à vocation élevage.

Notre travail comporte deux parties :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique où sont décrits l'espèce *S. aureus*, son portage chez les animaux notamment ceux de la basse-cour, son épidémiologie et sa résistance aux antibiotiques.

La seconde partie est réservée à notre travail expérimental, qui comprend : le matériel et les méthodes utilisés, les résultats obtenus et leur discussion. Une conclusion, des recommandations et les perspectives termineront notre travail.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le genre *Staphylococcus*

1. Caractéristiques générales

Staphylococcus aureus est une source constante d'infection qui accompagne l'homme et les animaux. Commensal de la peau et des muqueuses, il est aussi à l'origine de toxémies (syndrome de choc toxique ou toxi-infections alimentaires) et des infections opportunistes pouvant être superficielles (furuncles), profondes (endocardites) ou septicémiques (Le Loir *et al.*, 2009)

D'abord observé par Robert Koch en 1878, il fut reconnu par Louis Pasteur qui, en 1879 observe et identifie dans du pus de furoncle et d'ostéomyélite un organisme unique, formé de petits points sphériques, réunis par couple, rarement par quatre, mais très fréquemment associés en petits amas. En 1883, Alexander Ogston crée le nom de « Staphylocoque » pour décrire ces grains (kokos) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (staphylos) et différencie ainsi *Staphylococcus* de *Streptococcus* (Stephen *et al.*, 2006). En 1974, avec les débuts de la biologie moléculaire, Baird-Parker conclue que les staphylocoques appartiennent à la famille des *Micrococcacæ* qui comprend quatre genres : *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* et *Planococcus* (Leclercq, 1989).

Avec l'évolution des techniques génomiques, la classification des staphylocoques s'est basée sur l'analyse des séquences des gènes codants pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S.

Le genre *Staphylococcus* appartient donc, à la famille des *Staphylococcacae* qui comprend de nombreuses espèces et sous espèces dont seules dix-huit ont été retrouvées chez l'homme quelquefois associées à des infections.

Les espèces sont généralement classées en deux groupes sur la base de leur capacité à produire une coagulase libre : les staphylocoques à coagulase positive (SCP), généralement considérés comme pathogènes et les staphylocoques à coagulase négative (SCN), réputés moins dangereux (Pellerin, 1995). À ce jour, une cinquantaine d'espèces et de sous espèces ont été identifiées au sein du genre *Staphylococcus* (Tableau 1).

Tableau 1 : Espèces et sous-espèces du genre *Staphylococcus* et hôtes associés
(Stepan *et al.*, 2004, Pantucek *et al.*, 2013)

Espèce/ Sous-espèce	Coagulase	Hôte ou source
<i>S. arletti</i>	-	Caprin, volaille
<i>S. aureus subsp. Anaerobius</i>	+	Ovin
<i>S. aureus subsp. aureus</i>	+	Homme, animaux, environnement
<i>S. auricularis</i>	-	Homme
<i>S. capitis subsp. Capitis</i>	-	Homme
<i>S. capitis subsp. ureolyticus</i>	-	Homme, primates
<i>S. caprae</i>	-	Homme, caprins
<i>S. carnosus subsp. Carnosus</i>	-	Produits carnés
<i>S. carnosus subsp. Utilis</i>	-	Aliments
<i>S. chromogenes</i>	-	Animaux, lait
<i>S. cohnii subsp. cohnii</i>	-	Homme
<i>S. cohnii subsp. urealyticum</i>	-	Homme, animaux
<i>S. condimenti</i>	-	Sauce au soja
<i>S. delphini</i>	+	Dauphins
<i>S. epidermidis</i>	-	Homme, animaux, environnement
<i>S. equorum subsp. equorum</i>	-	Chevaux, bétail
<i>S. equorum subsp. linens</i>	-	Surface fromage affiné
<i>S. felis</i>	-	chats
<i>S. fleurettii</i>	-	Fromage lait de chèvre
<i>S. gallinarum</i>	-	Volailles, oiseaux
<i>S. haemolyticus</i>	-	Homme, animaux domestique, environnement
<i>S. hominis subsp. hominis</i>	-	Homme
<i>S. hominis subsp. novobiosepticus</i>	-	Homme
<i>S. hyicus</i>	+	Animaux, aliments

Suite Tableau 1 : Espèces et sous-espèces du genre *Staphylococcus* et hôtes associés
(Stepan *et al.*, 2004, Pantucek *et al.*, 2013)

Espèce/ Sous-espèce	Coagulase	Hôte ou source
<i>S. intermedius</i>	+	Mammifère, oiseaux, rarement Homme
<i>S. kloosii</i>	-	Animaux sauvages
<i>S. lentus</i>	-	Animaux, rarement Homme
<i>S. lutrae</i>	+	Loutre
<i>S. muscae</i>	-	Mouches, porcs
<i>S. nepalensis</i>	-	chèvre
<i>S. pasteurii</i>	-	Homme, animaux, aliments
<i>S. pettenkoferi</i>	-	Homme
<i>S. piscifermentans</i>	-	Poisson fermenté
<i>S. pseudintermedius</i>	+	Animaux
<i>S. pulvereri</i>	-	Homme, animaux
<i>S. saccharolyticus</i>	-	Homme
<i>S. saprophyticus subsp. bovis</i>	-	Animaux
<i>S. saprophyticus subsp. saprophyticus</i>	-	Homme, animaux
<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	+	Chiens
<i>S. schleiferi subsp. schleiferi</i>	-	Homme
<i>S. sciuri subsp. carnaticus</i>	-	Produits carnés
<i>S. sciuri subsp. lentus</i>	-	Animaux
<i>S. sciuri subsp. rodentium</i>	-	Rongeurs, animaux
<i>S. sciuri subsp. sciuri</i>	-	Homme, animaux
<i>S. simiae</i>	-	Singe
<i>S. simulans</i>	-	Homme, mammifère
<i>S. succinus subsp. casei</i>	-	Surface de fromage affiné
<i>S. succinus subsp. succinus</i>	-	ambre
<i>S. vitulinus</i>	-	Animaux, aliments
<i>S. warneri</i>	-	Homme, primates
<i>S. xylosus</i>	-	Homme, Animaux, Environnement

S. aureus, le plus connu, peut être à l'origine d'infections cutanées superficielles ou profondes pouvant évoluer de façon isolée ou entraîner des septicémies. Chez l'homme, comme chez l'animal notamment la volaille et les ruminants, il provoque des furoncles, des folliculites, des abcès, de l'anthrax, des pleurésies, des péritonites, des ostéomyélites, des métrites, des cystites des arthrites et plus fréquemment des mastites chez la femme (Nussenblatt *et al.*, 2005) et des mammites chez les ruminants laitiers (Cohen *et al.*, 2007 ; Cunningham *et al.*, 1996 ; Le Loir *et al.*, 2010 ; Rainard *et al.*, 2010).

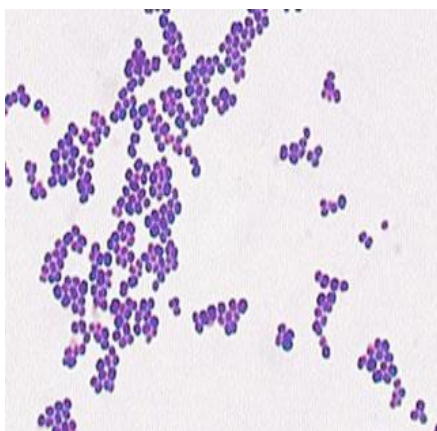
Le pied gonflé chez les gallinacés, est aussi due à une infection staphylococcique chronique, des tissus sous-cutanés, se caractérisant par des gonflements épais d'une ou plusieurs articulations (Biberstein *et al.*, 1999).

Staphylococcus aureus est aussi à l'origine de pathologies toxiques. Parmi lesquelles : le syndrome du choc toxique staphylococcique décrit à partir des années 1980 (Lowy, 1998), le neonatal toxic shock –syndrome- like exanthematous disease touchant surtout les nouveaux nés suite à une infection à *S. aureus* méthicillino-résistants portant des gènes codant pour la toxine du choc toxique staphylococcique ou TSST-1 (Kikuchi *et al.*, 2003) et le syndrome d'exfoliation généralisée produit par les toxines épidermolytiques (Yamasaki *et al.*, 2005)

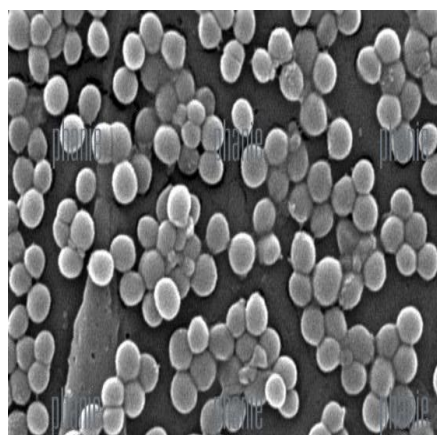
2. Critères d'identification

2.1. Caractères morphologiques

Les staphylocoques se présentent à l'examen microscopique sous l'aspect de coques à Gram positif isolés ou groupés en diplocoques ou en amas (Figure 1), mesurant 0,8 à 1 µm de diamètre, asporulés, parfois capsulés. En effet, *S. aureus* a été considéré comme une bactérie non capsulée néanmoins, la majorité des isolats isolés d'infections humaines et animales produisent des polyosides capsulaires qui forment des microcapsules non visibles en microscopie optique (Sutra *et al.*, 1998). Le mode de groupement dit en « grappe » ou en « amas » est plus caractéristique après culture sur un milieu gélosé (Kloos, *et al.*, 1981 ; Novick *et al.*, 1990 ; Fleurette *et al.*, 1990 ; Avril *et al.*, 1992 ; Garnier *et al.*, 2011). La disposition en amas s'explique par la division cellulaire des staphylocoques en trois plans successifs et perpendiculaires les uns aux autres, et par le fait que les cellules filles ne se séparent pas complètement de la cellule mère dont elles sont issues (EL Kouri *et al.*, 1998 ; Couture *et al.*, 1990).



Coloration de Gram (*Staphylococcus* sp)
Grossissement 1000x .Microscope optique
(<http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/photo2detail.php?id=231>)



Staphylococcus aureus (MEB) CDC-M. J.A.
Grossissement 9560x Microscope électronique à balayage
(<http://www.bacteriainphotos.com>)

Figure 1 : Aspect de *S. aureus* en microscopie ordinaire et électronique à balayage

2.2. Caractères cultureux

Les staphylocoques sont des bactéries aérobies anaérobies facultatives et se développent facilement sur les milieux usuels. La température optimale de croissance est de 30 °C à 45°C avec un maximum à 35±2 °C, le pH optimal est 7,5 mais de grandes variations sont tolérées (4,8 à 9,4). En bouillon ordinaire, la culture est rapide ; un trouble homogène puis un dépôt sont observés. Sur gélose ordinaire, les colonies sont lisses, rondes, bombées et leur diamètre est de un millimètre. La plupart des isolats élaborent un pigment jaune doré ou jaune-citron non diffusible dans le milieu. Le rôle physiologique de ce pigment n'est pas connu (Fasquelle, 1974 ; Couture, 1990 ; Le Minor et Veron, 1990).

Le milieu de Chapman est particulièrement utilisé, il ne laisse croître au bout de 24 à 48 heures que les staphylocoques. Ce milieu sélectif est rendu différentiel par l'addition de mannitol à 1%, d'un indicateur d'acidité, le rouge de phénol et d'une concentration élevée de NaCl. Il permet à la fois d'isoler le staphylocoque à partir d'un prélèvement contenant un mélange de germes et nous oriente vers un *S. aureus* ou un *S. epidermidis*.

En gélose au sang, une zone claire d'hémolyse (bêta hémolyse) est fréquemment observée autour des colonies. Ce qui s'explique par le fait que certains staphylocoques, en particulier *S. aureus*, sont susceptibles de synthétiser quatre hémolysines distinctes et variables d'une souche à l'autre, dont l'activité diffère selon le type d'hématie en cause (Fasquelle, 1974 ; Couture *et al.*, 1990 ; Le Minor et Veron, 1990).

Par contre, en bactériologie alimentaire, le milieu Baird Parker, représente le milieu de choix pour isoler et caractériser le *S. aureus*. Il permet une meilleure récupération des souches stressées grâce au pyruvate de sodium, activateur de croissance et au jaune d'œuf qui exerce un effet protecteur contre le tellurite. Cependant, ce milieu présente l'inconvénient d'être insuffisamment sélectif en présence de flores mixtes (De Buyser et Sutra, 2005). Notons aussi qu'à +4°C, les staphylocoques conservent leur vitalité pendant 3 mois dans le pus et pendant un an sur gélose (Fleurette, 1990).

2.3. Caractères biochimiques

De nombreuses études ont permis de dresser des profils métaboliques pour la plupart de espèces de staphylocoques. Les principaux caractères biochimiques pris en compte sont la production de catalase mais pas d'oxydase, à l'exception de *S. aureus* sous espèces *anaerobius* que l'on retrouve exclusivement chez les moutons et *Staphylococcus saccharolyticus* (Brun *et al.*, 2007). La capacité à métaboliser les sucres et la production d'arginine dihydrolase (ADH) (Couture *et al.*, 1990 ; Le Minor et Veron 1990 ; Pellerin *et al.*, 2010). Des études ont permis d'identifier certains marqueurs biochimiques, permettant de différencier *S. aureus* et *S. coagulase négatif* (Kloos *et al.*, 1986 ; Kloos *et al.*, 1999) (Tableau 2).

Tableau 2 : Marqueurs biochimiques permettant de différencier *S. aureus* et *S. à coagulase négative* (Kloos et al., 1986 ; Kloos et al., 1999)

Tests	<i>S. aureus</i>	<i>S. coagulase négative</i>
Uréase	d	+
Réduction des nitrates	+	d
Production d'Acétoïne	+	d
Phosphatase alcaline	+	d
β -glucosidase	+	+
β -glucuronidase	-	d
β -galactosidase	-	+
Arginine dihydrolase	+	-
Réduction du nitrate	+	d
Production d'acide (en aérobie) à partir de :		
D-Tréhalose	+	+
D-Mannitol	+	d
D-Mannose	+	+
D-Turanose	+	d
D-Xylose	-	+
D-Cellobiose	-	-
L-Arabinose	-	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Raffinose	-	-

+ : 90% ou plus d'isolats positifs ; D : 11-89% de isolats positifs ;

- : 90% ou plus de souches négatifs.

2.4. Caractères distinctifs des différentes espèces de *Staphylococcus*

Ce sont les caractères permettant de distinguer les staphylocoques potentiellement pathogènes des staphylocoques opportunistes.

2.4.1. Staphylocoagulase libre

La coagulase produit du *gene coa*, est une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine. Sa recherche est essentielle car joue un rôle central dans le pouvoir pathogène des staphylocoques en leur permettant de lutter contre les anticorps et la phagocytose (Brun *et al.*, 2003). Le test de détection consiste à incuber pendant 24h à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ un mélange de 0,5 ml de plasma de lapin et de 0,5 ml de la souche à tester préalablement incubée dans du BHIB. L'apparition d'un caillot est observée en inclinant délicatement le tube à 90°C (Verdier *et al.*, 2007). Un culot se forme au fond du tube si la bactérie possède une coagulase.

2.4.2. ADNase thermostable

L'ADNase thermostable, produit du gène *nuc* est aussi appelée thermonucléase. C'est une endonucléase, résistante aux températures élevées (15mn à 100°C) caractéristique du *S. aureus*. Sa recherche est effectuée en ensemencant la souche à étudier en stries épaisses sur de la gélose ADN en partant d'un bouillon de 24 heures ou d'une colonie isolée ; après 18 heures d'incubation à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, la gélose est inondée avec une solution d'acide chlorhydrique 1M. Si un halo clair apparaît autour de la strie au bout de 5 à 10 minutes, la recherche est positive (Delarras, 2007).

2.4.3. Galeries d'identification

La détermination de l'espèce peut être réalisée à l'aide d'une galerie biochimique d'identification miniaturisée. Ce système utilise des tests d'assimilation des sucres et des tests enzymatiques :

2.4.3.1. API Staph

C'est un système standardisé permettant d'identifier 20 espèces et sous espèces de staphylocoques. La galerie API Staph est composée de vingt microtubes, surmontés de cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent de réaliser dix-neuf tests biochimiques correspondant au métabolisme respiratoire, glucidique et protéique des bactéries à partir d'une culture pure de staphylocoque de 18 à 24h, une suspension bactérienne de 0,5Mac Farland est préparée. La galerie est ensemencée puis incubée à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, pendant 18 à 24 h. Le rouge de phénol, indicateur de pH, vire au jaune, en

présence des acides produits par l'utilisation des différents sucres testés. A partir des résultats obtenus, le profil numérique de la souche est établi et permet ainsi son identification à l'aide du logiciel apiweb (Delarras, 2007). Cette galerie est totalement incapables de distinguer les différentes espèces de staphylocoques coagulase positive. Par contre, elle est assez performante pour distinguer les principales espèces de staphylocoques coagulase négative.

2.4. 3.2. ID 32 Staph

Il s'agit d'un système standardisé permettant d'identifier 27 espèces et sous espèces de staphylocoques. Il permet de réaliser 26 tests biochimiques. L'inoculation de cette galerie peut être manuelle ou automatique. Après incubation à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18 à 24 h, l'interprétation des résultats se fait en se reportant au tableau de lecture. L'identification s'établit à l'aide d'un logiciel apiweb (Delarras, 2007). Cette galerie est très efficace aussi bien pour l'identification des SCP que pour celles des SCN.

2.4.4. VITEK 2

Récemment le système VITEK 2 a été amélioré pour une meilleure efficacité de l'identification. En effet, en 2004 les nouvelles cartes colorimétriques pour Vitek 2 ont été mises sur le marché. Le Vitek 2 peut traiter 60 à 120 cartes à la fois. Une première évaluation par Isenberg *et al.* en 1980 rapporte une précision de 97,8% pour 1020 isolats à la fin de la période initiale d'incubation par rapport aux tests biochimiques classiques, avec un temps d'analyse d'environ 8H et avec seulement 0,6% d'identification erronées (Isenberg *et al.*, 1980 ; Funke *et al.*, 2004).

3. Facteurs de virulence et pathogénie

Les facteurs de virulence de la bactérie sont tous les éléments qui vont participer à l'expression du son pouvoir pathogène. Ces facteurs vont favoriser la colonisation de l'hôte, la multiplication bactérienne, permettre à la bactérie d'échapper au système immunitaire de l'hôte ou provoquer directement des dommages aux tissus. Le *S. aureus* se caractérise par une grande plasticité de son génome à l'origine de la diversité de ses facteurs de virulence (Fanny *et al.*, 2008). Nous distinguons les protéines de surface (adhésines) qui permettent la colonisation de l'hôte, des facteurs qui conduisent au développement et à l'extension de l'infection et des toxines spécifiques responsables de syndromes toxiniques.

3.1. Protéines de surface : colonisation

S. aureus colonise la peau et les muqueuses en adhérant aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire. *S. aureus* possède un grand nombre de protéines exposées à la surface de la bactérie, qui ont la capacité de se fixer sur des molécules de l'hôte. On parle d'adhésines. Un certain nombre de ces adhésines appartiennent à la famille des MSCRAMM (Microbial Surface component Recognizing Adhesive Matrix Molecule) ayant le pouvoir de reconnaître les molécules de la matrice extracellulaire, composée de collagène, d'élastine, de protéoglycanes et de glycoprotéines de structure (O'seaghdha *et al.*, 2006 ; Freney, 2007).

Parmi ces protéines, les mieux caractérisées sont :

- La protéine A,
- La protéine de liaison au collagène de type I, II et IV,
- Les protéines de liaison à la fibronectine,
- Les protéines de liaison au fibrinogène- Clumping factor (ClfA, ClfB).

3.2. Facteurs protégeant la bactérie de la phagocytose

S. aureus produit une capsule composée d'exopolysaccharides qui ; avec la protéine A protègent la bactérie de la phagocytose favorisant ainsi l'extension de l'infection. La coagulase se lie à la prothrombine et forme un complexe appelé staphylothrombine. Le complexe staphylothrombinique entraîne la polymérisation du fibrinogène en fibrine et la formation d'un caillot, protégeant ainsi la bactérie de la phagocytose. La recherche de la coagulase représente l'un des tests utilisés pour l'identification de *S. aureus* (Novick *et al.*, 1990).

3.3. Facteurs conduisant à l'extension de l'infection

3.3.1. Extension locale

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

S. aureus produit aussi des enzymes capables de dégrader le tissu conjonctif favorisent ainsi l'extension du foyer infecté.

3.3.2. Diffusion hématogène

La diffusion hématogène de *S. aureus* à partir du foyer primaire se produit par le biais de thrombophlébites locales où la coagulase joue un rôle majeur. La coagulase se lie à la prothrombine et forme un complexe appelé staphylothrombine. Ce complexe staphylothrombinique entraîne la polymérisation du fibrinogène en fibrine et ceci aboutit à la formation de thrombus. La staphylokinase, activateur du plasminogène en plasmine exerce un effet inverse à celui de la coagulase. Elle conduit à la dislocation du thrombus qui est très riche en bactéries et ainsi à la formation de localisation septique secondaire.

3.4. Les toxines

Ces sont des protéines, sécrétées par les bactéries, qui vont agir à distance du site infectieux et provoquer des syndromes variés. On distingue différents types de toxines.

3.4.1. Les entérotoxines, TSST1 (toxine du choc staphylococcique) et exfoliatines

Ces différentes toxines sont impliquées dans les toxémies staphylococciques : choc toxique staphylococcique pour la TSST1, syndrome d'exfoliation généralisé (ou syndrome de la peau ébouillantée) pour les exfoliatines (Nishifuji *et al.*, 2008). La toxine responsable du choc toxique staphylococcique (TSST-1) est une protéine antigénique qui entraîne la formation d'anticorps protecteurs présents chez 85% des sujets adultes. Cette toxine, comme les entérotoxines, a un effet pyogène et est un super-antigène qui entraîne l'activation simultanée de plusieurs sous-populations lymphocytaires, ce qui entraîne la libération de plusieurs médiateurs (interleukine, interféron gamma, TNF alpha et bêta), responsables de la symptomatologie du choc staphylococcique.

L'exfoliatine est une protéine thermostable responsable des lésions d'érythrodermie bulleuse que l'on observe parfois au cours des septicémies à staphylocoques et au cours de l'impétigo. En se fixant à certaines protéines intracellulaires cutanées (profilagrine et filagrine) elle provoque une épidermolyse : décollement intra-épidermique entre le *stratum granulosum* et le *stratum spinosum*. Il y a rupture entre les cellules adjacentes, suivie de celle des ponts inter-cytoplasmiques (desmosomes) ce qui entraîne des lésions bulleuses (Vandenesch *et al.*, 2012).

Les entérotoxines staphylococciques (ES) sont des exoprotéines, elles constituent un groupe de molécules hautement toxiques produits par les staphylocoques dans les aliments, sont impliquées dans les toxémies staphylococciques : *TSST-1* et le *SSSS* pour

les exfoliatines, et les toxi-infections alimentaires pour les entérotoxines (Freney, 2007). Leur première description remonte à 1959 (Bergdoll, 1979).

Parmi les staphylocoques à coagulase positive, plusieurs espèces peuvent sécréter des ES, c'est le cas de *S. aureus* et de *Staphylococcus intermedius* (Khambaty *et al.*, 1994 ; Becker *et al.*, 2001). Selon certains auteurs, quelques espèces à coagulase négative comme *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* et *S. haemolyticus* peuvent également produire des ES (Bautista *et al.*, 1988 ; Cunha *et al.*, 2007 ; Veras *et al.*, 2008 ; Zell *et al.*, 2008).

3.4.2. La gamma-toxine (toxine γ) et la Leucocidine de Panton-Valentine (LPV)

Ces toxines ne sont pas toutes retrouvées chez les souches de *S. aureus* responsables d'infections humaines et animales. De plus, leur rôle comme facteur de virulence n'est pas toujours connu. L'hémolysine γ ou toxine γ est synthétisée chez 97% des isolats de *S. aureus* alors que la leucocidine de Panton-Valentine (LPV) n'est synthétisée que chez 2% de ces isolats. La toxine γ et la LPV font partie de la famille de toxines synergohyménotropes (SHT). Ces toxines sont constituées de deux protéines non associées agissant en synergie et qui, séparées l'une de l'autre, n'ont qu'une faible activité biologique. Ces deux protéines sont connues sous les noms de composés S et F, pour Slow- et Fast-eluting proteins dans une colonne à échange d'ion.

Leur mode d'action s'exerce par leur fixation à la membrane des cellules cibles puis la formation de canaux membranaires laissant passer des cations divalents. Ces cellules cibles sont les neutrophiles et macrophages ainsi que les érythrocytes pour la toxine γ .

Il existe quatre variants moléculaires de la toxine γ qui est hémolytique et leucotoxique *in vitro*.

La LPV est leucotoxique et dermo-nécrotique mais non-hémolytique (Panton et Valentine, 1932).

Décrite en 1932, elle porte le nom des chercheurs Panton et Valentine qui l'ont découverte. La LPV est donc un facteur de virulence important des infections nécrosantes cutanées (furuncles, anthrax) et des infections graves à point de départ cutané primaire (Buckingham *et al.*, 2004). Elle est retrouvée dans les isolats de *S. aureus* responsables de pneumopathies nécrosantes et hémorragiques.

3.4.3. Les hémolysines

Les hémolysines ont une action cytotoxique sur de nombreuses cellules eucaryotes, notamment les globules rouges et les plaquettes. L'hémolysine α , sécrétée par la quasi-

totalité des isolats de *S. aureus*, est mise en évidence avec des hématies de mouton, de bœuf ou de lapin. La perméabilité membranaire entraîne une fuite osmotique du contenu cellulaire, aboutissant à la mort des cellules. La cytolysse des plaquettes et des monocytes libère des cytokines et d'autres médiateurs de la réaction inflammatoire, expliquant le choc septique des infections sévères à *S. aureus*. La destruction des cellules endothéliales favorise la dissémination des bactéries et les métastases infectieuses (Velasco *et al.*, 2005).

3.4.4. Les entérotoxines

Il existe 7 sérotypes différents (A, B, C1, C2, C3, D et E). Ce sont des protéines thermostables, responsables de toxi-infections alimentaires (diarrhée, vomissements, douleurs abdominales, rarement un collapsus cardiaque), qui apparaissent rapidement, 1 à 6 heures après ingestion. Entre 30 à 60% des isolats de *S. aureus* produisent une entérotoxine. Il s'agit d'une protéine thermostable, insensible aux enzymes protéolytiques du suc digestif. L'entérotoxine A est de loin la plus fréquemment mise en cause (Bourgeois *et al.*, 1996 ; Bautista *et al.*, 1988 ; Balaban *et al.*, 2000 ; Becker *et al.*, 2001 ; Cunha *et al.*, 2007).

4. Transmission

Avec plus de 30 % de porteurs sains, l'homme constitue le principal réservoir de *Staphylococcus* spp., ceux-ci ne se transmettent entre personnes, principalement par contact direct. L'environnement aussi peut jouer un rôle (Leekha *et al.*, 2012 ; Stefani *et al.*, 2012). Bien que *S. aureus* ne soit pas particulièrement résistant dans le milieu extérieur, la transmission peut se faire par l'intermédiaire de nombreux objets ou poussières contaminés (Davis *et al.*, 2012). Ce qui provoque sa forte prévalence et de sa propagation dans le monde, et surtout en santé humaine (Stefani *et al.*, 2012), d'abord dans le milieu hospitalier, puis et depuis une dizaine d'années, des souches dits communautaires ont émergé et se transmettent en dehors de ce milieu . Ainsi, des cas de propagation sont rapportés parmi des équipes sportives, dans des prisons, en milieu militaire ou, plus rarement, dans des écoles ou à l'intérieur d'un foyer (Leekha *et al.*, 2012 ; Stefani *et al.*, 2012).

Les staphylocoques spécialement *S. aureus* peuvent être zoonotiques. En effet, il est établi que ces bactéries sont responsables de mammites chez les bovins, de boiteries chez

les volailles ou isolées à partir du porc qui constitue un réservoir qui peut éventuellement contaminer et infecter l'homme (Leonard *et al.*, 2008 ; Fitzgerald *et al.*, 2012).

5. Pouvoir pathogène naturel

S. aureus n'est ni un pathogène strict ni un germe opportuniste pur. De plus, les infections à *S. aureus* sont très polymorphes allant des infections cutanées bénignes comme les furoncles et les panaris à des infections mettant en jeu le pronostic vital comme les états de choc, les endocardites, les pneumonies, les infections du système nerveux central (Avril *et al.*, 2003).

6. Flores commensales animales

Chez les bovins comme chez la volaille, la flore commensale est composée par les germes résidant sur les surfaces cutanées et muqueuses du sujet sain. Un grand nombre de bactéries, de protozoaires et de champignons constituent cette flore (Meyer *et al.*, 2004)

Selon Leyral et Vierling (2007) on distingue deux types de flores :

- ✓ Les flores commensales permanentes : dites flores résidentes qui ont tendance à se rétablir chaque fois qu'elles sont perturbées.
- ✓ Les flores transitoires : constituées de bactéries peu nombreuses, non pathogènes en présence de la flore résidente, mais qui peuvent proliférer et devenir pathogènes lorsque la flore résidente est perturbée.

La composition des flores est variable en fonction des sites anatomiques, de leurs propriétés physicochimiques et des facteurs exogènes qui peuvent modifier ces dernières.

7. Flore normale du système respiratoire

La flore normale du système respiratoire colonise la muqueuse des cavités nasales et du pharynx. Les bactéries les plus fréquemment retrouvées dans le nasopharynx de diverses espèces animales sont représentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Flores commensales des cavités nasales et du pharynx (Hoquet *et al.*, 1985 ; Duclos, 1986 ; Menoueri *et al.*, 1988).

Désignation	Flore pharyngée	Flore nasale
Commensaux habituels	Streptocoques α hémolytiques Streptocoques non-hémolytique Bactéries Anaérobies <i>Neisseria</i> , <i>Moraxella</i> Staphylocoques Corynébactéries Haemophilus	Staphylocoques Corynébactéries
Portage occasionnel	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i>	<i>S. aureus</i>

8. Portage de *Staphylococcus spp.*

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires, isolées de l'environnement naturel (sol, eau douce et eau de mer, poussière, air), de l'environnement domestique de l'homme, de l'environnement hospitalier et des ateliers de préparation alimentaires et à partir de denrées alimentaires. Les staphylocoques sont également présents dans les zones cutanées humides, les muqueuses de l'oropharynx, du périnée et des fosses nasales des animaux à sang chaud (mammifères, volailles) et en particulier de l'homme (Belgdoll *et al.*, 1979 ; Lina *et al.*, 1997 ; Grosjean *et al.*, 2011 ; Quinn *et al.*, 2011).

La fréquence du portage nasal à *Staphylococcus aureus* est de 20 à 30% dans la population générale : 75% des porteurs sont dits occasionnels ou intermittents ; les autres, sont des porteurs permanents colonisés par la même souche pendant de longues périodes allant jusqu'à plusieurs années. Ce portage est associé au risque d'infection (Vandenbergh et Verbrugh, 1999 ; Vandenbergh *et al.*, 1999). En effet, à partir des sites de colonisation, tels que la peau et le nez, les isolats vont pouvoir diffuser vers le milieu extérieur ou pénétrer dans le milieu intérieur en déclenchant une auto-inoculation et provoquer la maladie. Par ailleurs les porteurs nasaux sont des disséminateurs (Dauwalder *et al.*, 2010).

Chez l'animal, les premières descriptions du portage de staphylocoques remontent à 2004, résultats d'une enquête menée par une équipe française, suite à des infections massives chez les porcs et leurs éleveurs (Armand-Lefevre *et al.*, 2005). Juste après ; aux Pays-Bas en 2006, l'apparition d'infections humaines par des isolats d'origine porcine a constitué le point de départ d'un large questionnement scientifique sur le risque de transmission à l'homme du staphylocoque spécialement le SARM d'origine animale (Krziwanek *et al.*, 2009). Plusieurs enquêtes de prévalence, ont également été conduites en 2007 et 2008 à l'initiative du Ministère de l'Agriculture en France, corroborés par d'autres études Européennes et Américaines dans les exploitations de production et d'élevage, plaident en faveur d'un portage et d'une transmission entre animaux et de l'animal vers l'homme et vice versa (Jouy *et al.*, 2008).

Un certain nombre de lignées « multi-hôtes » de SARM, ont été alors identifiées, capables de coloniser et infecter un large éventail d'espèces de mammifères et d'oiseaux, et la possibilité que les animaux puissent servir de réservoirs de SARM a fait évoquer l'existence d'une zoonose émergente. Ainsi, des isolats appartenant au CC398, caractéristiques de LA-MRSA peuvent coloniser les personnels agricoles, leurs familles ou les vétérinaires, et dans certains cas être responsables d'infections (Schijffelen *et al.*, 2010 ; Köck *et al.*, 2013 ; Prescott *et al.*, 2014). Les animaux de compagnie, comme les chats, les chiens et les chevaux, sont aussi fréquemment colonisés par des isolats de SARM (Duquette *et al.*, 2004 ; Couto *et al.*, 2011).

II. Diagnostic de laboratoire

1. Méthodes de détection des staphylocoques

Les méthodes microbiologiques utilisées pour l'identification bactérienne se basent sur des caractéristiques phénotypiques ou génotypiques.

Chez les staphylocoques, les méthodes phénotypiques reposent sur des tests conventionnels standards : la coloration de Gram, les caractéristiques biochimiques ou encore sur les profils de résistance aux antibiotiques (Song *et al.*, 2011), les isolats d'origine animale se caractérisent par leur multirésistance aux antibiotiques et leur appartenance à certains groupes bactériophagiques ou lysotypiques (Le Minor *et al.* , 1990).

Les méthodes génotypiques, comparées aux méthodes phénotypiques présentent l'avantage d'être indépendante de l'expression des gènes spécifiques dans les conditions

de culture de laboratoire. Elles consistent à caractériser des traits particuliers de l'ADN chromosomique, plasmidique ou de l'ADN total de la souche à identifier. Les efforts portent actuellement sur la mise au point d'outils et méthodes possédant un haut pouvoir discriminant par l'analyse des paramètres du génome et la détection du polymorphisme des séquences d'ADN, en utilisant des méthodes directes (séquençage) ou indirectes avec amplification (test PCR à l'aide d'amorces spécifiques) ou sans amplification d'ADN (hybridation) (Le Loir, 2009 ; Pellerin *et al.*, 2010). Malgré leur fort pouvoir de discrimination, ces méthodes présentent également des limites, à savoir la complexité des protocoles, le savoir-faire nécessaire pour maîtriser ces systèmes, le coût des réactifs, l'utilisation de sondes ou de séquences nucléotidiques spécifiques pour chaque espèce, et enfin le délai important nécessaire pour l'identification (Moussaoui., 2012).

Ces difficultés ont conduit au développement de méthodes alternatives, parmi lesquelles la spectrométrie de masse (Claydon, *et al.*, 1996). Cette technique permet de définir les microorganismes grâce à un traitement de masses différentes avec une précision moléculaire (Baranton *et al.*, 1995).

1.1 Méthodes phénotypiques

Autant l'identification des bactéries à l'espèce est cruciale dans le domaine médical pour pouvoir prendre en charge l'infection individuelle ; autant l'identification de isolats à l'intérieur de l'espèce est importante pour connaître l'épidémiologie de l'infection (Blanc *et al.*, 2010). Entre d'autres méthodes ; l'utilisation de l'antibiogramme exploite souvent les données en provenance directe de l'analyse de routine ; c'est une méthode attractive, facilement réalisable, ne demandant pas d'équipements sophistiqué. Cependant, ses inconvénients sont d'une part son faible pouvoir discriminant et d'autre part une variabilité de la résistance à certains antibiotiques. Cette variabilité est souvent déterminée par la présence ou l'absence de plasmides portant des marqueurs de résistance.

Avant 1999, il était difficile d'interpréter les données de l'antibiorésistance obtenues *in vitro* car aucun standard n'était établi pour les isolats d'origine vétérinaire, (Schlegelova *et al.*, 2001). A partir de 1999, un sous-groupe du «National committee for clinical laboratory standards», ou NCCLS, maintenant appelé «Clinical and laboratory standards institute», ou CLSI, a été créé et s'est consacré à l'interprétation des données de sensibilité

des isolats bactériens d'origine vétérinaire envers les antimicrobiens. Les standards ont été ainsi établis et sont suivis dans les laboratoires de bactériologie vétérinaires (NCCLS, 1999).

1.1.1. Résistance aux principaux antibiotiques anti-staphylococciques

1.1.1.1. Résistance à la pénicilline G

La sécrétion de pénicillinases est présente chez la plupart des staphylocoques, elle est surtout importante chez *S. aureus* (70 à 90%). Lorsque le laboratoire signale une résistance à la pénicilline (sans résistance à l'oxacilline), celle-ci implique aussi une résistance à l'ampicilline, l'amoxicilline, la ticarcilline et à la pipéracilline. En revanche, les pénicillines associées à un inhibiteur de pénicillinase (acide clavulanique, sulbactam, ou tazobactam) ou les bêta-lactamines insensibles aux pénicillinases (céphalosporines, imipénème) restent actives. Fait important en pratique, les céphalosporines de troisième génération (céfotaxime, ceftriaxone) sont dix fois moins actives que l'oxacilline sur le staphylocoque, ce qui rend leur utilisation illogique en dehors des cas d'infections mixtes (Rossney *et al.*, 2008).

Le mécanisme de résistance à la pénicilline repose sur la synthèse par la bactérie d'une enzyme appelée β -lactamase ou pénicillinase qui hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines et les rend inactives. Le gène *bla_Z* qui code pour cette enzyme est porté par un plasmide ou un transposon. Le gène *bla_Z* est sous le contrôle d'un système répresseur/antirépresseur (*blaR1/blaI*). La production de β -lactamase est le plus souvent inductible (Murchan *et al.*, 2003).

1.1.1.2. Résistance à l'oxacilline

Ce mécanisme de résistance non enzymatique aux bêtalactamines a été observé dès 1960, époque de l'introduction de la méthicilline en thérapeutique. Les isolats qui le possèdent sont qualifiés de résistance hétérogène à la méthicilline (*S. aureus* résistant à la méthicilline), donc résistance à toutes les bêta-lactamines, y compris l'imipénème. (Lowy, 1998).

La synthèse d'une protéine de liaison additionnelle aux pénicillines (PLP2a), de faible affinité, est sous la dépendance du gène *mecA*. La régulation de l'expression de ce gène dépend au moins de deux systèmes incluant les gènes *bla* (pour β -lactamase) et les gènes *fem* (factors essential for methicillin resistance) (Lowy, 1998)

Il existe une variété de méthodes de laboratoire utilisées pour l'identification de SARM. Le processus peut être indirect où la première étape consiste à déterminer si une colonie suspecte est *S. aureus* ou pas, suivie d'un test ultérieur de cette colonie de *S. aureus* pour la susceptibilité à la méticilline. Dans ce cas, l'expression phénotypique est variable et la résistance peut s'exprimer soit de manière homogène, par l'ensemble de la population bactérienne, soit de manière hétérogène (1 bactérie sur 10^4 à 10^7).

1.1.1.2.1. Méthodes de détection

1.1.1.2.1.1. Test céfoxitine

La détection de la résistance du *Staphylococcus aureus* à la méticilline par diffusion sur gélose est un test pratiqué quasi quotidiennement au laboratoire de microbiologie mais présente de nombreuses difficultés. Diverses techniques ont été proposées visant à obtenir une meilleure expression de la résistance *in vitro* (Cattoir *et al.* , 2002).

L'étude de l'oxacilline plutôt que celle de la méticilline, en diffusion, un inoculum lourd, un abaissement de la température d'incubation à 30°C, l'usage d'un milieu hypersalé et la prolongation de l'incubation à 48 heures ont été tour à tour recommandés par divers comités nationaux. Récemment, l'utilisation de la céfoxitine en remplacement de l'oxacilline a permis une détection plus fiable des isolats exprimant la PLP2a (Felten *et al.* , 2002). Le CLSI (2014) recommande en pratique l'utilisation des disques d'oxacilline (1µg) et de céfoxitine (30µg) simultanément au niveau de l'antibiogramme standard de *S. aureus*. Ceci est dû au fait que la céfoxitine ne détecte pas les isolats résistants à l'oxacilline par un mécanisme autre que la production de PLP2a, c'est-à-dire pour les souches hyperproductrices de pénicillinases ou ayant des mutations PLP. Les souches présentant un diamètre supérieur ou égal à 22 mm pour la céfoxitine et ≥ 13 mm pour l'oxacilline sont sensibles aux isoxazolyl-pénicillines, par contre, les souches présentant des diamètres inférieurs à 21 mm et 12 mm respectivement à la céfoxitine et l'oxacilline sont résistantes (Rahal *et al.*, 2011).

1.1.1.2.1.2. Screening test à l'oxacilline

L'interprétation du diamètre d'inhibition de la céfoxitine n'en est pas pour autant simple à chaque fois car l'expression phénotypique de cette résistance est très variable *in vitro* (Gueudet *et al.*, 2004). Le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en 2016 recommande le test de *Screening* à l'oxacilline en utilisant un inoculum de 0,5 Mc Farland sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 4 % de NaCl et de 6 µg/ml d'oxacilline. Après

24 à 48h d'incubation, la culture de plus d'une colonie de la souche test indique une résistance à l'oxacilline impliquant une résistance à toutes les bêta-lactamines (Rahal *et al.*, 2011).

Chez l'homme et deux ans après l'introduction de la méthicilline dans la pratique clinique, et l'apparition du premier SARM en Angleterre (Jevons, 1961), il s'est rapidement propagé aux autres pays européens, puis s'est diffusé un peu partout dans le monde, tel que l'Australie, le Japon et les États-Unis, durant les années 1970. Aujourd'hui, le SARM provoque la majorité des infections nosocomiales dans le monde entier (Stryjewski *et al.*, 2014).

Par contre chez l'animal, la première description d'une résistance à la méthicilline chez une souche de *S. aureus* remonte à 1972, isolée en Belgique d'une infection mammaire bovine. Depuis, d'autres souches de SARM ont été décrites chez l'espèce bovine au Pakistan en 2004 (Farzana *et al.*, 2004), en Corée du sud en 2007 (Moon *et al.*, 2007) ; en Hongrie en 2007 (Juhasz-Kaszanyitzky *et al.*, 2007) et aux Pays-Bas en 2008 (Graveland *et al.*, 2008). Chez les chevaux, au Japon en 1996 (Anzai *et al.*, 1996) et aux USA en 1997 (Hartmann *et al.*, 1997), puis en Grande-Bretagne (Baptiste *et al.*, 2005) et en Irlande en 2005 (O'Mahony *et al.*, 2005), en Autriche (Cuny *et al.*, 2010) et en Allemagne en 2006 (Walther *et al.*, 2006). Des souches de SARM ont également été décrites chez la volaille en Belgique en 2008 et 2009 (Nemati *et al.*, 2008 ; Persoons *et al.*, 2009), ainsi que chez le chien en Angleterre en 2005 (Rich *et al.*, 2005). C'est surtout chez le porc que la description de souches de SARM a fait prendre conscience à la communauté médicale humaine de l'existence de ce pathogène en filière animale. Ce qui a poussé les investigations vers un typage moléculaire et description du clone ST398 de *S. aureus* chez des porcs et leurs éleveurs en portage l'ont été en 2004 (Armand-Lefèvre *et al.*, 2005), puis c'est la description d'infections humaines par des souches porcines aux Pays-Bas (2006), qui a, à l'évidence, marqué le point de départ d'un large questionnement scientifique sur le risque de transmission à l'homme de SARM d'origine animale (Krziwanek *et al.*, 2009).

Toutes ces approches permettent ainsi de mieux comprendre la parenté entre telle ou telle souche de staphylocoque doré et démontrent toutes l'épidémiologie très caractéristique de ce germe qui diffuse très largement sous une forme clonale. Elles ont pu aussi montrer que certains groupes clonaux étaient principalement à spécificité humaine (ST15, ST25,

ST45) ou d'autres davantage à spécificité animale (ST151, ST771, ST887, ST398). Cette spécificité d'hôte est parfois moins marquée (ST9 du porc retrouvé classiquement en portage chez le porc, mais facilement transmissible à l'homme par contact) (Madec *et Haenni*, 2010).

1.1.1.3. Résistance aux aminosides

L'utilisation des aminosides répond au souhait d'obtenir une synergie bactéricide avec un inhibiteur de la paroi bactérienne (glycopeptide ou bêta- lactamine). Les aminosides inhibent la synthèse protéique. Le principal mécanisme de résistance aux aminosides (kanamycine, amikacine, tobramycine, gentamicine) est lié à des modifications de la cible ribosomale par des enzymes codées par des gènes plasmidiques ou transposables (Bismith *et al.*, 2000 ; Leclercq, 2002). Les souches résistantes aux aminosides (particulièrement le phénotype KTG) sont le plus souvent métiR (Avril *et al.*, 2003). L'amikacine est l'aminoside le plus fréquemment touché chez les SARM car plus de 90% d'entre eux expriment une résistance à la kanamycine et à la tobramycine. Cet antibiotique doit être à priori évité dans les infections à staphylocoques. En revanche, la gentamicine et la netilmicine sont moins fréquemment touchées (chez environ 5-30% des SARM) et sont les aminosides de choix en association (Leclercq, 2002).

1.1.1.4. Résistance aux glycopeptides

La vancomycine et la teicoplanine sont des antibiotiques de dernier recours en médecine humaine pour traiter les septicémies et les endocardites dues à des souches de *S. aureus* multirésistantes. Leurs indications sont limitées aux infections mettant en jeu le pronostic vital et pour lesquelles aucune autre antibiothérapie n'est efficace (Fauchere *et al.*, 2002). Leur utilisation en médecine vétérinaire revêt un intérêt épidémiologique. Quelques souches de sensibilité diminuée, voire résistantes à la vancomycine et à la teicoplanine ont été signalées *in vitro* depuis 1992, et *in vivo* depuis 1996 d'abord au Japon et aux Etats-Unis, plus récemment en France (Avril *et al.*, 2003). L'émergence de mutants de moindre sensibilité aux glycopeptides ont été signalés depuis 1997 et sont désignées comme GISA : Glycopeptides Intermediate *S. aureus* (Fauchere *et al.*, 2002).

Les glycopeptides ne sont pas de bons antibiotiques qui, malgré leur activité sur les souches multirésistantes, présentent plusieurs défauts. Leurs CMI sont élevées (1 à 2 mg/L), leur vitesse de bactéricidie est lente (48 heures) probablement liée à la volumineuse taille de ces molécules, leur diffusion intracellulaire et tissulaire est faible.

Toute résistance à la vancomycine implique une résistance à la teicoplanine. Un niveau intermédiaire de résistance à la vancomycine apparaît s'associer souvent à un échec thérapeutique de cet antibiotique (Leclercq, 2002). Le mécanisme de résistance hétérogène à la vancomycine (souche hétéro-VISA et VISA) est lié à un épaississement de la paroi bactérienne qui piège les glycopeptides dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique où le peptidoglycane est synthétisé (Hiramatsu *et al.*, 2001). La base génétique de la résistance n'est pas encore comprise (Wals *et al.*, 2002).

Les souches exprimant une résistance de haut niveau à la vancomycine (VRSA) hébergent le gène *vanA* présent habituellement chez les entérocoques résistants aux glycopeptides (Chang *et al.*, 2003; Weigel *et al.*, 2003). Ces souches apparaissent chez des patients traités par les glycopeptides. Des mesures draconiennes doivent être prises pour éviter leur sélection et leur diffusion. La résistance des staphylocoques non aureus à la vancomycine n'est pas exceptionnelle (Avril *et al.*, 2003).

1.1.1.5. Résistance aux Macrolides, Lincosamides, Streptogramine (MLS)

L'érythromycine, la josamycine, la spiramycine sont de médiocres anti-staphylococciques. En revanche, la clindamycine peu utilisée en raison de ses effets indésirables, a des propriétés antistaphylococciques intéressantes, notamment par ses capacités de diffusion tissulaire.

Le mode le plus fréquent des résistances aux macrolides (érythromycine, spiramycine), lincosamides (clindamycine) et streptogramines B (pristinamycine) résulte de la modification de la cible, des systèmes d'efflux et des enzymes inactivatrices (Quincampoix *et al.*, 2001 ; Leclercq, 2002).

La résistance est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, d'où son nom de MLS_B, car ces antibiotiques ont des sites de fixation communs.

La résistance MLS_B est dite inductible quand la méthylase est produite seulement en présence de macrolide inducteur (comme l'érythromycine), ou constitutive, lorsque la production est permanente, et indépendante de l'antibiotique (Leclercq, 2002).

La production de méthylase inductible n'entraîne de résistance qu'aux antibiotiques inducteurs, qui sont les macrolides à noyau de 14 et 15 atomes (érythromycine, roxithromycine, clarithromycine, dirithromycine, azithromycine) alors que les macrolides à noyau de 16 atomes (josamycine et spiramycine), les lincosamides (clindamycine et

lincomycine) et les streptogramines B (pristinamycine I et quinupristine) restent actifs car non inducteurs (Leclercq, 2002).

L'utilisation de la clindamycine ou d'un macrolide à noyau de 16 atomes est néanmoins déconseillée en raison d'un risque élevé de sélection de mutants constitutifs en présence de ces antibiotiques.

La production constitutive de méthylase induit une résistance croisée à tous les antibiotiques de la famille, à l'exception des streptogramines.

Le marqueur de la résistance de type constitutif est la résistance à la clindamycine. La plupart des SARM présentent une résistance MLS_B constitutive (Leclercq, 2002).

1.1.1.6. Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones inhibent la croissance bactérienne. *S. aureus* est naturellement résistant aux quinolones de première génération (acide nalidixique, acide oxolinique et fluméquine), mais sensible aux fluoroquinolones systémiques (ciprofloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine, ofloxacine et péfloxacine) ou urinaires (norfloxacine).

La résistance aux fluoroquinolones est due à une modification de la cible, soit la topoisomérase IV par mutation des gènes chromosomiques *griA* ou *griB*, soit les sous-unités de la gyrase, impliquées dans la synthèse de l'ADN bactérien, par une mutation au sein des gènes *gyrA* ou *gyrB*, ou à un système d'efflux grâce à une protéine transmembranaire codée par le gène chromosomique *norA* (Quincampoix *et al.*, 2001 ; Leclercq, 2002).

1.1.1.7. Autres résistances

- La résistance aux sulfamides est de nature chromosomique, liée à une hyperproduction d'acide para-amino-benzoïque (Bismith *et al.*, 2000).
- La résistance aux tétracyclines est due soit à un mécanisme d'efflux par une protéine membranaire codée par les gènes *tetK* ou *tetL* d'origine plasmidique soit une protection de la cible par une protéine codée par le gène transposable *tetM*.
- La résistance à la rifampicine est liée à la sélection de mutants résistants à des fréquences élevées au niveau de la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN dépendant.
- La résistance à la fosfomycine est due à la sélection de mutants au niveau du système de transport de la molécule dans la bactérie (gènes *glgT* et *uhp*) (Bismith *et al.*, 2000).

- La résistance à l'acide fusidique est secondaire soit à la sélection de mutants résistants au niveau du facteur d'élongation intervenant dans la synthèse protidique soit à une modification de la perméabilité d'origine plasmidique (Bismith *et al.*, 2000).

1.2. Identification de l'espèce des staphylocoques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Light)

Afin de faciliter le diagnostic de routine dans les laboratoires de microbiologie, la spectrométrie de masse, grâce à son pouvoir de résolution très élevé, est considérée actuellement comme une technique alternative, rapide, précise et peu coûteuse pouvant être utile à l'identification microbienne, à la taxonomie, et à l'analyse de la composition de la cellule bactérienne (Descy *et al.*, 2010). Cain *et al.* (1994) sont les premiers à avoir utilisé le MALDI-TOF pour l'identification de micro-organismes.

C'est une technique physique, permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique.

Le spectromètre de masse comprend 4 parties : le système d'introduction de l'échantillon, la chambre d'ionisation, produisant des ions en phase gazeuse, l'analyseur, séparant les ions en fonction de leur rapport masse et le détecteur, transformant le courant ionique en courant électrique (Descy *et al.*, 2010).

La spectrométrie de masse MALDI-TOF change l'approche des laboratoires de routine pour l'identification des microorganismes. Le délai d'identification est réduit à 18-24h après l'ensemencement du prélèvement, au lieu de 36-48h précédemment et se positionne comme le test de première ligne, pour tous les isolats, réservant aux techniques phénotypiques conventionnelles l'identification des espèces non encore caractérisées par ce système (Suarez, 2013).

1.3. Méthodes génotypiques

La détection des déterminants génétiques bien qu'elle soit encore marginale en bactériologie devrait permettre de contourner la nécessité d'isolement bactérien.

Son concept de spécificité et de capacité à fournir simultanément un grand nombre d'informations en un laps de temps court, répond à trois attentes majeures pour la pratique : l'identification, le typage et l'antibiogramme (Billy, 2003).

1.3.1. Application de la PCR

La plupart des tests génotypiques sont fondés sur les méthodes d'amplification d'un segment d'ADN portant sur une partie, la totalité ou même sur une partie intrinsèque d'un gène bactérien au sein duquel peuvent être repérées des mutations.

La technique PCR a été découverte par Mullis *et al.* en 1983, (Mullis *et al.*, 1986) et développée par Herlich et al en 1985 (Mullis et Falooma, 1986). Dès 1990, elle a été appliquée à la recherche des gènes de *S. aureus*.

En 2001, Aarts *et al.* décrivent la PCR comme étant la répétition de cycles de dénaturation et d'élongation au bout desquels de nombreuses copies de l'ADN ciblées sont obtenues et cela, en peu de temps. Dans la PCR conventionnelle, la phase d'amplification est suivie d'une migration de l'amplicon sur gel d'agarose et la révélation du gène est effectuée par coloration avec l'agent intercalant, le bromure d'éthidium. Cette technique présente néanmoins des limites au niveau de la détection qui sont variables d'une étude à une autre selon le protocole d'extraction de l'ADN (De Buyser *et al.*, 2010 ; Katayauma *et al.*, 2000). La PCR en temps réel, technique plus récente, présente l'avantage d'avoir les colorants fluorescents intercalés dans l'ADN double brin au fur et à mesure que l'amplicon se forme, les résultats sont dévoilés en même temps de la progression de la réaction. Cette technologie permet un gain de temps, une quantification du gène recherché, une détection de plusieurs gènes à la fois et la réduction des risques de contamination de produits PCR du fait que l'amplicon n'est pas manipulé à la fin des cycles (Aarts *et al.*, 2001). Des techniques utilisant le PCR en temps réel sont également utilisées dans la détection des *S. aureus* résistants aux antibiotiques et procurent l'avantage d'être beaucoup plus rapides (Huletsky *et al.* 2004 ; Lapierre *et al.*, 2003).

La PCR multiplex, quant à elle utilise plus de deux paires d'amorces recherchant plusieurs gènes à la fois (Cal *et al.*, 2003 ; Costa, *et al.*, 2005 ; Jaffe *et al.*, 2000; Strommenger *et al.*, 2003 ; Martineau *et al.*, 2000).

En médecine vétérinaire, l'outil PCR est de plus en plus utilisé pour le diagnostic de souches bactériennes résistantes, dont les *S. aureus* (Haveri, 2005).

1.3.1.1. Techniques d'identification

1.3.1.1.1. PCR agr

Le système *agr* (*accessory gene regulator*) est un régulateur global contrôlant l'expression de nombreux facteurs de virulence du *S. aureus* en fonction de la densité

bactérienne et de l'état de croissance (Vandenesch ; 1997). Il met en jeu le mécanisme de stimulation de type densité cellulaire (quorum sensing), celui-ci correspond à un phénomène de communication des bactéries qui leur permet de prendre des «décisions collectives» afin de coordonner leur action (Jarraud *et al.*, 2002).

Un polymorphisme dans la séquence protéique du récepteur (AgrC) permet de définir quatre allèles *agr* sur la base d'une PCR multiplex emboîtée. La divergence des allèles *agr* permet de séparer l'espèce *S. aureus* en quatre fonds génétiques distincts : *agr* 1, *agr* 2, *agr* 3 et *agr* 4. Cette PCR qui permet en outre de confirmer l'appartenance de la souche à l'espèce *S. aureus* représente le test de base (avec la PCR *mecA*) pour toutes les souches de staphylocoque (Vandenesch *et al.*, 2011). Il est supposé que c'est l'activation du système *agr* qui permet le passage d'une colonie commensale à une colonie pathogène (Antunes *et al.*, 2010).

1.3.1.1.2. PCR-séquençage du gène *tuf* pour l'identification d'espèce

Le séquençage du gène *tuf* est retenu, parmi plusieurs approches moléculaires de type PCR séquençage de gènes, comme méthode d'identification des espèces de *Staphylocoques aureus* et non aureus pour son bon pouvoir discriminant. L'amplification-séquençage du gène *tuf* s'est substituée aux multiples techniques conventionnelles, morphologiques, biochimiques et moléculaires longues, fastidieuses, et d'interprétation parfois délicate pour l'identification des staphylocoques. Cette technique est maintenant utilisée pour toutes les identifications non concluantes de souches par la technique du MALDI-TOF (insuffisance de la base de données) ou lors de résultats atypiques ou aberrants obtenus au cours de la caractérisation complète des souches (Vandenesch, *et al.*, 2017).

2.1.2. Techniques de caractérisation de la virulence

2.1.2.1. Puces à ADN

Décrites en 1995 par Schena *et al.*, les puces à ADN sont un ensemble de courtes séquences cibles d'ADN simple brin, disposées sous forme de spots en rangées ordonnées sur une petite surface solide (lame de verre, de silicium ou de plastique). Chaque spot est spécifique d'un gène en attente de s'hybrider avec les produits PCR complémentaires. Son principe repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il est en présence d'un brin complémentaire (Delpech, 2000).

Après extraction des ADN ou des ARN des souches bactériennes, et amplification des cibles avec des amorces marquées, les produits d'amplification sont hybridés sur une puce pouvant comporter plus de 600 spots. Elle permet de disposer en moins de 3 heures d'une cartographie génétique simplifiée de chaque souche testée (figure N°2). Les gènes ciblés sont ceux codant des facteurs de virulence, des déterminants des mécanismes de résistance aux antibiotiques ainsi que des marqueurs épidémiologiques permettant de rattacher les souches testées aux clones épidémiques et pandémiques de SASM et SARM (Van Leeuwen, 2003 ; Trad *et al.*, 2004). Longtemps réservés au laboratoire de recherche, ces outils ont bénéficié des progrès technologiques qui ont facilité leur conception, leur préparation et abaissé leur coût.

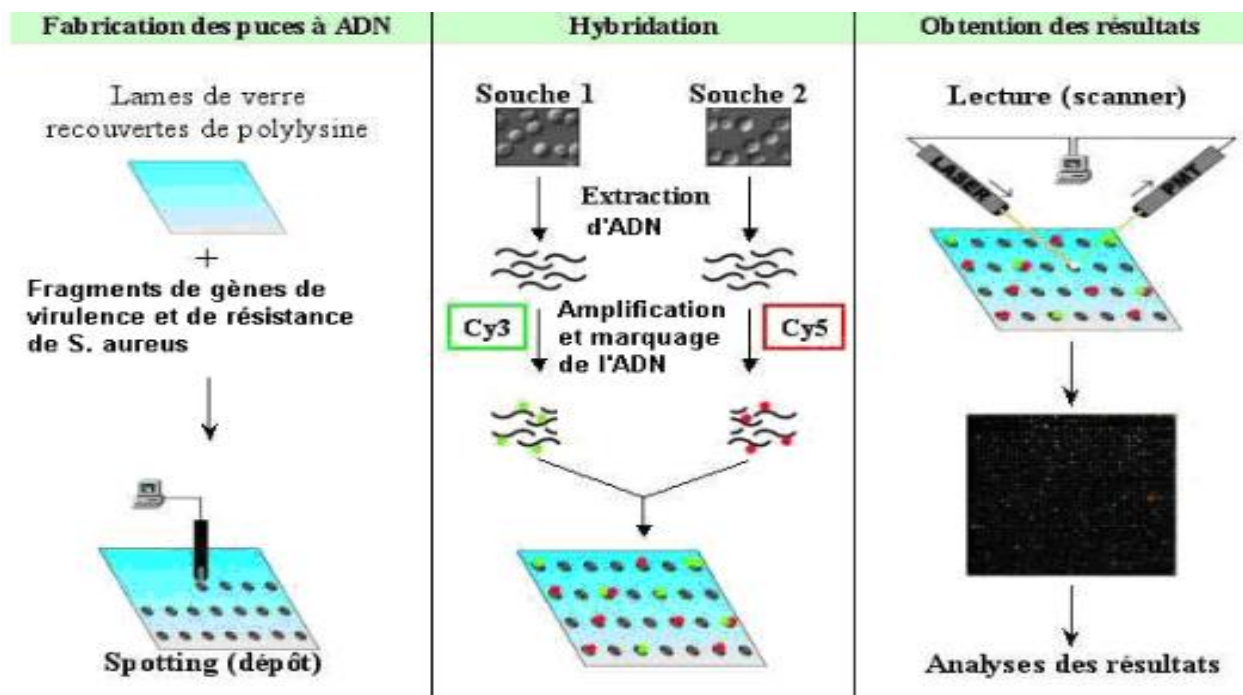


Figure 2 : Schématisation du principe de la puce à ADN (Kounasso *et al.*, 2007).

2.1.2.2. PCR toxine Leucocidine de Panton Valentine

La détection des souches de *S. aureus* productrices de PVL constitue un élément essentiel pour optimiser leur caractérisation. Une technique d'amplification génique par PCR en temps réel des gènes codant la leucocidine de Panton Valentine est utilisée. Elle permet l'utilisation des amorces spécifiques permettant d'amplifier un fragment d'ADN du gène *lukSF-PV*. La révélation des produits d'amplification est assurée par l'utilisation

d'intercalant dans l'ADN double brin. Le résultat peut être disponible en 3 heures (Vandenesch, *et al.*, 2017).

2.1.2.3. L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis)

L'ECP permet de comparer les souches de SARM en fonction de leur profil électrophorétique de macro restriction. Les fragments obtenus après digestion sont de grande taille (10-800 Kb), nécessitant l'utilisation de champs électriques complexes activés alternativement à intervalles de temps variables pour empêcher la formation de structures et d'enroulements secondaires gênant la migration.

L'ECP présente un très bon pouvoir discriminant pour *S. aureus*, les critères de différenciation des souches de *S. aureus* ont été déterminés par Tenover (Thompson *et al.*, 1997). Néanmoins, jusqu'à l'heure actuelle, la standardisation des protocoles d'ECP n'a pu être effectuée malgré de nombreux essais et comparaisons inter-laboratoires (Naas *et al.*, 2005).

1.3.1.3. Techniques de typage

La caractérisation des liens de clonalité entre souches de *S. aureus* nécessite l'utilisation d'une ou de plusieurs méthodes épidémiologiques. Différentes approches ont été développées.

1.3.1.3.1. Caractérisation de la Cassette SCCmec

L'élément génétique mobile portant le gène *mecA* est appelé cassette SCCmec ou «*Staphylococcal Cassette Chromosome mec* ». Il existe plusieurs types de cassette dont la structure et la taille varient. Elles sont toutes formées de deux éléments essentiels : Le complexe *mec* et les gènes codant les recombinaisons. Le complexe *mec* est composé du gène *mecA*, des éléments de régulation *mecI* et *mecR1*.

Des variations ont été détectées, notamment des délétions ou des insertions partielles dans les gènes de régulation de *mecA*. A ce jour, 11 cassettes SCCmec différentes sont définies et chaque clone de MRSA porte une cassette spécifique unique (Chongtrakool *et al.*, 2006 ; IWG-SCC, 2009).

1.3.1.3.2. Technique de typage spa ou spa-type

Le typage spa est une méthode très discriminante qui reflète à la fois les macro et les micro-variations génétiques dans la population du *S. aureus* (Koreen *et al.*, 2004 ; Le Loir, 2009). Cette technique est beaucoup plus simple que le MLST car elle est basée sur le séquençage d'un seul locus (Shopsin *et al.*, 1999). Chaque séquence répétée diffère l'une

de l'autre par une mutation ponctuelle (Kahl *et al.*, 2005). Ces différentes séquences sont désignées par un numéro (r01, r02, etc.). L'organisation de ces différentes séquences répétées au sein de la région X se traduit donc par une succession de chiffres. A chaque combinaison de chiffres est assigné un numéro de spa type (t001, t002 etc...). En pratique, les séquences sont analysées grâce au logiciel « Ridom *Staph* Type Software » (Friedrich *et al.*, 2006 ; Grundmann *et al.*, 2010).

1.3.1.3.3. Le séquençage multilocus (Multi Locus Sequence Typing, MLST)

Le MLST est une technique dérivée de l'électrophorèse des isoenzymes, "multi enzyme electrophoresis" (MLEE) (Enright *et al.*, 1999). L'analyse de la mobilité des électromorphes est remplacée par celle du séquençage nucléotidique de fragments internes de 7 gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire de base et conservés au sein de *S. aureus* (arcC, aroE, glpF, gmk, pta, tpi, yqiL) (Enright *et al.*, 1999). Les variations de séquence sont nombreuses pour chacun des 7 gènes.

Qu'elles proviennent d'une mutation ponctuelle ou d'une large recombinaison, chaque séquence différente constitue un allèle distinct désigné par un numéro arbitraire.

Pour une souche donnée, la combinaison de 7 numéros constitue le profil allélique dit "sequence type" (ST). Les avantages du MLST par rapport aux techniques usuelles de typage consistent en la précision et la reproductibilité des données du séquençage, et en l'accessibilité de celles-ci, grâce à des bases de données disponibles via internet. Le MLST détecte les variations qui sont survenues lentement, ce qui en fait actuellement l'outil le plus performant pour l'épidémiologie globale et les études de phylogénie chez *S. aureus* (Enright *et al.*, 1999 ; Urwin *et al.*, 2003).

Le MLST peut être étendue à des gènes codant des protéines de surface (sas gènes). Ces gènes ont la particularité d'être bien conservés au sein de l'espèce mais de suivre une évolution plus rapide que celle des gènes de ménage. Le séquençage conjoint de 7 gènes de ménage et de 7 gènes codant des protéines de surface aboutit à un MLST dit haute résolution, mis au point par l'équipe d'Enright *et al.* et utilisé dans les études phylogéniques (Robinson *et al.*, 2003). Un algorithme développé par Ed Feil disponible sur internet permet d'analyser les données issues du MLST (Feil *et al.*, 2004). La finalité de cet algorithme est de prédire les séquences type (ST) du clone ancestral ainsi que d'établir le cheminement de l'évolution des clones au sein du complexe clonal et permet d'apporter

une information sur l'évolution des souches et sur les relations phylogéniques qu'elles entretiennent entre elles.

1.3.1.4. Techniques d'analyse de la résistance aux antibiotiques

1.3.1.4.1. Détection du gène *mecA* de résistance à la méthicilline

Le gène *mecA* est recherché par PCR multiplex standardisée pour les souches de *S. aureus* et staphylocoques à coagulase négative. SCCmec est une nouvelle classe d'éléments génétiques mobiles composée du complexe du gène *mec* codant pour la résistance à la méthicilline et du complexe du gène *ccr* qui code pour les recombinaisons responsables de sa mobilité. Ces éléments portent également divers gènes de résistance aux antibiotiques non bêta-lactames (Felten *et al.*, 2003).

2.1.4.2. Détermination de la résistance à la méthicilline par expression du gène *mecC*

Le gène *mecC* correspondant à un variant du gène *mecA* et non détecté par les PCR ciblant le gène *mecA*, il est recherché par PCR pour les souches de *S. aureus* et staphylocoques à coagulase négative présentant une résistance isolée à la méthicilline (Vandenesch *et al.*, 2011).

1.3.1.4.3. Détection du gène *vanA* /B

Ce mécanisme de résistance a été décrit chez moins d'une dizaine de souches de *S. aureus* à travers le monde mais son apparition et sa dissémination constituent une source d'inquiétude majeure. Ils ne sont utilisés que sur les souches ayant une sensibilité diminuée aux glycopeptides après confirmation par les méthodes phénotypiques (Mirzaei, 2015). La PCR en temps réel a été développée pour la détection correcte et simultanée des gènes *vanA* et *vanB* dans des isolats de staphylocoques. De nouvelles sondes d'hybridation FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ont été conçues. Les résultats sont disponibles en moins d'une heure et demie pour le test PCR en temps réel, contre 5,5 heures pour le test PCR classique (Palladino *et al.*, 2003).

PARTIE EXPERIMENTALE

Objectifs de l'étude

L'habitat préférentiel du *Staphylococcus aureus* chez la plupart des animaux comme chez l'homme est la muqueuse nasale (portage naturel avec une densité d'environ 10^3 à 10^4 UFC/cm²) (Heczko et al, 1981), en effet, il peut survivre des mois au niveau des fosses nasales notamment au niveau du vestibule (Wertheim *et al.*, 2006, Devriese *et al.*, 1976). En 1954 Smith constate que les souches de *Staphylococcus aureus* liées à la volaille sont différentes de celles trouvées chez l'homme et d'autres animaux. Plus tard ; les études ont confirmé que les souches isolées de la volaille ressemblent plus à celles isolées chez l'homme plutôt que celles des autres animaux d'où l'hypothèse qu'elles pourraient être dérivées des souches humaines ou vice-versa. Depuis 2004, des études réalisées dans différents pays ont permis d'identifier un clone inhabituel de *Staphylococcus aureus* méthicillino-résistant (SARM) chez l'homme le ST398, ce clone a été retrouvé chez différentes espèces animales notamment la volaille (Gainière, 2010).

C'est dans ce contexte que notre étude a été lancée, notre principal objectif est de récolter le maximum de souches pour avoir des données assez conséquentes afin de prouver que les animaux qui vivent en confinement avec l'homme, à l'instar des autres pays (Europe, Canada, États Unis d'Amérique) peuvent être porteurs à l'état asymptomatique de souches de staphylocoques méthicillino-résistants et présenter ainsi un danger pour l'environnement et la santé publique.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons choisi d'étudier deux espèces animales dont l'élevage est le plus répandu au niveau de la zone d'étude (Bovins et volailles : *Gallus gallus* et *Meleagris*). Il a été procédé à l'isolement et à l'identification des souches de staphylocoques au moyen de méthodes conventionnelles, à partir des cavités nasales chez des sujets sains en respectant rigoureusement les mesures d'asepsie

Les souches isolées ont été soumises à :

- ✓ L'étude de la sensibilité aux antibiotiques vis-à-vis de 14 antibiotiques en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton à partir de disques imprégnés d'antibiotiques selon la méthode de Kirby Bauer.
- ✓ La confirmation phénotypique de la résistance à la méthicilline.
- ✓ La confirmation génotypique de la présence des gènes *mecA* et *mecC* codant pour cette résistance.
- ✓ La recherche du gène codant pour la toxine Panton-Valentine.

MATERIELS ET METHODES

1. Méthodologie

Les différentes étapes de notre méthodologie se résument comme suit :

➤ Confirmation de l'identification de l'espèce

Une identification phénotypique des souches s'est basée sur l'étude de l'aspect macroscopique, de l'examen microscopique à l'état frais et après coloration de Gram, des mises en culture en milieu liquide et solide et de l'étude du métabolisme bactérien grâce aux techniques biochimiques d'identification) (Carbannelle *et al.*, 1987).

➤ Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée pour 14 antibiotiques (CLSI, 2015) en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton à partir de disques imprégnés d'antibiotiques selon la méthode de Kirby Bauer et l'interprétation a été réalisée selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

➤ Confirmation de l'identification de l'espèce réalisée par

- Le recours à l'utilisation de la spectrométrie de masse, de type MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) a été indiquée pour une confirmation de l'identification grâce à son pouvoir de résolution très élevé suite à l'observation de certaines discordances dans l'identification des souches de staphylocoques principalement des staphylocoques à coagulase négative et des souches de *S. aureus* présentant des caractères « atypiques » par les techniques conventionnelles.
- La Quadriplex PCR ciblant l'ARNr 16S a été utilisée pour une meilleure caractérisation du genre *Staphylococcus*.

➤ Détection génotypique de la résistance à la méthicilline : en ciblant :

- Le gène **mecA**, devenu standard de référence pour la détection et la confirmation de la résistance à la méthicilline pour les *Staphylococcus aureus*
- Le nouveau gène de résistance à la méthicilline appelé **mecC** ou (**mecALGA251**).

- **La recherche du gène *luk-PVL* codant les deux protéines de la toxine Pantone–Valentine leukocidin (PVL) :** qui est produite par de nombreux clones de *S. aureus*, sensibles ou résistants à la méthicilline et associée à des infections sévères chez l’homme et l’animal.

Ces recherches ont été effectuées en utilisant :

- Pour les *Staphylococcus* à coagulase positive (SCP) : La technique utilisée est celle décrite par Stegger *et al.* en 2012 pour la détection rapide, la différenciation et le typage Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* par la détection des gènes *mecA*, *mecC*, *PVL*
- Pour les *Staphylococcus* à coagulase négative (SCN) : la technique utilisée est celle décrite par Zhang et ses collaborateurs en 2004, c’est une PCR en temps réel qui représente une approche simple, rapide, précise et fiable pour la détection précoce et fiable des *Staphylococcus aureus* et des staphylocoques non *aureus*

Tous les tests ont été validés en faisant des contrôles de qualité avec les souches de références :

- *S. aureus* ATCC 25923 et ATCC 29213 : Souches sensibles à l’oxacilline
- *S. aureus* ATCC 43866 : Souche résistante à l’oxacilline
- SARM ATCC 49775 comme contrôle positif pour les gènes *mecA*, et *PVL*
- SARM ATCC 49476 comme contrôle positif pour les gènes *mecA*
- SARM ATCC 43300 souche résistante à l’oxacilline et contrôle négatif pour le gène *PVL*.

2. Lieu et période de l’étude

L’étude a été réalisée au sein du laboratoire vétérinaire régional de Tizi-Ouzou durant la période allant de 2009 à 2014, complétée par une étude moléculaire au niveau des laboratoires de l’Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail (ANSES/France).

3. Zone de l’étude

La zone concernée par cette étude est représentée par les quatre wilayas du centre–nord algérien : Tizi-Ouzou, Bejaia, Boumerdès et Bouira. Le choix de ces wilayas a été motivé essentiellement par leur vocation agricole surtout par l’importance de leur élevage (bovin et aviaire) tant traditionnel qu’industriel.

4. Échantillonnage

Au total 32.000 prélèvements ont été réalisés de façon aléatoire durant la période de 2009 à 2014. L'étude a concerné 8000 prélèvements (écouvillons) d'origine bovine et 24.000 de gallinacés, dont 8000 à partir de poulettes pondeuses, 8000 de poulets de chair et 8000 réalisés chez la dinde chair.

Seuls les animaux (toutes espèces confondues) sans symptômes apparents de maladie ont fait l'objet de prélèvements.

Chez la volaille, les élevages ont été sélectionnés au hasard au niveau des wilayas ciblées par l'étude. Nous avons préféré travailler avec des exploitations identifiées au niveau desquelles l'application des mesures de prophylaxie sanitaire est de rigueur. Les sujets ont été pris d'une manière aléatoire et représentative de l'exploitation.

De la même façon, chez les bovins, nous avons ciblé des exploitations « modèles » respectant les mesures prophylactiques, et dont les éleveurs ont bien voulu collaborer dans le cadre de cette étude au niveau des wilayas ciblées.

5. Méthodes

5.1. Prélèvements nasaux

5.1.1. Chez la volaille et la dinde

L'écouvillonnage nasal est réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile utilisé pour les narines droite et gauche. Le prélèvement est ainsi effectué en enfonçant l'écouvillon le plus profondément possible dans la cavité nasale (1/3 inférieur) puis introduit dans le cul de sac conjonctival inférieur, sans toucher la face extérieure de la paupière pour recueillir les sécrétions nasales en effectuant plusieurs rotations. Cette procédure est répétée sans changer d'écouvillon pour les deux narines.

5.1.2. Chez le bovin

Les écouvillonnages nasaux ont été utilisés pour prélever du mucus de la cavité nasale individuellement de chaque bovin et d'une manière aléatoire selon le mode opératoire suivant :

L'écouvillon est inséré à une distance fixe de 10 cm pour atteindre les meatus ventral. Il est alors tourné plusieurs fois avant son retrait puis il est énergiquement pressé et roulé contre la paroi d'un petit flacon stérile à bouchon contenant 3 ml d'un milieu de transport sans antibiotiques (Milieu de transport pour écouvillons Axon Lab AG) (Annexe1).

6. Transport et conservation des prélèvements

Une fois prélevés, les écouvillons avec milieu de transport sont fermés correctement, identifiés et placés dans une enceinte réfrigérée à une température voisine de + 4 °C selon la norme (ISO 17604, 2015), puis acheminés au service de bactériologie médicale du laboratoire Vétérinaire Régional de Draa-Ben-Khedda.

Au laboratoire, l'analyse bactériologique est entamée le jour même ou au plus tard 72 heures après la réception de l'échantillon conservé au réfrigérateur.

7. Étude bactériologique

Nous avons utilisé les méthodes standards de laboratoire pour l'identification morphologique et biochimique des échantillons traités (Brun et Bes, 2000 ; Proctor *et al.*, 2006).

Chaque écouvillon est cultivé dans un bouillon d'enrichissement et ensemencé directement sur une gélose hyper salée au mannitol (Chapman) et la gélose au sang . Tous les milieux ensemencés sont incubés à 35 ± 2 °C. La gélose nutritive est utilisée pour la purification des souches. La composition et le mode de préparation des milieux qui ont servi à notre étude sont rapportés dans l'annexe 1.

7.1. Milieux d'enrichissement

Par crainte de ne pouvoir récolter le germe suite à la conservation et au transport, nous avons tenu à réaliser un enrichissement (De Buyse *et al.*, 2010). Chaque écouvillon est introduit dans 3 ml de milieu « Infusion cœur-cerveille », après une incubation de 24 heures à 35 ± 2 °C, nous obtenons un bouillon trouble expliquant la multiplication des microorganismes (Marchal *et al.*, 1973).

7.2. Milieux d'isolement

7.2.1. Milieu de Chapman

Notre choix a porté sur ce milieu qui permet principalement la croissance des espèces du genre *Staphylococcus* au détriment des autres bactéries contenues dans un produit pathologique, c'est un milieu hyper salé à 7,5% de NaCl et 1% de mannitol et contient un indicateur de pH (rouge de phénol),

7.2.2. Gélose nutritive (GN)

Cette gélose a été utilisée lors de la purification, permet le développement de la plupart des microorganismes, parmi eux le staphylocoque. Étalées à la surface de la gélose, nous obtenons autant de colonies qu'il y avait de bactéries à l'origine.

7.2.3. Gélose au Sang

Elle est obtenue en ajoutant 5 à 10ml de sang de cheval ou de mouton défibriné pour chaque 100 ml de gélose Mueller-Hinton ou gélose Columbia préalablement fondues et refroidies à 70°C, la température est maintenue à 70°C pendant 10 minutes. Le milieu est refroidi à 50°C avant de le couler en boîtes de Pétri pour éviter la condensation des globules rouges.

7.3. Isolement

7.3.1. Isolement direct

Les écouvillons nasaux sontensemencés directement par épuisement sur gélose Chapman et sur la gélose au sang cuit en boîte de Pétri, de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation à 35±2°C pendant 24 heures.

7.3.2. Isolement après enrichissement

Chaque écouvillon est placé en même temps de l'isolement direct dans un tube contenant le bouillon BHIB (infusion cœur cerveau). Après une incubation de 18 à 24 heures à 35±2°C, l'écouvillon estensemencé de la même façon que dans l'isolement direct sur le milieu d'isolement.

7.4. Caractéristiques des colonies

7.4.1. Aspect macroscopique

7.4.1.1. Milieu de Chapman

Sur le milieu de Chapman, les colonies sont souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune, la plupart des souches de *S. aureus* fermentent le mannitol et font virer le milieu du rouge au jaune orangé telle que le montre la figure N°3.



Figure 3 : Colonies de Staphylocoques sur gélose Chapman (photo LVR /DBK)

7.4.1.2. Gélose Nutritive

Sur gélose nutritive, en 18 à 24 heures à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, les colonies sont lisses, les souches *S. aureus* produisant en général un pigment jaune.

7.4.1.3. Gélose au sang

L'isolement à partir de cette gélose se fait après 18 à 24 heures à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, les colonies ainsi obtenues sont circulaires, volumineuses, opaques éventuellement pigmentées et de couleur jaune et légèrement bombées ou aplaties ; avec ou sans zone d'hémolyse elles présentent une surface luisante et humide. Les colonies produites sur GSC sont de plus grand diamètre que celui des colonies produites sur GN. Ces caractéristiques sont illustrées par la figure N°4.



Figure 4 : Colonies de Staphylocoques sur gélose au sang (Photo LVR /DBK)
Aspect macroscopique

7.4.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram est effectuée à partir des colonies cultivées sur gélose de Chapman ou sur gélose au sang présentant l'aspect caractéristique du staphylocoque.

7.4.3. Purification des souches isolées

Après la période d'incubation, selon leurs caractéristiques, les colonies dont l'aspect évoque celui des staphylocoques sont ré-isolées à l'aide d'une pipette Pasteur, et sont ensemencées en stries selon la méthode des quatre quadrants de telle manière à bien les distinguer. Une coloration de Gram est refaite chaque fois pour contrôler la pureté des souches.

7.4.4. Identification biochimique

En plus des caractères morphologiques, l'identification est aussi effectuée sur la base des caractères biochimiques suivants :

7.4.4.1. Catalase

Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques. À l'aide d'une pipette Pasteur et à partir de la gélose au sang cuit, nous avons prélevé soigneusement, une petite quantité de culture bactérienne du haut des colonies en évitant de prélever les érythrocytes de la gélose au sang (catalase positive), pour ne pas fausser la réaction. Les colonies ainsi prélevées sont placées sur une lame, et à l'aide d'une pipette Pasteur sont ajoutées quelques gouttes du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (effervescence=dégagement d'oxygène).

7.4.4.2. Staphylocoagulase

Le plasma de lapin lyophilisé est utilisé pour la détection de la coagulase libre produite par *Staphylococcus aureus* (Annexe 2).

À partir d'une culture pure de 18 à 24 heures en bouillon nutritif enrichi (cœur-cervelle) de la souche à étudier, nous avons prélevé 0,5 ml de la suspension bactérienne à laquelle nous avons ajouté 0,5ml de plasma de lapin reconstitué, le mélange obtenu est ainsi incubé à $35\pm 2^\circ C$ pendant 1 à 2 heures voire 24 heures. Les témoins négatif et positif sont préparés en parallèle, en effet, le témoin négatif est préparé en mélangeant le bouillon nutritif au plasma de lapin sans ensemencement bactérien, par contre, le témoin positif est préparé de la même manière que la souche à étudier mais en utilisant la souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

La production de la coagulase libre par *Staphylococcus aureus* provoque la formation d'un caillot de coagulation, observé par inclinaison du tube, au point que quelque fois le tube peut être retourné. Nous avons considéré comme positif même des caillots moins compacts, visibles avant la 24^{ème} heure par peur d'avoir une fausse réaction négative suite à la re-dissolution provoquée par la fibrinolysine.

▪ Test d'agglutination

Nous avons utilisé le Pastorex *Staph-Plus*.

- **Principe**

Le Pastorex Staph-Plus ou Test d'agglutination au Latex : comprend des particules de latex bleu sensibilisées avec du fibrinogène humain et des anticorps monoclonaux. Il permet la détection simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène (clumping factor), de la protéine A par le fragment Fc des IgG de souris, d'un antigène de groupe lié aux structures périphériques spécifiques de *Staphylococcus aureus*. En présence de colonies de *S. aureus*, on pourra donc observer une agglutination visible à l'œil nu.

- **Échantillons (prélèvements et préparation)**

Après isolement des microorganismes sur des milieux de cultures appropriés selon les techniques habituelles, nous repérons les colonies suspectes (morphologie, Gram, catalase). Si les colonies sont très petites, nous prolongeons le temps d'incubation à 48 heures à (35±2°C).

- **Mode opératoire**

1. Les réactifs sont mis d'abord à température ambiante (18-25°C) avant utilisation.
2. Par la suite, ils sont remis en suspension en chassant les bulles retenues dans les compte-gouttes.
3. Sur une carte jetable, nous choisissons deux cercles adjacents et nous les identifions.
4. Dans l'un des cercles, nous déposons une goutte de réactif N°1 (latex anti-*Staphylococcus aureus*) ; dans le deuxième, une goutte du réactif N°2 (latex contrôle négatif).
5. En utilisant des bâtonnets jetables différents, nous ajoutons les colonies suspectes dans chacun des deux cercles : soit 1 à 2 colonies de taille moyenne issues d'un milieu non sélectif (dans le cas de la gélose au sang), soit 3 à 6 colonies de petite taille issues d'un milieu sélectif (cas de la gélose Chapman).
6. Nous veillons à bien étaler les colonies sur toute la surface des cercles puis nous mélangeons soigneusement pendant 10 secondes à l'aide de bâtonnets jetables.
7. À la fin, nous appliquons sur la carte un léger mouvement de rotation pendant 20 secondes. La réaction peut alors être lue sous éclairage normal sans utilisation de loupe.

- **Lecture et interprétation des résultats**

- **Réaction positif :** Présence d'agglutination visible à l'œil nu
- **Réaction négative :** Absence d'agglutination

Contrôle de qualité : Afin de vérifier l'efficacité des réactifs, nous procédons à un contrôle de qualité des réactifs qui doit être effectué au minimum à chaque ouverture d'un nouveau coffret avec les souches de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990. La figure N°5 représente les composants du coffret *Pastorex Staph-Plus* et un exemple de test positif et de test témoin négatif.



Figure 5 : Test d'agglutination Pastorex (LVR/DBK)

7.4.4.3. Confirmation à l'aide de la galerie API *Staph* (bioMérieux)

API *Staph* est un système standardisé permettant l'identification de 23 espèces bactériennes appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données.

❖ Principe

La galerie API *Staph* comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés (Figure 6). Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans l'API *Staph* Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification. La figure N°6 montre une galerie avant et après ensemencement, le complément de réactifs et le tableau de lecture.

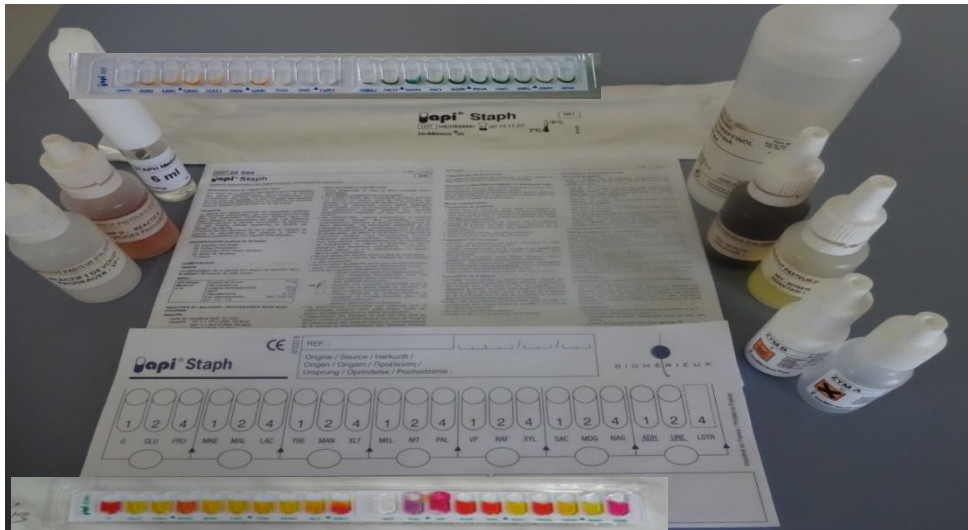


Figure 6 : Galerie Api Staph et réactifs (LVR/DBK)

❖ Échantillons (prélèvements et préparation)

La galerie API Staph ne doit pas être utilisée directement à partir des produits d'origine clinique ou autre. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

❖ Mode opératoire

➤ Préparation de la galerie

- ✓ Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée ou toute autre eau sans additif ou dérivées susceptibles de libérer des gaz (CO_2 , Cl_2 ...) dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- ✓ Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- ✓ Sortir la galerie de son emballage.
- ✓ Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ Préparation de l'inoculum

- ✓ Réaliser une pré-culture sur gélose au sang pendant 24 heures à 35 ± 2 °C.
- ✓ Ouvrir une ampoule API Staph Medium.
- ✓ Préparer une suspension bactérienne homogène d'opacité égale à 0,5 de Mc Farland avec les cultures jeunes (18-24heures).

➤ **Inoculation de la galerie**

- ✓ À l'aide d'une pipette Pasteur stérile remplir les tubes de la galerie API *Staph* Mediumensemencé.
- ✓ Créer une anaérobiose dans les tests ADH et Urée en complétant les cupules avec l'huile de paraffine.
- ✓ Refermer la boîte d'incubation
- ✓ Incuber à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant 18-24 heures.

➤ **Lecture et interprétation de la galerie**

Après incubation, la lecture des réactions se fait conformément au tableau de lecture en ajoutant une goutte de chacun des réactifs suivants est ajoutée pour les différentes réactions suivantes :

- ✓ Réaction de Vosges Proskauer : VP 1 et VP 2
- ✓ Recherche d'une nitrate réductase : NIT 1 et NIT 2
- ✓ Recherche d'une phosphatase alcaline : ZYM A et ZYM B

Une fois les réactifs ajoutés, nous attendons 10 minutes pour la lecture.

- ✓ Pour la réaction de Vosges Proskauer, une coloration violette ou rose franche indique une réaction positive et une coloration rose pâle ou incolore indique une réaction négative.
- ✓ Pour la nitrate réductase, une réaction rouge indique une réaction positive.
- ✓ Pour la phosphatase alcaline, une coloration violette indique une réaction positive.

L'interprétation est obtenue à partir du profil numérique à 7 chiffres et l'identification se fait à l'aide du logiciel d'identification.

La figure N°7 résume le protocole de recherche des staphylocoques dans les écouvillons

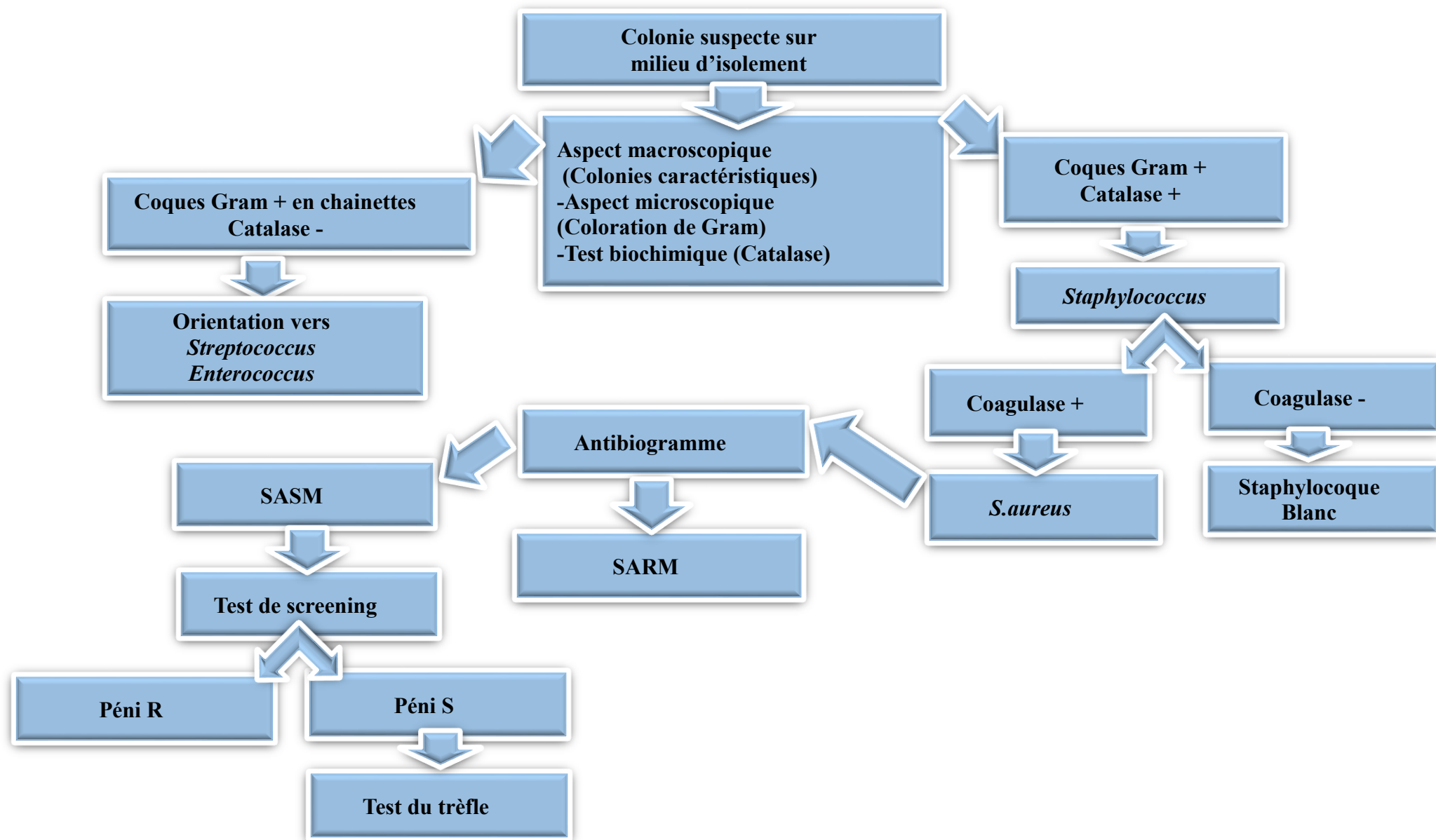


Figure 7 : Protocole de recherche des staphylocoques dans les écouvillons. S Peni: Sensible à la pénicilline; R Peni: Résistant à la pénicilline

8. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques est effectuée selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique sur gélose à partir de disques d'antibiotiques selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (*CLSI*, 2016).

8.1. Technique de l'antibiogramme par diffusion des disques en milieu gélosé de Muller-Hinton (méthode de Kirby et collaborateurs)

Cette méthode consiste à appliquer des disques imprégnés d'une concentration définie en antibiotique, sur une gélose tapissée d'une suspension bactérienne à tester (Bauer, 1966). Ainsi, l'antibiotique diffuse selon un gradient de concentration et génère une zone circulaire sans croissance bactérienne dont la taille varie selon la sensibilité de la bactérie à l'antibiotique. Les zones d'inhibition sont directement corrélées avec des valeurs de concentrations minimales inhibitrices (CMI). Ces zones calculées en millimètres permettent de classer la sensibilité à l'antibiotique en trois catégories : sensible, intermédiaire et résistant (Jorgensen *et al.*, 2003).

A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu Chapman et à l'aide d'une anse de platine, nous avons raclé quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, l'anse est déchargée dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. À l'aide d'un vortex, la suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. Par la suite, un écouvillon stérile est trempé dans l'inoculum, puis essoré en le pressant fermement contre la paroi interne du tube puis frotté sur la totalité de la surface gélosée Mueller Hinton, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Cette opération est répétée 3 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Cette opération est finalisée en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'une boîte de Pétri est ensemencée.

8.2. Choix des antibiotiques

Le choix des différents antimicrobiens testés s'est fait dans un but de représenter le plus de classes d'antibiotiques possible en respectant les recommandations du *CLSI*.

8.3. Antibiotiques testés

Quatorze molécules différentes, appartenant à huit familles d'antibiotiques, connus pour être actifs sur cette bactérie sont testés. Le tableau N° 4 représente la liste et les charges des antibiotiques testés.

Tableau 4 : Liste des antibiotiques testés

Antibiotiques testés	Charge des disques
B-Lactamines :	
Pénicilline (PEN)	10UI
Oxacilline (OXA)	1 µg
Céfoxitine (FOX)	30 µg
Amoxicilline + acide clavulanique (AMC)	20/10 µg
Pénicilline + Novobiocine (PNO)	10UI/30 µg
Aminosides :	
Gentamycine (GEN)	10 µg
Néomycine (NEO)	30 µg
Kanamycine (KAN)	30 µg
Macrolides :	
Erythromycine (ERY)	15 µg
Quinolones :	
Enrofloxacin (ENR)	5 µg
Tétracyclines :	
Tétracycline (TCY)	30 µg
Lincosamides :	
Clindamycine (CLI)	2 µg
Sulfamides :	
Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole (SXT)	1,25/23,75 µg
Glycopeptides :	
Vancomycine (VAN)	30 µg

8.4. Antibiogramme

La méthode classique de diffusion en gélose à partir de disques imprégnés d'antibiotiques selon les recommandations du *CLSI* a été utilisée. Une lecture impérative est appliquée déterminant la sensibilité ou la résistance de la souche en comparant les diamètres des zones d'inhibition des souches avec ceux des valeurs critiques figurant dans la table de lecture. Les E. Test ont été aussi effectués pour déterminer les CMI pour les antibiotiques présentant un diamètre intermédiaire.

8.5. Application des disques d'antibiotiques

Six disques d'antibiotiques sont appliqués à l'aide d'un distributeur, espacés de 24 mm, centre à centre sur une boîte ronde de 90mm de diamètre. Les boîtes sont, ensuite, incubées immédiatement pendant 18 heures en atmosphère ordinaire à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats obtenus sont alors comparés aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture, puis la bactérie est classée dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante. Notons que le contrôle de qualité est réalisé à l'aide de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 traitée dans les mêmes conditions que la souche à tester. Ce contrôle valide le résultat du test et permet de contrôler les disques d'antibiotiques et la qualité du milieu Mueller-Hinton.

9. Recherche des CMI (E test)

Cette technique a été utilisée pour le classement de tous les résultats d'antibiogrammes avec des valeurs de diamètres d'inhibition appartenant à la classe intermédiaire, c'est une technique de gradient de diffusion hybride, entre les méthodes de Kirby-Bauer et de dilutions.

Des bandelettes de plastique contenant un antibiotique, dont le gradient de concentration varie sur la longueur de la bandelette, sont appliquées sur une gélose tapissée d'une suspension bactérienne. Une zone ellipsoïdale se forme selon la sensibilité de la bactérie d'où le nom E test. À l'endroit où la croissance rejoint la bandelette on obtient une valeur de CMI (Jorgensen *et al.*, 2003). La détermination de la CMI pour la vancomycine est obligatoire car le disque vancomycine ne permet pas de différencier les souches Vanco « S » et « I » des *Staphylococcus aureus* ni des souches « S », « I » et « R » du SCN car les diamètres d'inhibition sont similaires (CA-SFM, 2014). La figure N°8 nous montre la concentration inhibitrice minimale pour la vancomycine en utilisant les bandelettes E.Test ($\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/ml}$).

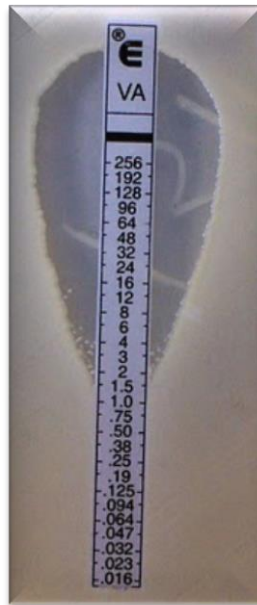


Figure 8 : Concentration inhibitrice minimale ($MIC \leq 2 \mu g/ml$) : vancomycine
(Photo IPA ., 2011)

10 : Recherches complémentaires obligatoires de la résistance de *S. aureus* à l'oxacilline

10.1. Recherche de la résistance de *Staphylococcus* spp. à l'oxacilline

En pratique, les disques d'oxacilline (1µg) et de céfoxitine (30µg) doivent être testés simultanément au niveau de l'antibiogramme standard de *S. aureus*, car plus facile à lire et aussi comparable à celui de l'oxacilline pour détecter la résistance à l'oxacilline par production de PLP2a (gène *mecA*) comme le rapporte la figure N° 9. Devant tout problème d'interprétation, nous avons eu recours au test de confirmation par la technique du screening à l'oxacilline est réalisé (test MRSA). (CLSI, 2016).

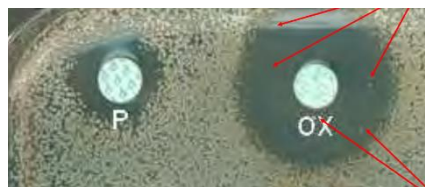


Figure 9 : Détection de la résistance à la méticilline (Photo IPA ., 2011)

10.2. Test de screening à l'oxacilline pour *Staphylococcus aureus*

Nous avons utilisé ce test pour confirmer la résistance à l'oxacilline, les étapes sont réalisées comme suit :

❖ Préparation de la solution d'oxacilline

- ✓ Diluer 6 mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1g) dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis faire une dilution au 1/10^{ème}.

❖ Préparation de la gélose

- ✓ Prendre 2 ml de cette solution d'oxacilline déjà préparée dans une boîte de Pétri de 90mm de diamètre, ajouter 18ml de gélose Muller Hinton (MH) additionnée de 4% de NaCl.
- ✓ Mélanger en faisant des mouvements rotatoires. Laisser solidifier puis sécher les boîtes à l'étuve.

❖ Inoculum

- ✓ La suspension bactérienne est préparée en eau physiologique à 0,9% d'une opacité équivalente à 0,5 Mc Farland et prélevée à partir d'une culture pure de 18 H sur milieu d'isolement. L'ensemencement se fait immédiatement ou dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

❖ Ensemencement

- ✓ L'ensemencement se fait par spot, en appliquant verticalement, sur la gélose, l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne (ou même ensemer un cadran entier).
- ✓ Les souches de référence doivent être testées dans les mêmes conditions :
S.aureus ATCC 29213 sensible à l'oxacilline.
S.aureus ATCC 43300 résistant à l'oxacilline.

❖ Incubation : Elle se réalise à 35±2°C pendant 18 à 24 H en atmosphère ordinaire.

❖ Lecture

La culture de plus d'une colonie de la souche test indique une résistance à l'oxacilline, impliquant la résistance à toutes les bêta-lactamines. La figure N°10 confirme que la souche à tester est résistante à l'oxacilline.

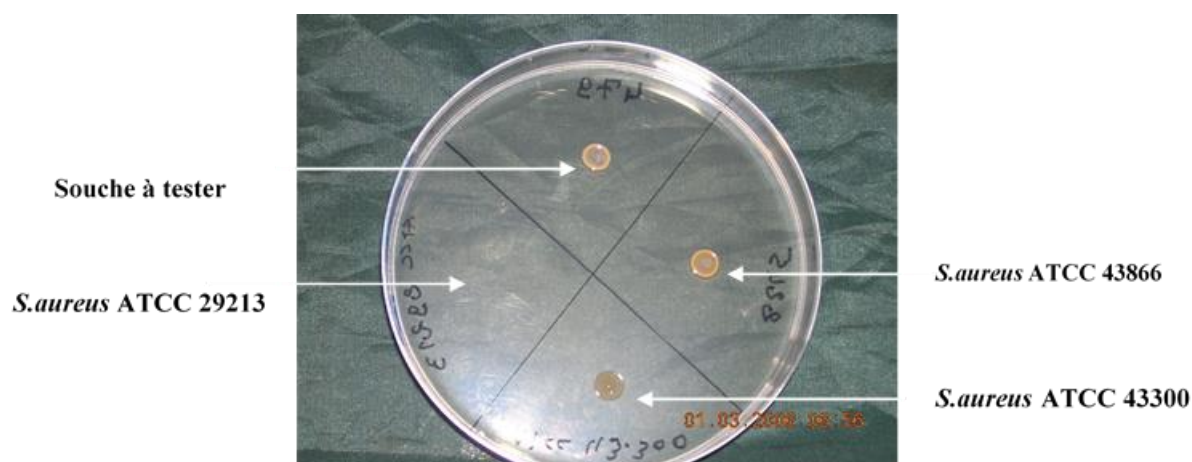


Figure 10 : Test de la recherche de la résistance à l'oxacilline chez *S. aureus*.
(Photo IPA /Algérie)

10.3. Recherche de la bêtalactamase (test du trèfle)

La pénicilline (β - lactamase) du *S. aureus* constitue historiquement le premier mécanisme de résistance (Kirby.,1944), codée par le gène *blaZ* et portée par un plasmide. Sa recherche est réalisée pour toute souche présentant un diamètre d'inhibition ≤ 29 mm à la pénicilline.

À partir d'une culture pure de 18 à 24 H, nous réalisons une subculture en bouillon cœur-cervelle pour la souche à étudier ainsi que pour les souches de références. La souche de *S. aureus* ATCC 25923 sensible à la pénicilline (témoin négatif) estensemencée sur la totalité de la gélose Mueller-Hinton puis un disque de pénicilline G est appliqué au centre de la boîte. Une nouvelle fois, cette même souche estensemencée en strie radiale sur cette même boîte du centre vers la périphérie. De la même manière, sontensemencées la souche *S. aureus* ATCC 43300 résistante à la pénicilline (témoin positif) et la souche à tester. La boîte est incubée alors, pendant 18 à 24 heures à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en atmosphère normale. La production de la β -lactamase (Pénicilline) par la souche à étudier et la souche témoin positif induit la culture de la souche témoin négatif (sensible à la pénicilline) jusqu'au contact du disque de pénicilline.

11. Conservation des souches

La conservation permet de réduire au minimum les risques de contamination croisée, de mutation ou d'altération des caractéristiques typiques des souches isolées. Les souches présentant un phénotype résistant à la céfoxitine sont conservées dans plusieurs tubes gélosés de conservation à température ambiante.

12. Caractérisation génotypique des souches de *Staphylococcus* spp.

La caractérisation génotypique a été effectuée au laboratoire de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail à Ploufragan en France. 13 isolats de *Staphylococcus* spp. choisis de manière aléatoire ont pu faire l'objet de l'analyse moléculaire. Le tableau N°5 précise les commémoratifs relatifs à chaque souche testée. Les techniques utilisées par le laboratoire de l'ANSES sont décrites ci-dessous.

Tableau N° 5 : Origine, date de prélèvements et matrice des différentes souches caractérisées

N° de la souche	Espèce d'origine	Date du prélèvement	Origine du prélèvement (Wilaya)	Matrice
4	Poulet de chair	2010	Bouira	Ecouvillonnage nasal
8	Poulet de chair	2010	Boumerdès	Ecouvillonnage nasal
10	Bovine	2010	Tizi-Ouzou	Ecouvillonnage nasal
5	Poulet de chair	2011	Bejaia	Ecouvillonnage nasal
9	Poulet de chair	2011	Boumerdès	Ecouvillonnage nasal
11	Bovine	2012	Tizi-Ouzou	Ecouvillonnage nasal
6	Poulet de chair	2013	Boumerdès	Ecouvillonnage nasal
12	Bovine	2013	Tizi-Ouzou	Ecouvillonnage nasal
1	Bovine	2014	Boumerdès	Ecouvillonnage nasal
2	Bovine	2014	Tizi-Ouzou	Ecouvillonnage nasal
3	Poulet de chair	2014	Bouira	Ecouvillonnage nasal
7	Poulet de chair	2014	Bejaia	Ecouvillonnage nasal
13	Bovine	2014	Tizi-Ouzou	Ecouvillonnage nasal

12.1. Préparation des souches pour l'étude moléculaire

Après réception des souches ayant présenté un phénotype R à la céfoxitine préparés dans des tubes gélifiés de conservation, deux repiquages sont effectués pour chaque souche : le premier consiste à les inoculer dans du BHIB liquide et le deuxième repiquage est effectué sur milieu

solide, gélose tryptone soja (TSA). Les deux milieux sont alors incubés à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18 h. Une confirmation de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF et un antibiogramme sont effectués dans le but de confirmer les résultats obtenus au moyen de méthodes conventionnelles.

12.2. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

❖ Principe

La spectrométrie de masse MALDI TOF consiste à mélanger en excès une solution organique saturée de cristaux, appelée matrice, avec la colonie bactérienne à identifier, le mélange étant ensuite directement déposée sous forme d'un fin frottis (spot) à la surface d'une plaque métallique, formant ainsi la cible (Figure 11). Elle est ensuite introduite dans le système MALDI-TOF et, bombardée par un laser (Descy *et al.*, 2010). Les ions ainsi générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ électrique qui les dirige dans un tube de vol vers l'analyseur. Ce dernier permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol (TOF : Time-Of-Flight) et de produire un spectre de masse (Suarez, 2013).

En moins de 2 minutes, le premier spectre de masse est produit, c'est une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de la composition en protéines du microorganisme analysé. L'identification se base sur la comparaison de la position des pics du spectre de masse inconnu avec tous les spectres typiques enregistrés dans la banque de données de spectres. Un logiciel propose un score d'appariement et précise ainsi la ou les identifications bactériennes les plus plausibles (Seng *et al.*, 2009).

❖ Préparation de la matrice

Ajoutez 250 µl de solvant standard (acétonitrile 50%, eau 47,5% et acide trifluoroacétique 2,5%) au contenu du tube avec bouchon à vis IVD HCCA [concentration finale : 10 mg IVD HCCA/ml (Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique)] et refermez le tube; agitez le tube avec bouchon à vis et utilisez le Vortex pour dissoudre entièrement l'IVD HCCA à température ambiante; centrifuger 5 min à 13000 rpm; transférer le surnageant dans un tube propre, la matrice est prête à l'utilisation (Alioua, 2015).

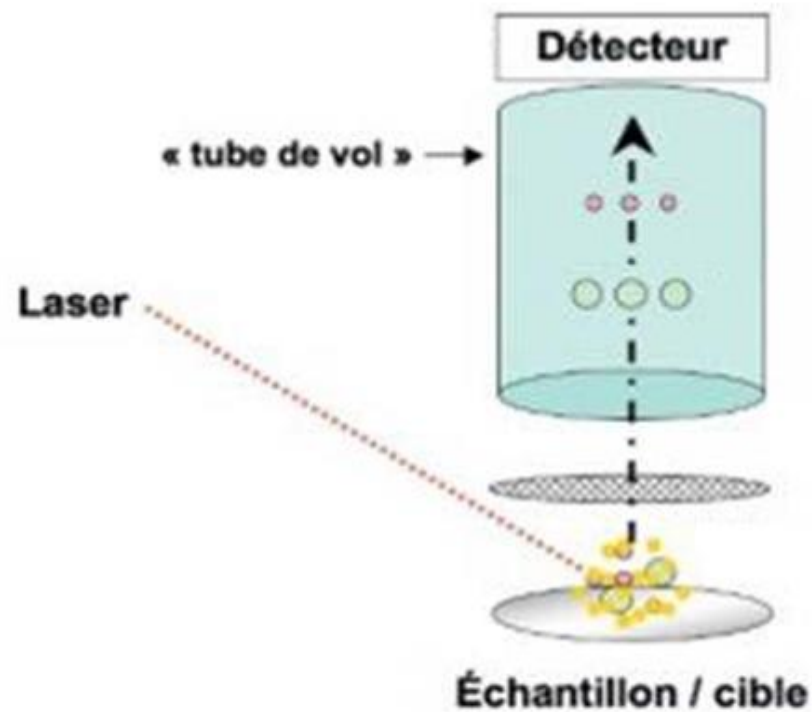
❖ Préparation des échantillons

La première étape de préparation des échantillons est celle de la mise en place du plan de dépôt qui se fait à partir du *Sirweb* qui est un logiciel servant à introduire les différentes données des échantillons (commémoratifs sur l'origine de la souche ainsi que les résultats de l'antibiogramme) (Figure 11).

Transférez une seule colonie sous forme de fine pellicule à l'aide d'un embout (de 0,1 à 10 µl), directement sur une cible MALD (1 spot sur la lame). Recouvrez l'échantillon avec 1 µl de la solution IVD HCCA. Laissez sécher l'échantillon recouvert de matrice à température ambiante pendant 5 min puis introduisez la lame dans le MALDI-TOF et lancez l'analyse (Alioua, 2015).

❖ **Validation des résultats**

Les résultats d'identification sont donnés par le germe associé à un score de 0 à 3 ; l'identification est validée lorsqu'un score supérieur à 1,9 est enregistré ; dans le cas où le score est inférieur à 1,9 ; nous ne notons pas d'identification (Alioua, 2015).



● > ● : protéines

● : matrice

- ▶ **détection** des protéines
- ▶ **mesure** du temps écoulé entre un T0 et l'impact sur le détecteur (TOF)
- ▶ obtention du **spectre** formé de pics
- ▶ **comparaison** du spectre obtenu avec les spectres de la base de données
 - identification
 - score de similitude (% , nombre)

En quelques minutes !

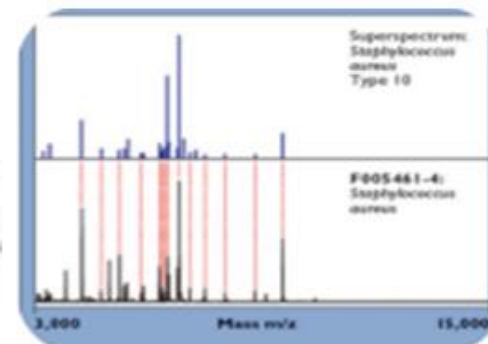
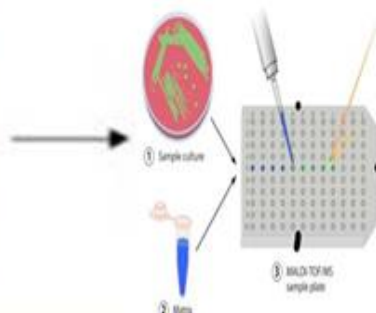


Figure 11 : Principes et étapes d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Courcol, 2009)

13. Caractérisation des gènes de résistances

Les techniques conventionnelles de recherche de résistance n'ont pu déceler que les profils phénotypiques des souches isolées sans préciser les faibles activités de résistance ou même la présence de populations hétérogènes présentant des résistances variables. C'est la raison pour laquelle nos efforts ont été orientés dans cette démarche pour la réalisation de l'analyse moléculaire qui permet d'être plus précis quant au statut d'un microorganisme face à un agent antimicrobien en identifiant les bactéries ayant le potentiel génétique nécessaire à l'antibiorésistance. Le laboratoire de biologie moléculaire de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a défini le nombre de souches sur lesquelles il pouvait apporter sa contribution ainsi que sur les techniques utilisées afin de mettre en évidence les gènes de résistance notamment sur les souches de *Staphylococcus* présentant un intérêt épidémiologique donc ayant présenté un phénotype R (résistant) à la céfoxitine.

13.1. Extraction d'ADN bactérien

De nombreuses techniques sont utilisées pour isoler l'ADN bactérien en suivant les étapes habituelles de la rupture cellulaire, de l'élimination des protéines, suivie de la libération du matériel génétique. Dans le cadre de notre travail, le protocole suivi est celui de Ryffel et *al.*, 1990. Il permet d'obtenir un ADN de haute qualité pouvant être stocké pendant plusieurs années dans des conditions appropriées. A partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle, 5 ml sont prélevés et centrifugés à 6000 tours/minute pendant 10 min jusqu'à formation d'un culot compact. Le surnageant est jeté par la suite puis le culot est transféré dans un tampon auquel 30 µl de Sulfate de Dodécyl Sodium à 10% et 3 µl de protéinase-K sont ajoutés. Après incubation à 37 ° C pendant 1 h, un mélange de NaCl et du chloroforme/alcool isoamylique sont ajoutés. Après deux centrifugations successives à 6000 tr/min pendant 5 min, un précipité d'ADN est obtenu auquel une autre centrifugation à 10 000 tr / min pendant 10 min à température ambiante est pratiquée. Le surnageant est ainsi éliminé puis 100 µl d'éthanol à 70% sont ajoutés pour obtenir un culot, qui sera par la suite séché par évaporation complète de l'éthanol. Celui-ci est ensuite remis en suspension dans 50 µl de tampon Tris EDTA (TE) . Les échantillons de l'ADN ainsi récoltés sont conservés à -20°C.

Les suspensions sont agitées et centrifugées à 13200 rpm pendant 5 min avant utilisation.

13.2. Détection du gène *mecA*, *mecC* (*mecALGA251*), *SPA* et *PVL*

13.2.1. Chez les *Staphylococcus aureus*

Le protocole suivi est celui décrit par Stegger et *al.* (2012) qui permet en plus de la confirmation de l'identification du *S. aureus* par amplification du gène *spa*, la confirmation de la résistance

à la méthicilline par amplification simultanée des gènes *mecA* et *mecC*, et la détection du gène qui code pour la Leukocidine Pantone Valentin (PVL or LukF PV). Pendant longtemps la détection de la résistance des SARM était conditionnée par la détection du gène *mecA*, actuellement, plus d'intérêt est accordé à la recherche des gènes *mecC* ou *mecA*_{LGA251}.

❖ Souches de contrôle utilisées

- ✓ SARM ATCC 50A247 : Contrôle positif pour le gène *mecA*,
- ✓ SARM ATCC 25923 : Contrôle négatif pour le gène *mecA*, rrs mais positif pour fem.
- ✓ SARM ATCC 49775 comme contrôle positif pour les gènes *mecA*, *nuc* et PVL
- ✓ SARM ATCC 43300 comme contrôle négatif pour le gène PVL
- ✓ SARM ATCC LGA251 comme contrôle positif pour le gène *mecC*
- ✓ Témoin eau comme control négatif pour tous les gènes.

❖ Préparation des amorces *spa/mecA/mecALGA251/PVL*

Mélange 1 : *spa/mecA/mecALGA251/PVL* :

1. Prendre 900 µl H₂O
2. Additionner 25 µl *spa*-1113F (100 µM)
3. Additionner 25 µl *mecA*-P4 (100 µM)
4. Additionner 25 µl PVL-F (100 µM)
5. Additionner 25 µl *mecALGA251* MultiFP (100 µM)
6. Agiter par utilisation vortex : le mélange *spa/mecA/mecALGA251/PVL*

Mélange 2: *spa/mecA/mecALGA251/PVL* Reverse primers:

1. Prendre 900 µl H₂O
2. Additionner 25 µl *spa*-1514R (100 µM)
3. Additionner 25 µl *mecA*-P7 (100 µM)
4. Additionner 25 µl PVL-R (100 µM)
5. Additionner 25 µl *mecALGA251* MultiRP (100 µM)
6. Agiter par utilisation vortex : *spa/mecA/mecALGA251/PVL* .

❖ Préparation des échantillons pour la PCR

- ✓ Le Master mix (DreamTaq™ Green PCR Master Mix) est utilisé pour une meilleure homogénéisation des échantillons afin de faciliter la préparation de la réaction de PCR.
- ✓ **Amorces utilisées** : Le tableau N°6 suivant résume l'ensemble des séquences des amorces utilisées.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR

Amorce	Séquence (5' - 3')
<i>spa-1113F</i>	5' – TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC – 3'
<i>spa-1514R</i>	5' – CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT – 3'
<i>mecA P4</i>	5' – TCCAGATTACAACCTTCACCAGG – 3'
<i>mecA P7</i>	5' – CCACTTCATATCTTGTAACG – 3
<i>pvl-F</i>	5' – GCTGGACAAAACCTTCTTGGAATAT – 3'
<i>pvl-R</i>	5' – GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG – 3'
<i>mecALGA251 MultiFP</i>	5' – GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC – 3'
<i>mecALGA251 MultiRP</i>	5' – GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC – 3'

Quantification de produits de PCR purifiés par migration sur gel d'agarose

❖ Préparation du gel d'agarose

- ✓ Peser 1,7 g d'agarose dans un flacon en verre ;
- ✓ Ajouter 100 ml de TAE 0,5x (950ml d'eau distillée + 50 ml de TAE 10x) ;
- ✓ Agiter pour homogénéiser ;
- ✓ Faire chauffer, sans bouillir en utilisant le micro-onde pour dissoudre complètement et obtenir une solution limpide ;
- ✓ Ajouter 10 µl de SYBR Safe dans le gel (à 40°C de température)
- ✓ Couler le gel dans une cuve placée dans son support (y joindre le peigne) ;
- ✓ Mettre le gel à l'obscurité pour qu'il durcisse ;
- ✓ Remplir le bac à électrophorèse avec du TAE 0,5x ;
- ✓ Placer le gel avec le support ;le gel doit être bien recouvert avec la solution TAE 0,5x pour que l'électricité puisse passer ;
- ✓ Déposer 5 µl PM (PM = *DNA Ladder, Low range*), 1 µl de bleu de bromophénol et 5 µl d'ADN purifié.
- ✓ Migration : 120 volts pendant 1h 30 min ; l'électrophorèse se fait à l'abri de la lumière ;
- ✓ Ensuite, le gel a été coloré pendant 40 minutes dans un bain de BET, marqueur intercalant de l'ADN (40 ml de BET à 10mg/ml dans 400 ml d'eau ultra pure), sous agitation.

- ✓ L'observation et la prise de photos du gel, ont été réalisées sous UV à l'aide de l'appareil Gel Doc et du logiciel Quantity one (Bio-Rad) puis l'enregistrement se fait dans une carte mémoire (Figure 12)
- ✓ Placer la carte mémoire dans un ordinateur et l'analyser avec le programme *Nikon*

Exemple de souches testées

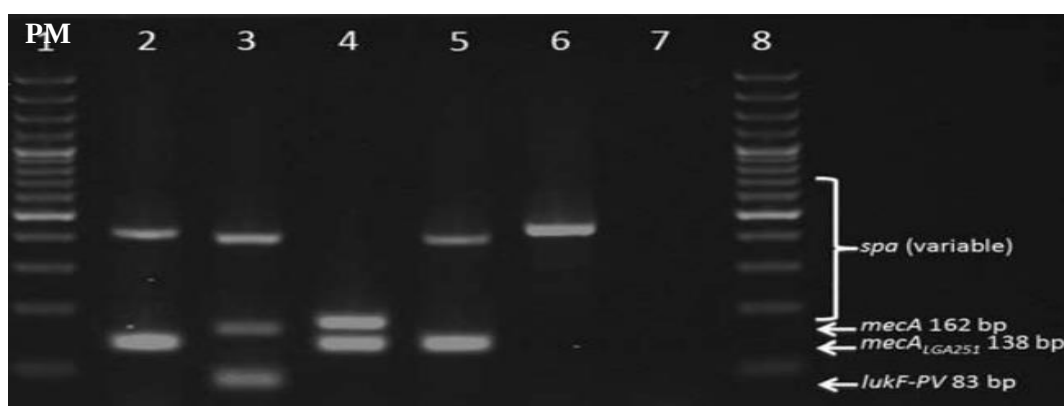


Figure 12 : Migration sur gel agarose pour la detection des genes *mecA*, *mecC* (*mecALGA251*), *lukF-PV* (PVL) and *spa*

13.2.2. Pour les souches *S. coagulase négative*

Après spectrométrie de masse MALDI TOF, trois de nos souches ont été confirmées *Staphylococcus non aureus* (SCN). Au vu de leurs profils phénotypiques de résistance aux antibiotiques, l'équipe du laboratoire de l'ANSES a choisi de réaliser une PCR en temps réel selon le protocole proposé par Zhang en 2004, en utilisant deux amorces et un oligonucléotide pour optimiser les conditions d'amplification et obtenir des produits spécifiques de taille distincte, afin d'aboutir à une bonne interprétation des résultats. Trois souches, isolées en 2014, dont deux isolées à partir des bovins de la wilaya de Tizi-Ouzou et Boumerdès et une du poulet de chair à partir de la wilaya de Bouira. Toutes les trois ont été alors analysées ainsi que les souches de référence.

L'intérêt d'utiliser cette réaction est de pouvoir distinguer les *Staphylococcus aureus* des moins virulents mais cliniquement important *Staphylococcus coagulase-négative* (CoNS), simultanément avec la détection de la résistance à la méthicilline.

❖ Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait directement à partir de cultures jeunes de 18 à 24h sur gélose à 5% de sang de mouton. Une à cinq colonies de chaque souche a été mise en suspension dans 50 µl du tampon de lyse. Quatre colonies uniques de chaque souche ont été ajoutées dans des tubes *Eppendorf* contenant 150 µl du tampon de lyse et des billes de verre. Les suspensions ont été agitées vigoureusement au vortex pendant 10 min, puis centrifugées à 13 000 rpm pendant 20sec. Ensuite, 400 µl d'eau de qualité biologie moléculaire (eau BM) [RNase / DNase free water (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)] a été ajouté à chaque tube. Après une deuxième centrifugation, le surnageant contenant l'ADN bactérien a été transféré dans des nouveaux tubes bien annotés et conservés à -80°C, prêts à être utilisés pour les différentes PCR.

Une dilution au 1/10^{ème} du surnageant contenant l'ADN bactérien a été réalisée puis le tout est transféré dans des nouveaux tubes bien annotés et prêts à l'utilisation.

Principe

Pour l'amplification du produit, dans le cas de la PCR en temps réel, on ajoute un oligonucléotide en même temps que les deux amorces (une amorce sens qui se fixe sur le brin négatif et une amorce anti-sens qui se fixe sur le brin positif). Cet oligonucléotide est complémentaire d'une séquence interne du fragment d'ADN à amplifier située entre les deux amorces (appariement de l'oligonucléotide et des deux amorces au cours de l'étape d'hybridation). À son extrémité 5' se trouve un fluorochrome (*reporter*) et à son extrémité 3' se trouve un groupement *quencher*.

Lorsque le fluorochrome et le *quencher* sont proches, la fluorescence est absorbée par le *quencher*.

Durant l'étape d'élongation de la PCR, il y aura séparation du fluorochrome de la sonde suite à l'activité 5'-3' exonucléase de la polymérase thermostable. Il y aura alors émission de la fluorescence car le fluorochrome s'éloignera du groupement *quencher*. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié au cours de la réaction de PCR. On peut suivre ainsi l'amplification de la séquence cible après chaque cycle, d'où le terme de "PCR en temps réel".

❖ Produits de biologie moléculaire

- ✓ 3 couples d'Amorces nucléotidiques
- ✓ 3 sondes d'hybridation
- ✓ RNase / DNase free water (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)

✓ PCR Master Mix prêts à l'emploi [(Taq polymerase, dNTPs, MgCl₂, *reaction buffers*) (Promega)].

❖ Souches de contrôle

- ✓ SARM ATCC 43300 : contrôle positif pour les gènes *mecA*, *rrs* et *femA*.
- ✓ SASM ATCC 25923 : contrôle négatif pour le gène *mecA*, *rrs* mais positif pour *fem*.
- ✓ Témoin eau : contrôle négatif pour tous les gènes.

❖ Mode opératoire

- ✓ Sortir les ADN extraits préalablement dilués du congélateur pour leur donner le temps de décongeler ;
- ✓ Préparer le plan de plaque et configurer le programme de PCR [ABI Prism 7000 SDS software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France)] pour faire une triplex RT-PCR pour les gènes (*mecA*, *rrs*, *femA*), indiquer l'emplacement des puits utilisés sur la plaque puis leur nom (ou numéro). Régler le volume choisi à 25µL ;
- ✓ Programmer le cycle de température tel qu'il est indiqué par le tableau N°7

Tableau 7 : Protocole d'amplification d'une triplex RT-PCR (Ruimy *et al.*, 2008)

Température	Durée	Phase	Nombre de cycles
50°C	2 min	-	Un cycle
95°C	10 min	Dénaturation	Un cycle
95°C	15 s	Dénaturation	40 cycles
60°C	60 s	Hybridation	/
60 à > 95°C	-	Dissociation (courbe)	Un cycle

Étape 1 : 2 minutes à 50°C en présence de l'UDG ('uracile DNA glycosylase) d' *E. coli* pour empêcher l'amplification des produits PCR contaminants. L'UDG sera inactivée lors de l'étape de dénaturation à 95°C.

Pour empêcher l'amplification des produits PCR contaminants. L'UDG sera inactivée lors de l'étape de dénaturation à 95°C.

Étape 2: 10 minutes à 95°C pour détacher l'anticorps de l'enzyme, ce qui permet l'activation enzymatique.

Étape 3: 15 secondes à 95°C qui correspond à l'étape de dénaturation de l'ADN.

Étape 4: 1 minute à 60°C qui correspond à l'étape d'hybridation des amorces et de la sonde à l'ADN.

Étape 5 : La courbe de dissociation permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié.

❖ **Préparation du mix PCR**

Composition du Mix	Quantité en μl
Amorces + sondes	(1 μ l de chaque amorce/sonde de 0.2 μ M de concentration)
PCR Master Mix	2,5 μ l
H ₂ O qsp 23	11.5 μ l

❖ **Réalisation de la PCR**

- ✓ Déposer 23 μ L du mix PCR dans chacun des puits (plaque 96 puits) utilisés ;
- ✓ Déposer 2 μ L d'ADN de chaque échantillon dans les puits selon le plan de plaque ;
- ✓ Recouvrir la plaque d'un film optique (Applied biosystems) ;
- ✓ Mettre la plaque dans l'ABI Prism 7000 SDS
- ✓ Rouvrir le programme préalablement sauvegardé et lancer la PCR ;

Durée de la PCR : environ 90min.

❖ **Mesure de la fluorescence**

Pour éviter les variations de volume dans les puits, on mesure le rapport FAM/ROX.

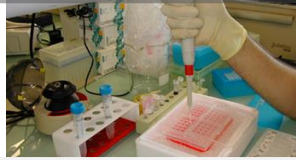
- ✓ **FAM** : fixé en 5' de la sonde, a son pic d'absorption vers 530 nm (courbe bleue),
- ✓ **ROX** : présent dans le Taqman Buffer, a son pic d'absorption vers 600 nm (courbe rouge).

96 fibres optiques situées sous chaque puits, nous ont permis de mesurer la fluorescence. La lumière passe devant une caméra qui reçoit la somme de la fluorescence émise par les différents fluorochromes. Suivant la longueur d'onde d'absorption, on identifie le fluorochrome. Comme on le voit sur ce graphique, l'intensité de fluorescence du FAM augmente au cours des cycles.

❖ **Résultats**

Le graphique que l'on obtient lorsque la réaction de PCR est terminée est celui d'un graphique qui représente en abscisse le nombre de cycle et en ordonnée la quantité d'ADN amplifié. Celui-ci sera par la suite linéarisé par transformation logarithmique. Toutes ces étapes sont résumées au niveau de la Figure 13.

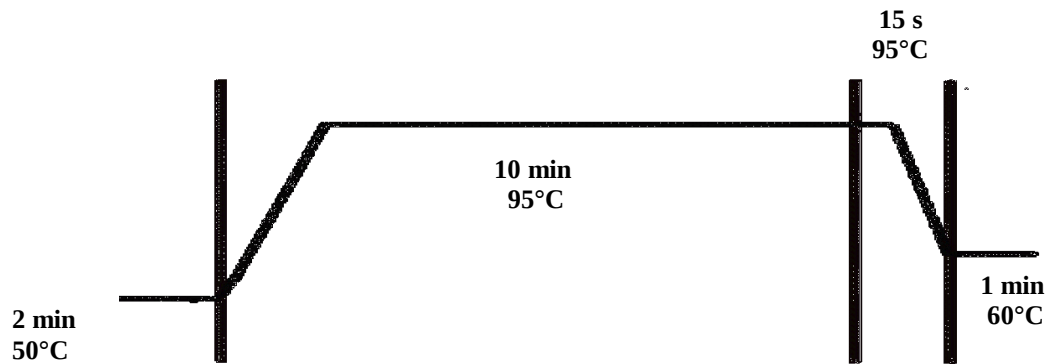
Préparation du produit à amplifier dans une plaque à 96 puits



Mise en place de la plaque dans le Taqman



Courbe résumant le protocole d'amplification d'une triplex RT-PCR



Graphique des produits d'une réaction de PCR : linéarisation par transformation logarithmique

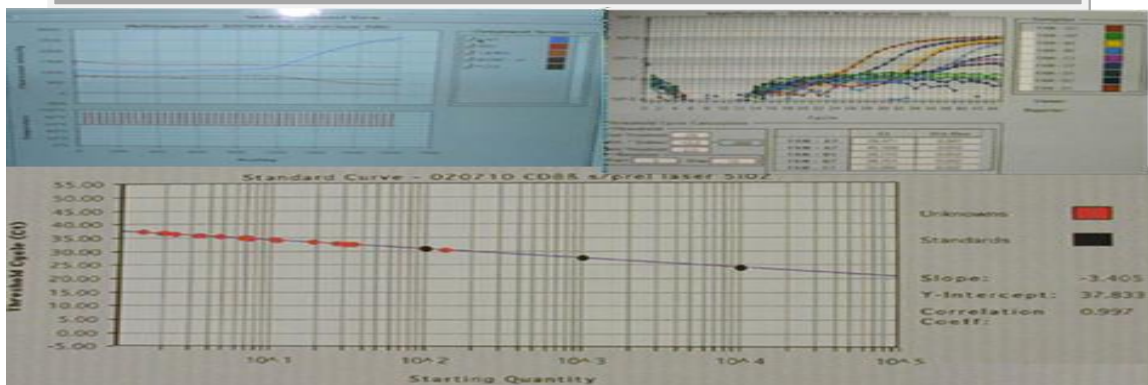


Figure 13 : Protocole d'amplification d'une triplex RT-PCR

14. Exploitation des résultats

Les exploitations de tous les résultats des antibiogrammes qu'ils soient effectués lors des contrôles de qualité ou de l'analyse des écouvillons ont été saisis et analysés grâce à l'utilisation du logiciel WHONET version 5.6 puis transféré vers l'Excel pour la confection des graphiques.

WHONET est un logiciel de base de données Windows développé pour la gestion et l'analyse de données de laboratoire de microbiologie avec un accent particulier sur l'analyse des résultats des tests de sensibilité aux antimicrobiens. Ce logiciel a été développé depuis 1989 par le Centre collaborateur de l'OMS pour la surveillance de la résistance aux antimicrobiens basé au *Brigham and Women's Hospital* de Boston et est utilisé par des laboratoires cliniques, de santé publique, vétérinaires et alimentaires dans plus de 90 pays dont l'Algérie pour soutenir le Programme de Surveillance de la résistance aux antimicrobiens lancé par l'OMS.

RESULTATS

1. Répartition des *Staphylococcus* spp. par espèce animale

Au total, 32.000 échantillons en provenance des quatre wilayas du centre du pays ont été analysés pour la détection du portage du *Staphylococcus* spp. durant la période allant de 2009 à 2014. Il s'agit d'écouvillonnages nasaux d'animaux sains ne présentant aucun symptôme de maladie, choisis de manière aléatoire dans des exploitations appartenant au secteur privé pour les bovins et la dinde, et les exploitations des offices étatiques pour les autres gallinacés étudiés avec les différents types de production. 8000 prélèvements ont été effectués par espèce et par type de production.

Le tableau N° 8 et la figure N°14 résument la répartition de l'ensemble des écouvillons analysés et les totaux des cultures positives et négatives par espèce animale.

Tableau 8 : Répartition des cultures positives et négatives par espèce animale

Espèce animale	Bovins	Poules pondeuses	Poulets de chair	Dindes de chair	Total
Total des prélèvements analysés	8000	8000	8000	8000	32000
Total des cultures positives (Présence de <i>Staphylococcus</i> spp.)	465 (5,82%)	1875 (23,43%)	6500 (81,25%)	307 (3,84%)	9147 (28,60%)
Total des cultures négatives (Absence de <i>Staphylococcus</i> spp.)	7535 (94,18%)	6125 (76,57%)	1500 (18,75%)	7693 (96,16%)	22853 (71,40%)

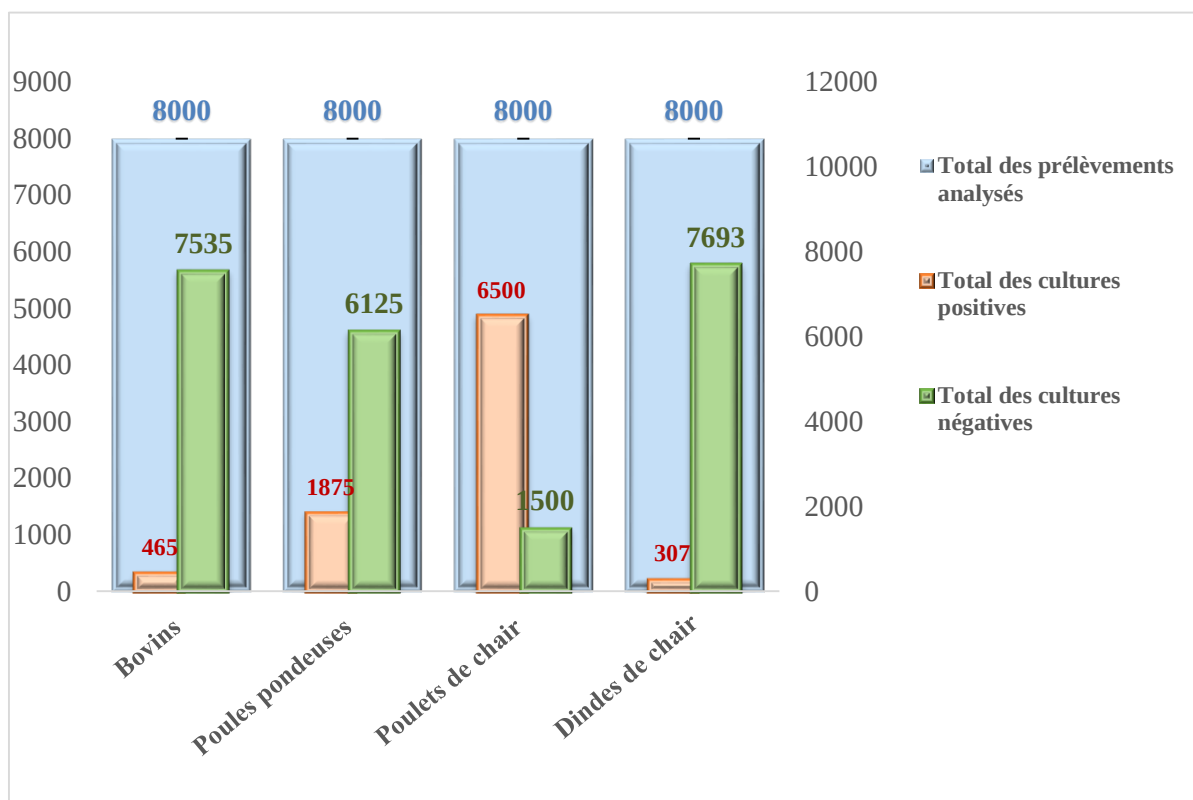


Figure 14 : Total des cultures positives et négatives sur l'ensemble des prélèvements analysés par espèce animale.

Sur un total de 32000 échantillons analysés, 22853 soit 71,40% ne contenaient pas de staphylocoques considérés comme négatifs. Les 9147 soit 28,60% des échantillons restants sont considérés comme positifs par la présence du *Staphylococcus spp.* Leur répartition par espèce étudiée est comme suit :

Chez les bovins, sur 8000 échantillons analysés, 465 soit 6% étaient positifs à staphylocoques. Le reste des échantillons, soit 7535 (94%) des cultures étaient négatives, ne présentaient pas de staphylocoques. Parmi les 465 échantillons positifs, 207 soit 45% d'entre eux ne possédaient pas de coagulase, et 258 soit 55% possédaient une coagulase et une DNase; ce qui nous a permis de les assigner à l'espèce *Staphylococcus aureus* (Figure14 et tableau 8).

❖ Concernant les gallinacés, par type de production

Chez le poulet de chair : Sur un total de 8000 échantillons analysés, 6500 étaient des cultures positives à staphylocoques, représentant 81% des prélèvements, dont 5711 soit 88% étaient des *Staphylococcus* à coagulase négative, et 789 soit 12% étaient des staphylococcus à coagulase positive. 1500 soit 19% des échantillons ne présentaient pas de staphylocoques.

➤ **Chez les poules pondeuses** : Sur un total de 8000 échantillons analysés 1875 étaient des cultures positives à staphylocoques représentant 23% des prélèvements, dont 1089 soit 58% étaient des *Staphylococcus* à coagulase négative et 786 soit 42% étaient des *Staphylococcus* à coagulase et DNase positives. 6125, soit 77% des échantillons ne présentaient aucun staphylocoque.

➤ **Chez la dinde** : Sur un total de 8000 échantillons analysés, 307 étaient des cultures positives à staphylocoques représentant seulement 4% des prélèvements, dont 174 soit 57 % étaient des *Staphylococcus* à coagulase négative et 133 soit 43% étaient des staphylococcus à coagulase positive. 7693 soit 96% des échantillons ne présentaient aucun staphylocoque (Figure 14 et tableau 8).

2. Répartition des *Staphylococcus aureus* par espèces animales

Le tableau N°9 et la figure N°15 précisent le nombre des *Staphylococcus aureus* confirmés par rapport aux cultures positives sur le total des échantillons analysés par espèces animale.

Tableau 9 : Répartition des *S. aureus* par espèce animale

Espèce animale	Bovins	Poules pondeuses	Poulets de chair	Dindes de chair
Total des cultures positives (Présence de staphylocoques)	465 (6%)	1875 (23%)	6500 (81%)	307 (4%)
Nombre de souches de <i>S.aureus</i>	258 (55%)	786 (42%)	789 (12%)	133 (43%)
Nombre de SCN	207 (45%)	1089 (58%)	5711 (88%)	174 (57%)

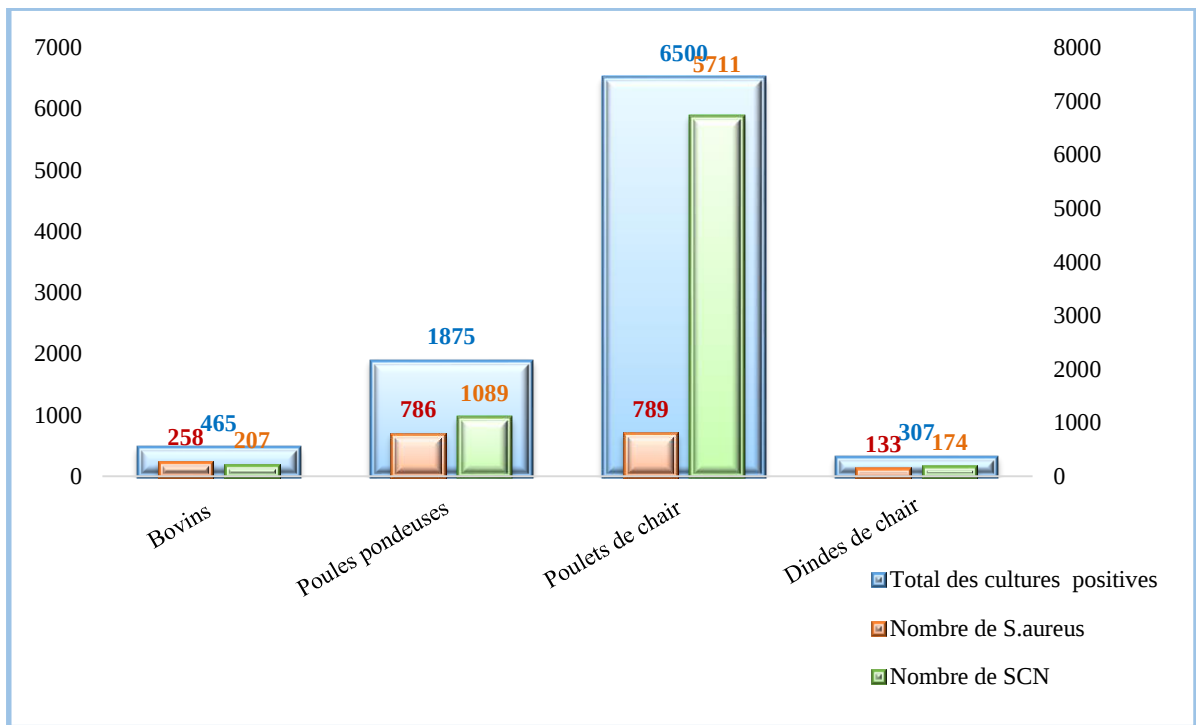


Figure 15 : Répartition des *Staphylococcus aureus* par espèces animale

Les résultats montrent que le nombre de cultures positives le plus important est enregistré chez le poulet de chair (6500), puis chez les poules pondeuses (1875), puis les bovins (465) et enfin chez les dindes de chair (307).

Les prélèvements positifs à *Staphylococcus aureus* sont principalement ceux effectués à partir des poulets de chair (789/12%), suivi des poules pondeuses avec (786 / 42%), puis ceux des bovins (258 / 23 %), et enfin chez la dinde (133 / 43%).

Concernant les staphylococcus à coagulase négative ; le nombre le plus élevé est enregistré chez le poulet de chair (5711) suivi de pour les poules pondeuses (1089) puis les bovins (207) et enfin chez la dinde (174).

La répartition de l'ensemble des prélèvements analysés par espèce animale étudiée et les résultats des cultures obtenues sont résumés par la figure N°16.

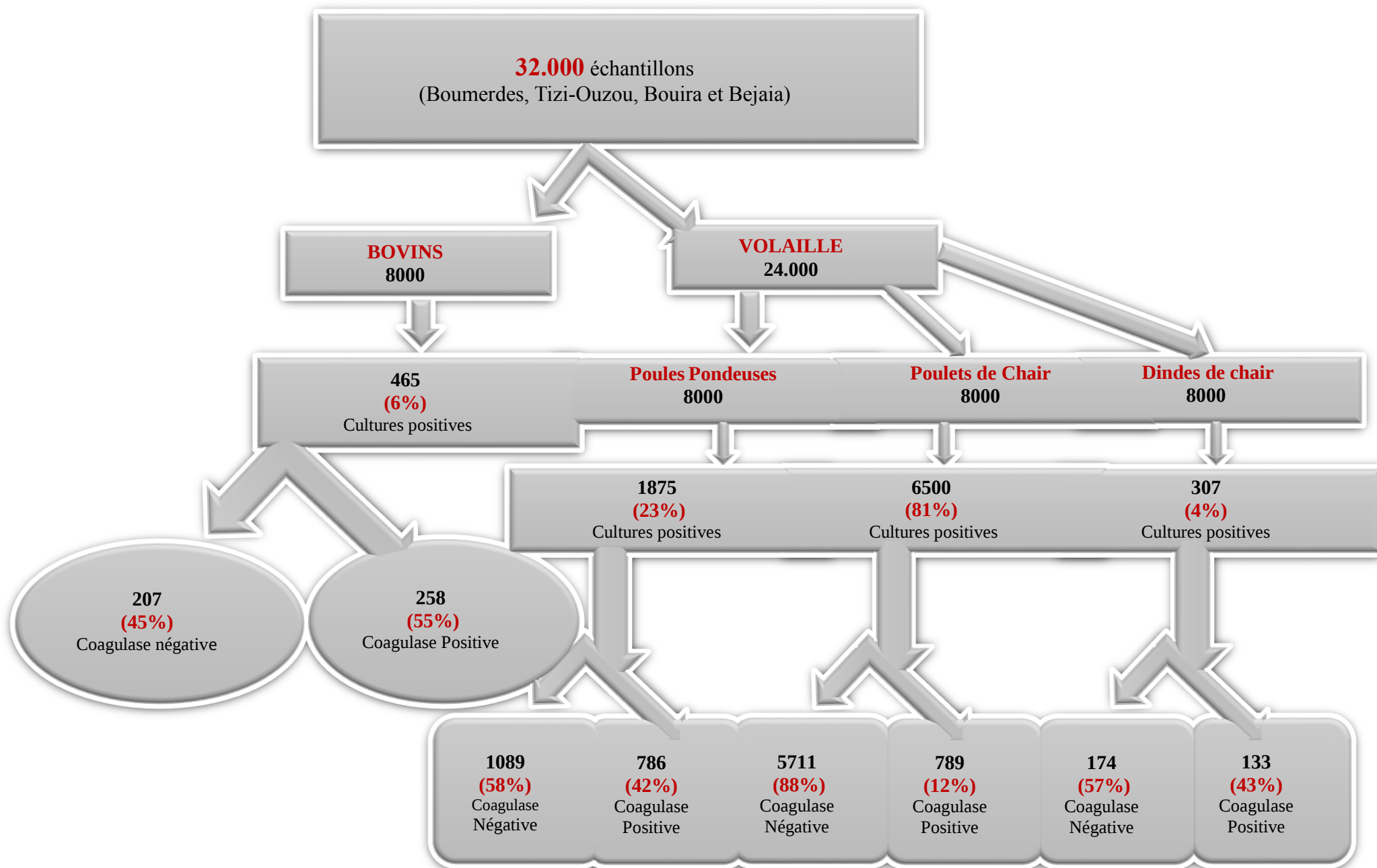


Figure 16 : Figure récapitulative de l'ensemble des prélèvements analysés

3. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Le tableau 10 résume les résultats de l'étude de la sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* isolées par espèce animale aux 14 antibiotiques testés appartenant à 8 familles différentes.

Pour l'ensemble des espèces, nous avons remarqué que les plus forts pourcentages de résistance étaient enregistrés :

- ✓ Pour la famille des β -Lactamines par rapport à la pénicilline, le taux le plus important était enregistré chez les poulets de chair avec 92%, suivi des poules pondeuses avec 79%, puis des bovins avec 72%, alors que chez la dinde, il n'était que de 41%.
- ✓ Pour la famille des lincosamides : de la même façon que la pénicilline, le plus fort taux a été enregistré chez le poulet de chair avec 72 %, suivi de la poule pondeuse avec 70 %, la dinde avec 69 %, puis les bovins avec 67%.

Concernant les résultats de résistance aux antibiotiques par espèce animale :

- ✓ Chez les bovins : Le plus fort taux de résistance était enregistré pour les quinolones avec 87% pour l'enrofloxacin, puis les β -Lactamines avec la pénicilline 72%, puis les lincosamines avec la clindamycine 67%.
- ✓ Chez les poules pondeuses : Les plus forts taux de résistances ont été enregistrés pour les β -Lactamines avec 79% pour la pénicilline, suivi des lincosamines avec la clindamycine 70%.
- ✓ Chez les poulets de chair : chez ce type de production, nous avons enregistré des taux relativement importants de résistance à plusieurs antibiotiques, appartenant à différentes familles, dont les β -Lactamines avec 92% pour la pénicilline, suivi des tétracyclines avec 74% pour la clindamycine 72% puis les aminoglycosides avec 66%.
- ✓ La dinde de chair quant à elle présentait des taux de résistance à beaucoup plus de familles d'antibiotiques, parmi lesquels les macrolides avec 93%, les quinolones avec 89%, les tétracyclines avec 86%, les aminoglycosides avec 74% et les β -Lactamines avec la pénicilline 41%.

Aucune résistance n'a été remarquée pour les glycopeptides dont la vancomycine, chez toutes les souches isolées à partir de toutes les espèces.

Tableau 10 : Résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des isolats de *S aureus* isolées chez les différentes espèces animales étudiées

Espèce animale			Bovins				Poules pondeuses				Poulets de chair				Dindes de chair			
			Résistance		Sensible		Résistance		Sensible		Résistance		Sensible		Résistance		Sensible	
ATB	Charges/ disques	Valeurs critiques	R/T	%	S/T	%	R/ T	%	S/T	%	R /T	%	S /Tl	%	R /T	%	R /T	%
OXA	1 µg	10 - 13	80/258	31	178/258	69	448/786	57	338/786	43	416/789	53	373/789	47	0/133	0	133/133	100
PEN	10UI	28 - 29	187/258	72	71/258	28	612/777	79	165/777	21	719/780	92	668/780	8	55/133	41	78/133	59
FOX	30 µg	15 - 17	80/258	31	178/258	69	448/780	57	332/780	43	417/783	53	366/783	47	0/133	0	133/133	100
AMC	20/10 µg	19- 20	0/258	0	258/258	100	0/751	0	751/751	100	0/774	0	774/774	100	0/133	0	133/133	100
PNO	10UI/30 µg	14 -18	0/258	0	258/258	100	0/751	0	751/751	100	0/780	0	780/780	100	1/133	1	132/133	99
NEO	30 µg	13 - 18	27/258	11	231/258	89	81/774	10	693/774	90	76/777	10	701/777	90	98/133	74	35/133	26
KAN	30 µg	13 - 18	27/219	12	192/219	88	0/3	0	3/3	100	4/ 6	66	2/ 6	33	35/133	26	98/133	74
GEN	10 µg	12 - 15	0/249	0	249/249	100	41 /771	3	730/771	97	24/774	3	750/774	97	0/133	0	133/133	100
SXT	1,25/23,75µg	10 - 16	0/252	0	252/252	100	167/777	21	610/777	79	218/780	28	562/780	72	39/133	29	94/133	71
TCY	30 µg	14 - 19	66/255	26	189/255	74	348/783	44	435/783	56	581/786	74	205/786	26	114/133	86	19/133	14
ENR	5 µg	16 - 23	225/258	87	33/258	13	167/783	21	616/783	79	356/786	45	430/786	55	118/133	89	15/133	11
ERY	15 µg	13 - 23	126/249	51	123/249	49	426/786	54	360/786	45	357/789	45	360/789	55	122/133	93	9/133	7
CMN	2 µg	14 - 21	167/249	67	82/249	33	550/786	70	236/786	30	568/789	72	221/789	28	92/133	69	41/133	31
VAN	30 µg	≥15	0/249	0	249/249	100	0/774	0	774/774	100	0/777	0	777/777	100	0/133	0	133/133	100

% : Pourcentage, R : Résistant, S : Sensible, T : Total ,Oxacilline (OXA : 1µg),Pénicilline G (PEN :10UI), Céfoxitine (FOX :30µg), Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg), Triméthoprine/Sulfaméthoxazole(SXT:1,25/23,75 µg), Tétracycline (TCY:30 µg),Enrofloxacin (ENR :5 µg), Vancomycine(VAN :30 µg), Amoxicilline +acide clavulanique(AMC : 20/10 µg), Pénicilline + Novobiocine (PNO : 10UI/30 µg), Clindamycine (CMN :2 µg)

3.1. Étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *S aureus* par espèce animale

Sur le total des prélèvements testés, il a été isolé successivement 258, 786 ,789 et 133 souches de *S. aureus* à coagulase positive non redondantes chez les ovins, les poules pondeuses, le poulet de chair et la dinde chair. Le test à la céfoxitine et l'utilisation du screening test à l'oxacilline, nous ont permis d'enregistrer les résultats développés ci-dessous par espèce animale étudiée.

3.1.1. Chez les bovins

La figure N°17 illustre la fréquence de la résistance à chaque antibiotique testé des souches de *S. aureus* isolées à partir des bovins.

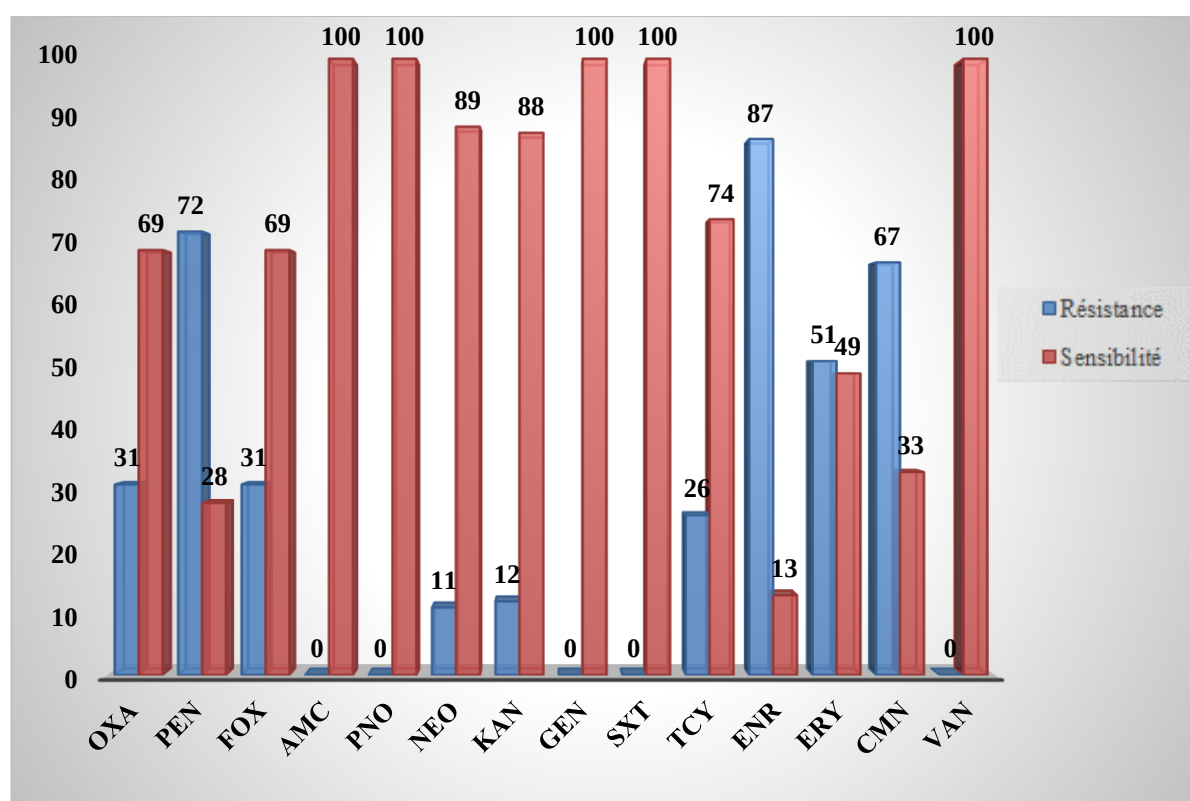


Figure 17: Sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. aureus* d'origine bovine

% : Pourcentage, R/T : Résistant /T : Total, S /T: Sensible T : Total, Oxacilline (OXA : 1µg),PénicillineG(PEN :10UI),Céfoxitine (FOX :30µg),Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg), Triméthoprine/Sulfamethoxazole(SXT:1,25/23,75 µg),Tétracycline (TCY:30 µg), Enrofloxacin (ENR :5 µg), Vancomycine(VAN :30 µg), Amoxicilline+acide clavulanique(AMC : 20/10 µg), Pénicilline + Novobiocine (PNO : 10UI/30 µg), Clindamycine (CLI :2 µg)

Les résultats obtenus montrent une résistance alarmante aux quinolones avec 87% et aux Bêtalactamines dont la pénicilline avec 72%. Les résistances enregistrées pour les macrolides et les lincosamines sont respectivement de 51 et 67 %. 100% des souches isolées étaient

sensibles aux associations pénicilline/novobiocine, amoxicilline/acide clavulanique et à la vancomycine.

3.1.2. Chez les poules pondeuses

La figure N°18 ci-dessous rapporte les résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées à partir des poules pondeuses.

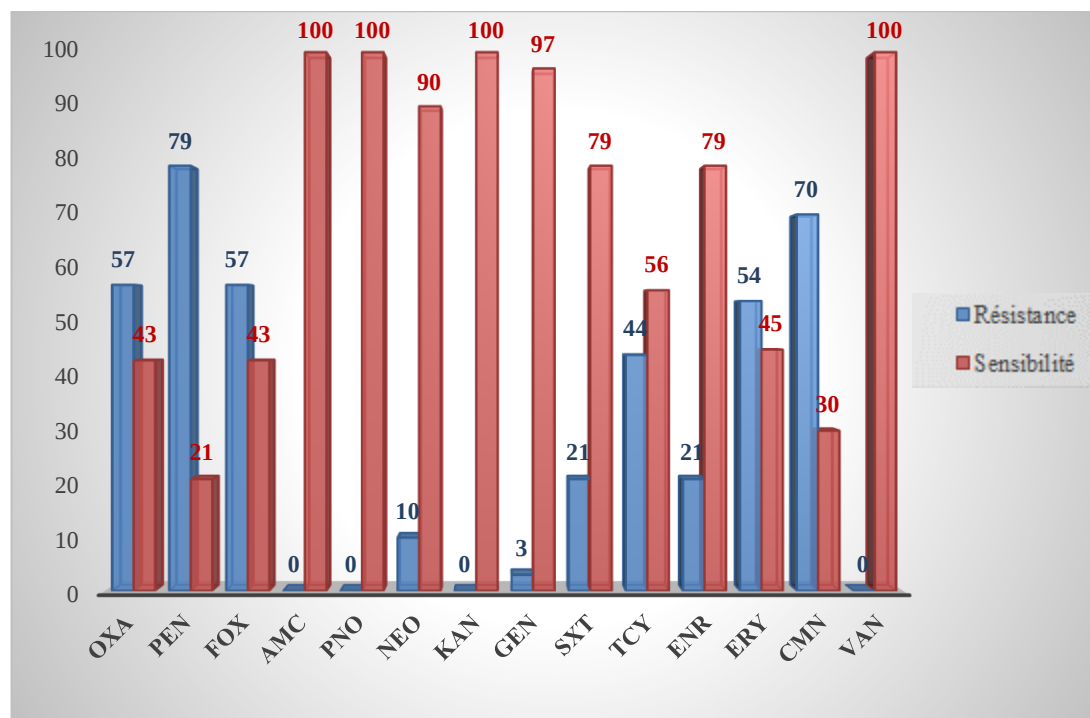


Figure 18 : Sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées chez les poules pondeuses

% : Pourcentage, R/T : Résistant /T : Total, S /T : Sensible T : Total, Oxacilline (OXA : 1µg),Pénicilline(PEN :10UI),Céfoxitine (FOX :30µg),Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg), Triméthoprine/Sulfamethoxazole (SXT :1,25/23,75 µg),Tétracycline (TCY :30 µg), Enrofloxacin (ENR :5 µg), Vancomycine (VAN :30 µg), Amoxicilline+acide clavulanique (AMC : 20/10 µg), Pénicilline + Novobiocine (PNO : 10UI/30 µg), Clindamycine (CLI :2 µg)

Les *S. aureus* isolés à partir de ce type de production présentent des taux de résistance variables en fonction des familles d'antibiotiques. La résistance notée pour les aminoglycosides était de 0%, 3% et 10 % respectivement pour la kanamycine, gentamycine et néomycine. Pour les β-Lactamines, les taux de résistance enregistrés variaient entre 57 à 79%. Ces taux étaient de 57% pour l'oxacilline et la céfoxitine et de 79% pour la pénicilline. La clindamycine présentait une résistance de 70%, quant à l'érythromycine, elle était de 57%.

Les quinolones dont l'enrofloxaciné présentaient une résistance de 21%. Pour ce type de production également, aucune résistance à la vancomycine n'a été enregistrée.

3.1.3. Chez les poulets de chair

La figure N°19 ci-dessous rapporte les résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées à partir des poulets de chair

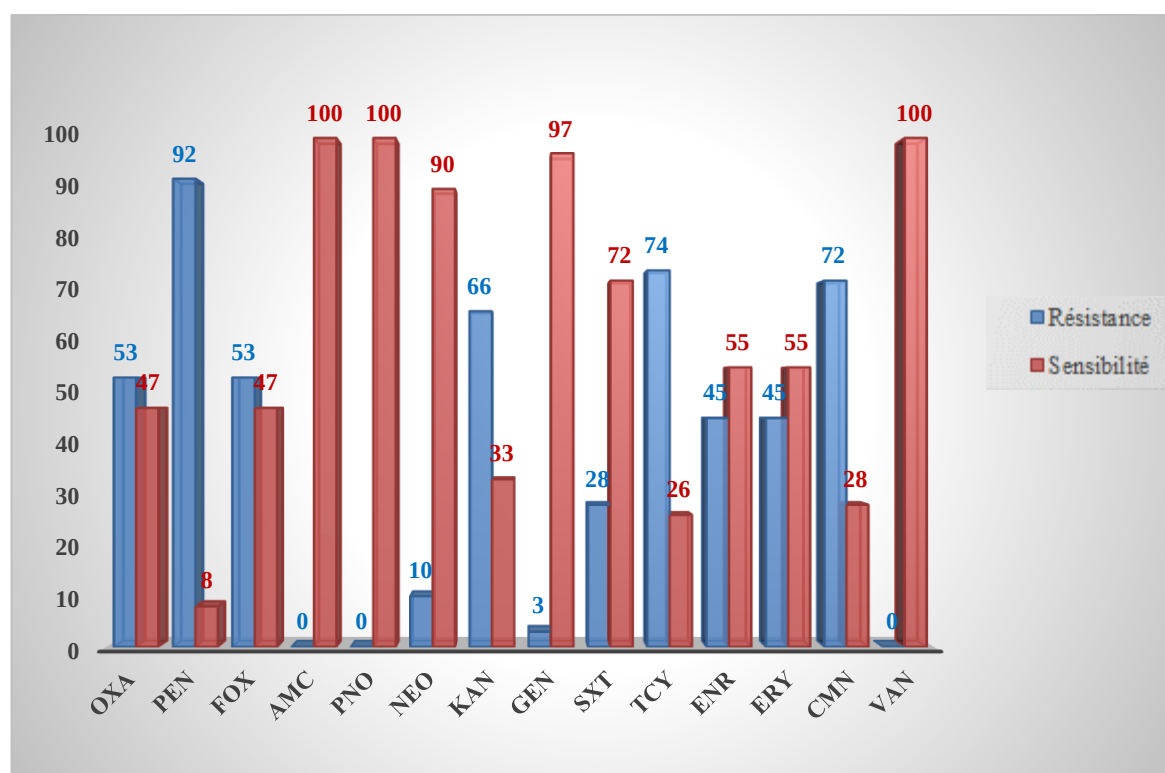


Figure 19 : Sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées chez les poulets de chair

% : Pourcentage, R/T : Résistant /T : Total, S /T: Sensible T : Total ,Oxacilline (OXA : 1µg),PénicillineG(PEN :10UI),Céfoxitine (FOX :30µg),Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg), Triméthoprim/Sulfaméthoxazole(SXT:1,25/23,75 µg),Tétracycline (TCY:30 µg), Enrofloxaciné (ENR :5 µg), Vancomycine(VAN :30 µg), Amoxicilline+acide clavulanique(AMC : 20/10 µg), Pénicilline + Novobiocine (PNO : 10UI/30 µg), Clindamycine (CLI :2 µg)

Les résultats obtenus font ressortir des taux de résistances élevés, 92% de résistance aux β -lactamines (pénicilline), 74% à la tétracycline, 72% à la clindamycine. Un taux de résistance nul est noté pour la vancomycine.

3.1.4. Chez les dindes de chair

La figure N° 20 ci-dessous rapporte le taux de résistance à chaque antibiotique utilisé des souches de *S. aureus* isolées à partir des dindes de chair.

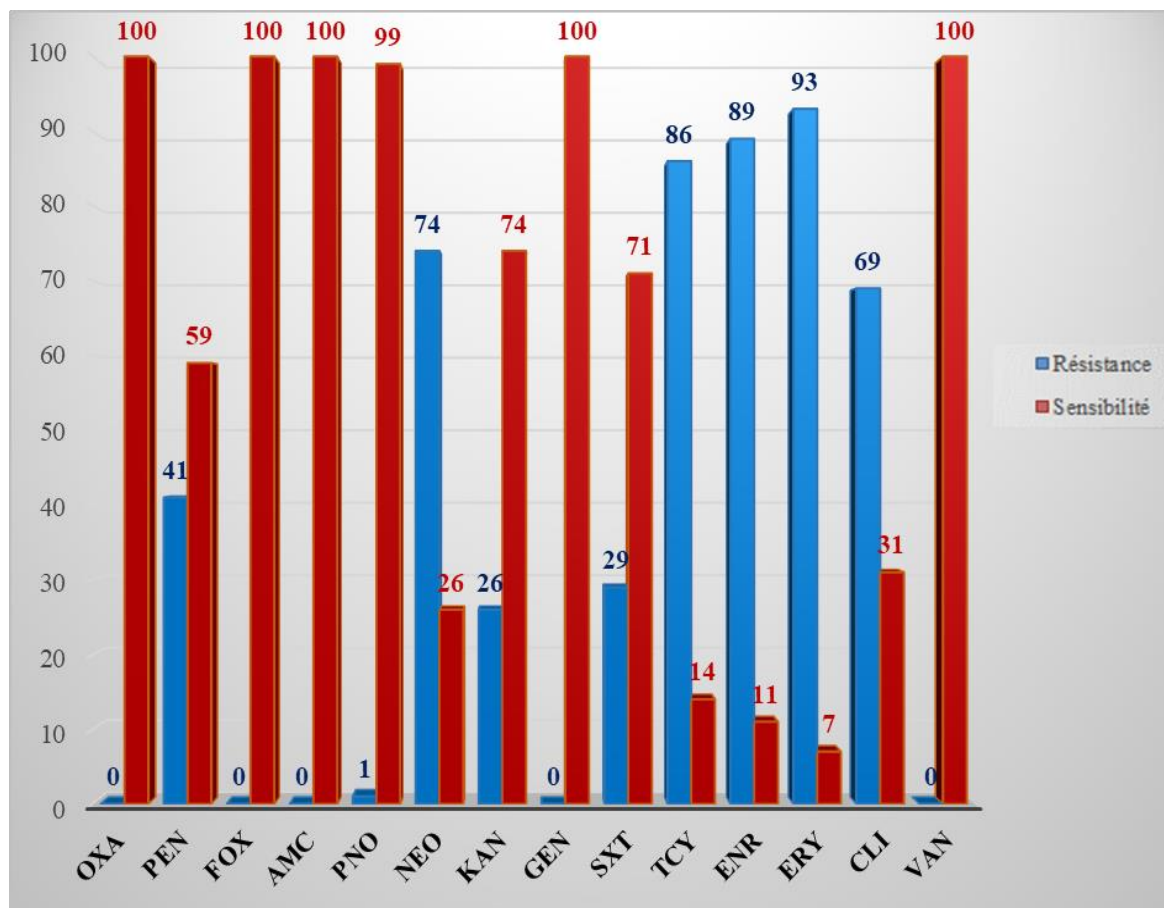


Figure 20 : Sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées chez la dinde de chair

% : Pourcentage, R/T : Résistant /T : Total, S /T: Sensible T : Total ,Oxacilline (OXA : 1µg), PénicillineG(PEN :10UI),Céfoxitine (FOX :30µg), Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg),Triméthopprime/Sulfamethoxazole(SXT:1,25/23,75 µg), Tétracycline (TCY:30 µg), Enrofloxacin (ENR :5 µg),Vancomycine(VAN :30 µg), Amoxicilline+acide clavulanique(AMC : 20/10 µg),Pénicilline + Novobiocine(PNO : 10UI/30 µg), Clindamycine (CLI :2 µg)

Chez cette espèce, nous avons noté des taux de résistance importants pour certaines familles d'antibiotiques, notamment les macrolides avec 93 % pour l'érythromycine, 89% pour les quinolones, 86% pour les tétracyclines et les aminoglycosides avec 74% pour la néomycine.

Pour la clindamycine, la pénicilline et le cotrimoxazole, les résultats étaient respectivement de 69%, 41% et 29%.

4. SARM et SASM : Caractérisation phénotypique

4.1. Répartition des *S. aureus* methicillino résistant par espèce animale

Les résultats obtenus de la répartition des SARM isolés par espèce animale sont reportés dans le tableau N°11 et la Figure N°21.

Tableau 11 : Taux des SARM isolés par espèce animale

Espèce animale	Bovins	Poules pondeuses	Poulets de chair	Dindes de chair
Total des prélèvements analysés	8000	8000	8000	8000
Nombre de <i>S.aureus</i> (%)	258 (55%)	786 (42%)	789 (12%)	133 (43)
Nombre de SARM (%)	80 (31%)	448 (56%)	394 (50%)	0 (0%)

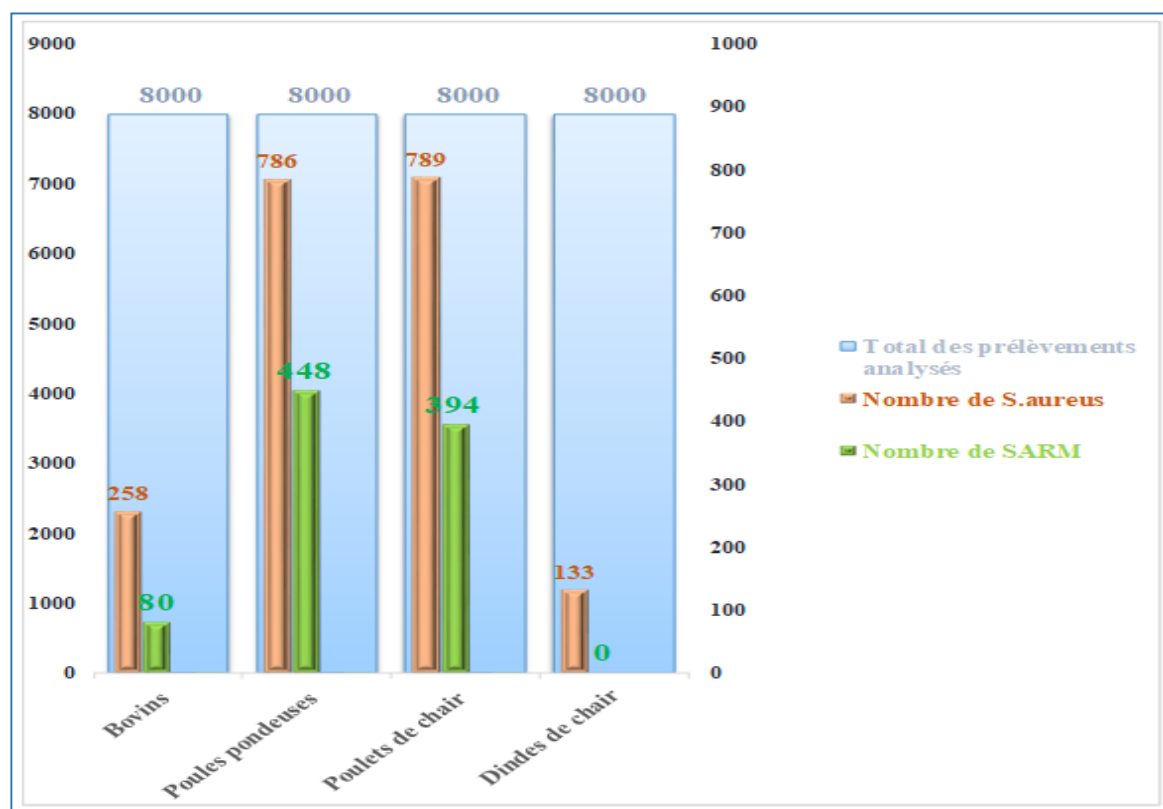


Figure 21 : Distribution des SARM par espèce animale

Les souches de *S. aureus* dont la résistante phénotypiquement à la méthicilline a été confirmée sont représentées par la figure N° 21 avec les taux respectifs suivants :

- ✓ Bovins 31% (80/ 258)

- ✓ Poules pondeuses : 56% (448/786)
- ✓ Poulets de chair : 50% (394/789)
- ✓ Aucune SARM (0/43) n'a été détectée chez les dindes de chair

4.2. Répartition du portage et des résistances aux antibiotiques des SARM et des SASM selon l'espèce animale

4.2.1. Profils de résistance des SARM et des SASM aux antibiotiques chez les bovins

Les profils de résistances obtenus de toutes les souches de *Staphylococcus aureus* isolées chez l'espèce bovine, SASM et SARM sont rapportés dans le tableau N° 12.

Tableau 12 : Profils de résistance des souches de *Staphylococcus aureus* SASM et SARM chez l'espèce bovine

Bovins				
Phénotypes	SASM		SARM	Sensibles
<i>P</i>	38	<i>OXA- PEN - FOX</i>	34	68 souches
<i>PEN -TCY</i>	17	<i>OXA- PEN - FOX-TCY</i>	15	
<i>PEN-ERY</i>	10	<i>OXA- PEN- FOX-ERY</i>	10	
<i>PEN -NEO- KAN-TCY</i>	9	<i>OXA- PEN - FOX -NEO-KAN-TCY</i>	8	
<i>PEN -ENR</i>	9	<i>OXA- PEN- FOX-ENR</i>	6	
<i>PEN -TCY-ERY</i>	7	<i>OXA- PEN- FOX-ERY-ENR</i>	4	
<i>PEN -TCY-ENR</i>	5	<i>OXA- PEN – FOX- NEO -KAN-TCY-ENR</i>	2	
<i>PEN - NEO - KAN</i>	5	<i>OXA- PEN - FOX -ENR-ERY</i>	1	
<i>PEN -ENR-ERY</i>	4			
<i>PEN - NEO - KAN-TCY-ENR</i>	3			
<i>ENR</i>	3			

Oxacilline (OXA : 1µg), Pénicilline (PEN : 10UI), Céfoxitine (FOX :30µg),Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg), Triméthoprim/Sulfaméthoxazole(SXT:1,25/23,75 µg),Tétracycline (TCY:30 µg), Enrofloxacin (ENR : 5 µg), Vancomycine (VAN : 30 µg), Clindamycine (CMN :2 µg),Amoxicilline + acide clavulanique (AMC : 20/10 µg), Pénicilline + Novobiocine (PNO :10UI/30 µg),

Les résultats obtenus montrent une prédominance du nombre de SASM par rapport aux SARM isolés chez Les bovins. Pour les SARM, 34 souches ont présenté le profil de résistance [OXA-

PEN – FOX] et 15 souches le profil [*OXA- PEN - FOX-TCY*]. Huit souches ont présenté une résistance croisée à trois familles d'antibiotiques [*OXA- PEN - FOX NEO-KAN-TCY*].

Pour les souches SASM, malgré la sensibilité à l'oxacilline, notons qu'elles présentent des résistances à d'autres antibiotiques avec des profils différents. Ainsi, 38 souches étaient résistantes à la pénicilline, neuf souches ont présenté le profil [*PEN -NEO- KAN-TCY*] et 3 souches présentaient une résistance croisée à quatre familles d'antibiotiques avec un profil [*PEN - NEO - KAN-TCY-ENR*].

4.2.2. Chez les gallinacées

4.2.2.1. Phénotypes de multi résistance des souches de *Staphylococcus aureus* chez les poules pondeuses

Les résultats des phénotypes de multi résistance des souches de *Staphylococcus aureus* isolées chez les poules pondeuses sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13: Profil de résistance des souches de *Staphylococcus aureus* chez les gallinacés : poules pondeuses

Poules pondeuses				
Phénotypes de résistance	SASM	Phénotypes	SARM	Sensibles
PEN-ERY	133	OXA-PEN - FOX-ERY	148	35
TCY -ENR-ERY	23	OXA- PEN-AMC FOX-TCY	50	
TCY- ENR	14	OXA- PEN - FOX -TCY-ERY	23	
ENR	14	OXA -PEN -FOX-SXT -TCY -ENR-ERY	21	
SXT- TCY -ENR-ERY	13	OXA- PEN- AMC -FOX	17	
PEN -TCY-ERY	12	OXA- PEN - FOX -TCY- ENR	17	
TCY-ERY	10	OXA -PEN - FOX- SXT -TCY- ENR	16	
PEN- AMC -TCY	10	OXA- PEN- AMC -FOX- TCY	15	
PEN- NEO - ENR	10	OXA- PEN-FOX -NEO-SXT- TCY -ENR	14	
PEN - TCY -ENR	8	OXA -PEN - AMC -FOX –NEO- SXT -TCY -ENR	14	
PEN- NEO -ERY	7	OXA- PEN -AMC -FOX -NEO - TCY	11	
PEN -NEO - TCY	7	OXA -PEN-- AMC -FOX - SXT -TCY -ENR	11	
PEN - SXT-ERY	7	OXA- PEN - AMC -FOX-SXT -TCY	11	
PEN – SXT- TCY	7	OXA- PEN- FOX- SXT- TCY	10	
PEN -SXT -TCY	7	OXA -PEN-FOX -NEO-SXT -TCY-ERY	7	
NEO- SXT -TCY-ERY	7	OXA -PEN -FOX- GEN- TCY	7	
SXT -TCY-ERY	5	OXA -PEN- FOX- SXT	7	
TCY- ENR	3	OXA- PEN- AMC -FOX-TCY -ENR-ERY	7	
SXT - ENR-ERY	3	OXA -PEN- AMC –FOX- SXT-ENR	7	
PEN -AMC – NEO- SXT	3	OXA -PEN -AMC -FOX NEO -GEN -SXT -TCY -ENR	7	
PEN -NEO - SXT -TCY	3	OXA -PEN - FOX- NEO - TCY	7	
		OXA -PEN - AMC -FOX -NEO -GEN -SXT -TCY	7	
		OXA -PEN – AMC- FOX - ENR	7	
		OXA -FOX-TCY	7	

Oxacilline (OXA : 1µg),PénicillineG(PEN :10UI),Céfoxitine (FOX :30µg),Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg), Triméthoprim/Sulfamethoxazole (SXT:1,25/23,75 µg),Tétracycline (TCY:30 µg), Enrofloxacin (ENR :5 µg),Vancomycine(VAN :30 µg), Amoxicilline+acide clavulanique(AMC : 20/10 µg), Pénicilline + Novobiocine (PNO : 10UI/30 µg),Clindamycine (CMN :2 µg)

Sur l'ensemble des souches *staphylococcus aureus* isolées chez ce type de production(786), 35 souches seulement étaient sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés.

Pour les souches SARM, les profils de résistance constatés étaient très variables.

7 souches étaient résistantes à 9 antibiotiques appartenant à 5 familles d'antibiotiques différentes [OXA-PEN-AMC -FOX -NEO-GEN-SXT-TCY-ENR] ; 14 souches présentaient le profil suivant [OXA-PEN-AMC -FOX -NEO- SXT-TCY-ENR] ; 15 souches avaient ce profil [OXA- PEN- AMC -FOX- TCY] et 16 souches présentaient ce profil [OXA -PEN - FOX- SXT -TCY- ENR]. 21 souches présentaient des résistances à 7 antibiotiques [OXA -PEN -FOX-SXT -TCY -ENR-ERY] et 50 souches avec une résistance à 5 antibiotiques dont le profil est [OXA- PEN-AMC FOX-TCY]. Enfin, 148 souches étaient résistantes à l'ensemble des antibiotiques.

Bien que toutes les souches SASM étaient sensibles à l'oxacilline, elles présentaient des profils de résistance variés et multiples. Ainsi, 14 souches présentaient une résistance à l'enrofloxacin. 133 souches présentaient une résistance à deux antibiotiques [PEN-ERY], des résistances à quatre antibiotiques ont été respectivement observées chez 13 souches avec le profil [SXT- TCY -ENR-ERY], 7 souches avec le profil [NEO- SXT -TCY-ERY] et 3 souches avec un profil [PEN -AMC – NEO- SXT] et 3 [PEN -NEO - SXT -TCY].

4.2.2.2. Phénotypes de multirésistance des souches de *Staphylococcus aureus* chez les poulets de chair

Le tableau N°14 résume les profils et les fréquences des résistances aux antibiotiques pour les SASM et les SARM chez le poulet de chair.

Tableau 14: Profil de résistance des souches de *Staphylococcus aureus* chez les gallinacés : poulets de chair

Poulet de chair				
Phénotypes	SASM	Phénotypes	SARM	sensible
PEN -ERY	100	OXA-FOX-TCY	72	40
PEN- TCY-ERY	55	OXA-PEN-AMC-FOX	64	
TCY- ENR-ERY	50	OXA-PEN-FOX-TCY	60	
SXT -TCY- ENR	40	OXA-PEN-FOX-SXT	58	
TCY-ERY	30	OXA-PEN-AMC-FOX-TCY	24	
SXT -TCY-ERY	16	OXA-PEN-FOX-SXT-TCY	16	
PEN- NEO -ERY	16	OXA-PEN-AMC-FOX-ENR-ERY	8	
PEN-SXT- TCY- ENR-ERY	16	OXA-PEN-AMC-FOX-SXT-ENR	8	
NEO-SXT- TCY-ERY	14	OXA-PEN-AMC-FOX-NEO-GEN-SXT-TCY	8	
SXT - ENR-ERY	12	OXA-PEN-AMC-FOX-NEO-GEN-SXT-TCY-ENR	8	
PEN- SXT-ERY	8	OXA-PEN-FOX-TCY-ENR-ERY	8	
PEN –SXT- TCY-ERY	8	OXA-PEN-FOX-SXT-ENR-ERY	8	
PEN -NEO -TCY-ERY	8	OXA-PEN-FOX-GEN-TCY-ERY	8	
PEN - ENR-ERY	8	OXA-PEN-FOX-NEO-TCY	8	
ENR-ERY	8	OXA-PEN-FOX-NEO-SXT-TCY-ENR	8	
PEN –NEO- KAN- TCY-ERY	8	OXA-PEN-AMC-FOX-TCY-ENR	6	
PEN- NEO- ENR-ERY	4	OXA-PEN-AMC-FOX-NEO-SXT-TCY-ENR	6	
		OXA-PEN-AMC-FOX-NEO-TCY	6	
		OXA-PEN-FOX-SXT-TCY-ENR	6	
		OXA-PEN-AMC-FOX-SXT-TCY	4	

Oxacilline (OXA : 1µg),PénicillineG(PEN :10UI),Céfoxitine (FOX :30µg),Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg), Triméthoprim/Sulfamethoxazole(SXT:1,25/23,75 µg),Tétracycline (TCY:30 µg), Enrofloxacin (ENR :5 µg), Vancomycine(VAN :30 µg), Amoxicilline+acide clavulanique(AMC : 20/10 µg), Pénicilline + Novobiocine (PNO : 10UI/30 µg),Clindamycine (CMN :2 µg)

Pour ce type de production, sur les 789 souches de *Staphylococcus aureus* isolées, 394 représentaient des SARM confirmés sur la moitié des isolats dont les profils étaient très variables. En effet, 8 souches ont présenté une multirésistance à 9 antibiotiques à la fois soit le profil suivant [OXA-PEN-AMC-FOX-NEO-GEN-SXT-TCY-ENR]. 8 autres souches avec un profil de résistance à 8 antibiotiques [OXA-PEN-AMC-FOX-NEO-GEN-SXT-TCY]. Une résistance simultanée à 6 antibiotiques à la fois étaient observée chez 8 souches dont le profil est [OXA-PEN-FOX-TCY-ENR-ERY], 8 autres souches avec un profil [OXA-PEN-FOX-SXT-ENR-ERY] et 8 autres souches avaient un profil de résistance différent [OXA-PEN-FOX-GEN-TCY-ERY]. 24 souches ont présenté une résistance à 5 antibiotiques soit [OXA-PEN-AMC-FOX-TCY], de la même façon, 16 souches avaient présenté un profil similaire de résistance à 5 antibiotiques soit [OXA-PEN-FOX-SXT-TCY].

L'autre moitié de l'ensemble des souches de *S. aureus* était methicillino-sensible, néanmoins elles présentaient des profils de multirésistance parfois même à cinq antibiotiques. Ainsi, 14 souches présentaient le profil suivant [PEN-SXT-TCY-ENR-ERY] ; 4 souches étaient [PEN-NEO-KAN-TCY-ERY]. D'autres résistances à quatre antibiotiques ont été également signalées, telles que 12 souches ayant le profil [NEO-SXT-TCY-ERY] ; 8 souches [PEN-SXT-TCY-ERY]; 8 souches [PEN-NEO-TCY-ERY] et 4 souches [PEN-NEO-ENR-ERY]. 100 souches avaient une résistance croisée à deux familles d'antibiotiques avec le profil : [PEN-ERY]

4.2.2.3. Phénotypes de multirésistance des souches de *Staphylococcus aureus* chez la dinde de chair

Le tableau N°15 illustre l'absence de SARM au niveau des prélèvements de dindes, mais résume l'ensemble des profils de résistance de l'ensemble des souches de SASM isolées.

Tableau 15 : Profil de résistance des souches de *Staphylococcus aureus* chez la Dinde de chair

Phénotypes	SASM	SARM	sensible
<i>CLI- ERY</i>	25	0	0
<i>ENR-TCY-ERY</i>	25		
<i>NEO-SXT</i>	19		
<i>PEN- KAN -TCY</i>	16		
<i>NEO-ENR</i>	12		
<i>NEO- ENR-TCY-ERY-CLI</i>	10		
<i>PEN-TCY-CLI</i>	10		
<i>PEN- ENR -KAN-TCY</i>	9		
<i>PEN -ENR-ERY</i>	3		
<i>PEN-CLI -TCY-ENR-CLI</i>	2		
<i>PNO-NEO -TCY-CLI</i>	1		
<i>PEN- NOV</i>	1		

Oxacilline (OXA : 1µg),PénicillineG(PEN :10UI),Céfoxitine (FOX :30µg),Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg), Triméthoprim/Sulfaméthoxazole(SXT:1,25/23,75 µg),Tétracycline (TCY:30 µg),Enrofloxacin (ENR :5 µg), Vancomycine(VAN :30 µg), Clindamycine (CMN :2 µg), Amoxicilline+acide clavulanique(AMC : 20/10 µg), Pénicilline + Novobiocine (PNO : 10UI/30 µg).

Aucune souche SARM n'a été enregistrée chez la dinde chair, en effet, sur les 307 échantillons positifs à *Staphylococcus spp.* Seules 133 souches soit 43% étaient confirmées *S.aureus* mais, aucune ne présentait une résistance à la méthicilline. Néanmoins, les profils de multiresistance remarquables étaient tels que plusieurs souches présentaient des résistances à 5 antibiotiques à la fois : 10 souches avaient le profil [*NEO- ENR-TCY-ERY-CLI*] ; 2 souches avec le profil [*PEN-CLI -TCY-ENR-CLI*], d'autres présentaient des résistances à 4 antibiotiques dont 9 souches avec le profil [*PEN- ENR -KAN-TCY*].

5. Caractéristiques moléculaire des souches de *Staphylococcus* sp. isolées chez les différentes espèces animales

Notre choix a porté sur les poulets de chair et les bovins selon le tableau N°16 qui résume la date et l'origine du prélèvement. En effet, ces prélèvements étaient effectués entre 2009 et 2014 dans les quatre wilayas suivantes, de Bejaia, Bouira, Tizi-Ouzou et Boumerdès.

5.1. Confirmation génotypique du genre et de l'espèce

L'utilisation de la technique MaldiTof a permis de confirmer le genre et l'espèce pour toutes les souches sauf pour les trois souches N° 1 ,2 et 3 qui se sont révélées être des staphylococcus non *aureus*. Les résultats de l'étude des caractéristiques aussi bien phénotypiques que génotypiques de ces souches sont rapportés dans le tableau 16, qui présente en plus des résultats de leurs caractérisations phénotypiques et génotypiques, leur répartition par origine géographique, année de prélèvement et par espèce animale.

Tableau 16 : Synthèse des profils génotypiques de l'ensemble des souches testées par PCR multiplexe Selon la technique de Stegger *et al.* (2012)

Identification de la souche	Commémoratifs concernant le prélèvement			Confirmation /Infirmation		Profil de résistance	Présence de genes		Présence de PVL
				Genre	Espèce		MecA	MecC	
	Espèce d'origine	Date du prélèvement	Origine du prélèvement (Wilaya)	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>				
1	Bovine	2014	Boumerdès	+	-	<i>OXA- PEN - FOX NEO-KAN-TCY</i>	+	-	-
2	Bovine	2014	Tizi-Ouzou	+	-	<i>OXA- PEN- FOX-ENR</i>	+	-	-
3	Poulet de chair	2014	Bouira	+	-	<i>OXA- PEN- FOX-ERY-ENR</i>	+	-	-
4	Poulet de chair	2010	Bouira	+	+	<i>OXA-PEN - FOX-ERY</i>	+	-	+
5	Poulet de chair	2011	Bejaia	+	+	<i>OXA- PEN - FOX -ENR-ERY</i>	+	-	+
6	Poulet de chair	2013	Boumerdès	+	+	<i>OXA-PEN-AMC-FOX-TCY-ENR</i>	+	-	+
7	Poulet de chair	2014	Bejaia	+	+	<i>OXA-PEN-FOX-SXT-TCY-ENR</i>	+	-	+
8	Poulet de chair	2010	Boumerdès	+	+	<i>OXA- PEN- FOX-ERY-ENR</i>	+	-	+
9	Poulet de chair	2011	Boumerdès	+	+	<i>OXA-PEN-FOX-NEO-TCY</i>	+	-	+
10	Bovine	2010	Tizi-Ouzou	+	+	<i>OXA- PEN – FOX- NEO -KAN-TCY-ENR</i>	+	-	+
11	Bovine	2012	Tizi-Ouzou	+	+	<i>OXA-PEN-FOX-NEO-SXT-TCY-ENR</i>	+	-	+
12	Bovine	2013	Tizi-Ouzou	+	+	<i>OXA-PEN-AMC-FOX-TCY</i>	+	-	+
13	Bovine	2014	Tizi-Ouzou	+	+	<i>OXA-PEN-AMC-FOX-SXT-TCY</i>	+	-	+

Oxacilline (OXA : 1µg),PénicillineG(PEN :10UI),Céfoxitine (FOX :30µg),Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg), Triméthoprim/Sulfamethoxazole(SXT:1,25/23,75 µg),Tétracycline (TCY:30 µg), Enrofloxacin (ENR :5 µg), Vancomycine(VAN :30 µg), Amoxicilline+acide clavulanique(AMC : 20/10 µg), Pénicilline + Novobiocine (PNO : 10UI/30 µg),Clindamycine (CMN :2 µg) ,Gène mecA, Gène mec C , pvl : Leucocidine Pantón Valentine

Ce tableau résume le profil des souches traitées, en déterminant leur origine, les dates des prélèvements. Toutes les souches étaient des *Staphylococcus aureus* sauf les souches portant l'identification 1 et 2 dont l'origine est bovine respectivement des wilayas de Boumerdès et de Tizi –Ouzou analysées toutes les deux en 2014 et ayant les caractéristiques suivantes :

La souche N°1 est un SARM présentant une résistance à 6 antibiotiques appartenant à trois familles différentes [OXA- PEN - FOX NEO-KAN-TCY]. La souche N° 2 est aussi une SARM présentant une résistance à quatre antibiotiques appartenant à deux familles distinctes [OXA- PEN- FOX-ENR]. La souche N°3 est d'origine aviaire (Poulet de Chair) en provenance de la wilaya de Bouira et a développé une résistance à cinq antibiotiques appartenant à trois familles d'antibiotiques différentes, les bêtalactamines, les quinolones et les macrolides [OXA- PEN- FOX-ERY-ENR]. Toutes les souches possèdent le gène mec A, gène codant pour la résistance notamment à la méticilline ou à l'oxacilline.

Aucune souche ne possédait le gène mec C ni sécrétait la toxine Pantone Valentine. Les caractéristiques des souches d'origine bovine sont regroupées dans le tableau N°17.

5.1.1. Caractéristiques des souches d'origine bovine

Les résultats de la caractérisation génotypique des souches isolées chez les bovins sont rapportés dans le tableau N°17.

Tableau 17 : Synthèse des profils génotypiques des souches testées par PCR multiplexe isolées à partir de l'espèce bovine

Identification de la souche	Commémoratifs concernant le prélèvement			Confirmation/Infirmer		Phénotype de résistance	Présence de gènes		Présence de PVL
				Genre	Espèce				
	Espèce d'origine	Date du prélèvement	Origine du prélèvement (Wilaya)	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>		MecA	MecC	
1	Bovine	2014	Boumerdès	+	-	<i>OXA- PEN - FOX NEO-KAN-TCY</i>	+	-	-
2	Bovine	2014	Tizi-Ouzou	+	-	<i>OXA- PEN- FOX-ENR</i>	+	-	-
10	Bovine	2010	Tizi-Ouzou	+	+	<i>OXA- PEN-FOX- NEO -KAN-TCY-ENR</i>	+	-	+
11	Bovine	2012	Tizi-Ouzou	+	+	<i>OXA-PEN-FOX-NEO-SXT-TCY-ENR</i>	+	-	+
12	Bovine	2013	Tizi-Ouzou	+	+	<i>OXA-PEN-AMC-FOX-TCY</i>	+	-	+
13	Bovine	2014	Tizi-Ouzou	+	+	<i>OXA-PEN-AMC-FOX-SXT-TCY</i>	+	-	+

Oxacilline (OXA : 1µg),PénicillineG(PEN :10UI),Céfoxitine (FOX :30µg),Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg), Triméthoprim/Sulfaméthoxazole(SXT:1,25/23,75 µg),Tétracycline (TCY:30 µg),Enrofloxacin (ENR :5 µg), Vancomycine(VAN :30 µg), Amoxicilline+acide clavulanique(AMC : 20/10 µg), Pénicilline + Novobiocine (PNO : 10UI/30 µg),Clindamycine (CMN :2 µg) ,Gène mecA, Gène mec C , pvl : Leucocidine Pantón Valentine

Les souches d'origine bovine provenaient essentiellement de la wilaya de Tizi-Ouzou. Sur les 6 souches, une seule provenait de la wilaya de Boumerdès, la présence du gène mecA était caractéristique de toutes les souches. Cependant, nous avons noté l'absence du gène mec C, nouvelle variante du mec A, et la présence de la toxine PVL pour 4 des 6 souches. Les souches N° 10 et 11 présentaient une résistance multiple à sept antibiotiques. La souche N°11 englobe le cotrimoxazole dans son profil, alors que la souche N°10 présentait le profil suivant avec une résistance croisée pour les aminoglycosides [OXA- PEN – FOX- NEO - KAN-TCY-ENR]. Quant aux souches N° 12 et 13, elles présentaient respectivement les profils suivants :

SoucheN°12 : [OXA-PEN-AMC-FOX-TCY].

SoucheN°13 : [OXA-PEN-AMC-FOX-SXT-TCY].

5.1.2. Caractéristiques des souches d'origine aviaire

➤ Poulet de chair

La caractérisation des souches a été réalisée par rapport à la confirmation du genre et de l'espèce et par la recherche du gène mec A et de son apparenté mecALGA251 codant pour la résistance à la méthicilline et ensuite par la recherche de la toxine Panton Valentine. Le tableau N° 18 synthétise les profils génotypiques des souches testées par PCR isolées à partir du poulet de chair.

Tableau 18 : Synthèse des profils génotypique des souches testées par PCR multiplexe isolées à partir du poulet de chair

Identification de la souche	Renseignements concernant le prélèvement			Confirmation/Infirmer		Phénotype de résistance	Présence de gènes		Présence de PVL
				Genre	Espèce				
	Espèce d'origine	Date du prélèvement	Origine du prélèvement (Wilaya)	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>		MecA	MecC	
3	Poulet de chair	2014	Bouira	+	-	<i>OXA- PEN- FOX-ERY-ENR</i>	+	-	-
4	Poulet de chair	2010	Bouira	+	+	<i>OXA-PEN - FOX-ERY</i>	+	-	+
5	Poulet de chair	2011	Bejaia	+	+	<i>OXA- PEN - FOX -ENR-ERY</i>	+	-	+
6	Poulet de chair	2013	Boumerdès	+	+	<i>OXA-PEN-AMC-FOX-TCY-ENR</i>	+	-	+
7	Poulet de chair	2014	Bejaia	+	+	<i>OXA-PEN-FOX-SXT-TCY-ENR</i>	+	-	+
8	Poulet de chair	2010	Boumerdès	+	+	<i>OXA- PEN- FOX-ERY-ENR</i>	+	-	+
9	Poulet de chair	2011	Boumerdès	+	+	<i>OXA-PEN-FOX-NEO-TCY</i>	+	-	+

Oxacilline (OXA : 1µg),PénicillineG(PEN :10UI),Céfoxitine (FOX :30µg),Néomycine (NEO :30 µg), Kanamycine (KAN :30 µg), Gentamicine GEN :10 µg), Triméthoprim/Sulfaméthoxazole(SXT:1,25/23,75 µg),Tétracycline (TCY:30 µg), Enrofloxacin (ENR :5 µg), Vancomycine(VAN :30 µg), Amoxicilline +acide clavulanique(AMC : 20/10 µg), Pénicilline + Novobiocine (PNO : 10UI/30 µg),Clindamycine (CMN :2 µg) ,Gène mecA, Gène mec C ,pvl : Leucocidine Panton Valentine

7 souches caractérisées étaient d'origine aviaire, poulet de chair comme type de production. Leur provenance était les wilayas de Boumerdès, Bejaia et Bouira. Comme pour les bovins, le gène *mecA* était présent chez toutes les souches, néanmoins, il a été noté l'absence du gène *mecC*, nouvelle variante du *mecA*. Le gène de la toxine PVL était présent chez six souches sur sept.

En matière de profils de résistance, les souches 6 et 7 présentaient une résistance multiple à 6 antibiotiques. La différence se situe au niveau du cotrimoxazole pour la souche 7, en effet son profil est [OXA-PEN-FOX-SXT-TCY-ENR] par contre la souche N° 6 présentait le profil suivant avec une résistance croisée pour les antibiotiques de la famille des β -Lactamines [OXA-PEN-AMC-FOX-TCY-ENR].

Les souches N° 3, 5, 8 et 9, présentaient toutes des résistances à 9 antibiotiques. Les souches N°3, N° 5 et N° 8 présentaient le même profil malgré que l'année et la wilaya, origine du prélèvement étaient différents. La souche N°3 provenait de la wilaya de Bouira isolée en 2014, la souche N° 5 dont l'origine est la wilaya de Bejaia et isolée en 2011 et la souche N° 8 était originaire de Boumerdès isolée en 2010.

Le profil commun est [OXA- PEN- FOX-ERY-ENR].

Quant à la souche N°9, elle provient elle aussi de la wilaya de Boumerdès, isolée en 2011, dont le profil de résistance à 5 antibiotiques est le suivant [OXA-PEN-FOX-NEO-TCY].

La souche N°4 par contre résiste à quatre antibiotiques appartenant à deux familles dont les β -Lactamines et les macrolides, son profil est le suivant [OXA-PEN - FOX-ERY].

5.2: Quantification de produits de PCR purifiés par migration sur gel d'agarose

Les résultats obtenus ont révélé les gènes *MecA* et *mecC* pour les souches testées. La figure N°22 montre les produits d'amplification des gènes *spa*, *mecA*, *mecC* et *pvl* extrait à partir de souches de *S. aureus* de portage isolées à partir des bovins et du poulet de chair.

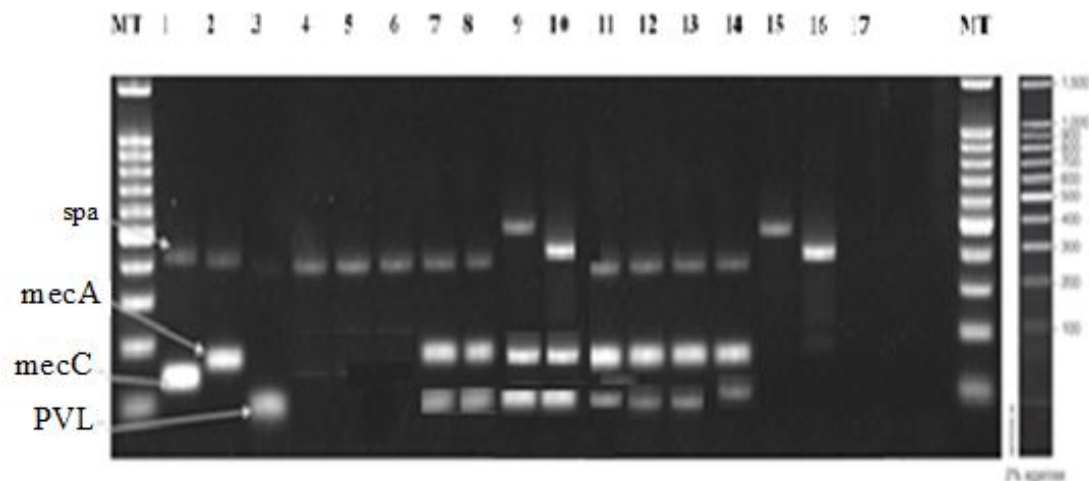


Figure 22 : Gel électrophorétique d'agarose montrant les produits d'amplification des gènes *spa*, *mecA*, *mecC* et *PVL* extrait à partir de souches de *S. aureus* de portage isolées à partir des bovins et du poulet de chair

MT : Marqueur de taille 100pb (Promega) ; Colonne 1 : Témoin positif pour le gène *mecC* (*S. aureus* LGA251) ; Colonne 2 : Témoin positif pour le gène *mecA* (*S. aureus* MU50) ; Colonne 3 : Témoin positif pour le gène *lukF-PV* (*S. aureus* ATCC 25923) ; Colonnes 4,5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,15 et 16 : souches de *S. aureus* à tester ; 17 : Témoin négatif (H₂O)

Les résultats du dosage des extraits d'ADN des treize souches du *Staphylococcus spp.*, et des trois souches de référence ont montré des résultats assez probants.

Les révélations des différents témoins positifs et négatifs sont représentées comme suit :

- Pour le gène *mec C* (International World Group for SCCmec Cassette [IWG-SCCmec]), nouveau variant du gène *mecA* : La colonne N°1
- Pour le gène *mec A* codant pour la résistance à la méthicilline : La bande N°2
- Pour le gène *lukF-PV* codant pour la leucocidine de Panton-Valentine en bande N°3.
- Bande N° 17 : Témoin négatif (H₂O)

Toutes les autres colonnes représentent les souches à tester de 1 jusqu'à 13 correspondant aux colonnes 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 qui ont été bien révélées néanmoins les bandes 14,15 et 16 n'ont pas été bien illustrées .

DISCUSSION

Le genre *Staphylococcus* et principalement l'espèce *aureus* a montré, au cours de ces dernières années, dans le monde entier un fort pouvoir de colonisation naso-pharyngée asymptomatique, passager ou persistant, en particulier chez les animaux notamment le porc. En effet, il a été démontré que le nasopharynx et les narines antérieures constituent la niche écologique principale pour ce germe aussi bien chez l'homme que chez l'animal agissant ainsi ; comme des vecteurs et jouant un rôle dans sa dissémination (Coughlan *et al.*, 2010 ; Wetheim *et al.*, 2005 ; Pletinckx *et al.*, 2011 , Verhegghe *et al.*, 2012). La problématique est que cette bactérie aux multiples facettes est passée maître dans l'art de s'adapter à son environnement en acquérant au fil du temps entre autres des gènes de résistance à plusieurs antibiotiques. La sonnette d'alarme a été tirée à partir du moment où la notion de spécificité d'hôte n'existe plus pour ce germe qui, avec tout son arsenal impressionnant défile entre l'animal et l'Homme ; chez qui, au départ il était restreint au milieu hospitalier, a diffusé très vite en milieu communautaire avec son passage dans le monde animal.

En médecine humaine, l'isolement de SARM fait partie du quotidien de tous les laboratoires de diagnostic. Les cas se multiplient et des mesures de prévention sont prises afin de limiter sa propagation. En médecine vétérinaire, par contre, les infections aux SARM sont considérées comme un problème émergent, associé aux infections nosocomiales vétérinaires comme les décrivent Graveland et ses collaborateurs en 2011.

Le SARM ST398 étant le premier connu dans la colonisation à grande échelle de l'industrie des porcs avec une spécificité limitée d'hôte et capable ainsi de coloniser et de provoquer des infections chez divers hôtes. Jusqu'à présent, les mécanismes d'adaptation de l'hôte et leur origine génomique sont encore mal connus (Hartmann *et al.*, 1997 ; Seguin *et al.*, 1999, Tomlinet *et al.*, 1999 ; van Duijkeren *et al.*, 2004)

Les résultats de notre étude, et dans le cadre de l'appui à l'hypothèse du portage nasal asymptomatique du genre staphylocoque, surtout par l'espèce *S. aureus* résistante à la méthicilline, autrement dit résistante à la plupart des familles d'antibiotiques chez plusieurs espèces animales en confinement avec l'homme constitue un socle pour des études de prévalence beaucoup plus élargie.

Nos échantillons ont été réalisés par écouvillonnage à partir des narines des espèces animales choisies, en se basant sur les résultats d'une étude comparative ayant permis de classer ce site comme étant l'un des sites le plus fréquemment colonisés par les SARM (Pletinckx *et al.*, 2011). Nous espérons ainsi, sensibiliser les pouvoirs publics à renforcer la législation dans le cadre du dépistage systématique de ce germe et de la restriction de l'usage des antibiotiques surtout en médecine vétérinaire, et ainsi procéder à l'application de la politique des « antibiotiques critiques réservés exclusivement pour la médecine humaine ».

Notre échantillonnage est représenté par un total de 32000 écouvillonnages nasaux issus de quatre wilayas du centre du pays, Bouira, Boumerdès, Tizi-Ouzou et Bejaia ; et compte 8000 prélèvements par espèce animale effectués durant la période allant de 2009 à 2014.

1. Prévalence de *Staphylococcus aureus* chez les espèces étudiées

1.1. Bovins

En dehors des études de prévalence de ce germe dans le cas de mammites chez cette espèce animale, très peu de données ont été publiées dans le cadre du portage nasal dans divers pays européens (Allemagne, Autriche, Belgique, Danemark, Espagne, France, Italie, Pays-Bas, Suisse, Suède) ou encore au Canada, aux USA, en Chine, voire à Singapour. Le portage nasal du staphylocoque a été clairement démontré plutôt chez le porc (van Loo *et al.* 2007 ; Voss *et al.* 2005 ; Witte *et al.* 2007). A la suite de descriptions de cas humains reliés à des souches de SARM d'origine porcine, une vaste étude de prévalence sur d'autres espèces animales, notamment les bovins, a été menée en France qui rapportent des taux proches à ceux décrits dans notre travail, 6% soit (465/8000) de portage de *Staphylococcus spp.* avec 55% soit (258/465) de *Staphylococcus aureus*. Madec *et al.*, en 2010, notent une prévalence de *S. aureus* de 67% (415/623) ; Haenni *et al.*, en 2011 et Cuny *et al.*, en 2010, dans une enquête sur le portage nasal réalisée dans des abattoirs en France en 2009, révèlent un même taux de 43,1%. Notre résultat est supérieur à ceux décrits en Afrique du sud et en Asie, rapportées respectivement par Ramatla *et al.* en 2016 et Sudhanthirakodi *et al.* en 2015, avec des taux respectifs de 26,5 % (159/600) et 39,09% (43/110 échantillons).

Toutes ces études confirment le portage de ce germe chez cette l'espèce bovine. Les variations observées d'un pays à un autre, pourraient être reliées à plusieurs paramètres, tels que le mode d'élevage, les conceptions des bâtiments d'élevages et les mesures de biosécurité appliquées.

1.2. Volaille : Notre travail a concerné deux types de production dans l'espèce *Gallus gallus* et chez la dinde appartenant à l'espèce *Meleagris*.

1.2.1. Chez l'espèce *Gallus gallus* : Il est encore difficile de disposer d'une visibilité complète sur l'épidémiologie du staphylocoque animal dans cette filière. En effet et jusqu'à présent ; la fréquence du portage du staphylocoque chez tous les animaux de basse-cour reste méconnue, bien qu'il ait été confirmé chez le chien et le chat vivant en confinement avec le porc (Nemati *et al.*, en 2008 et Pletincky *et al.*, 2012). Concernant la volaille, les bovins et les chevaux, il semblerait que le portage existe mais avec des fréquences très faibles, en effet et dès 2003, quelques données ont été rapportées dans divers pays dont la Corée et le Japon, les souches de *Staphylococcus*

aureus isolées présentait certaines caractéristiques retrouvées chez des souches humaines (MADEC *et al.*, 2010).

1.2.1.1. Chez les poules pondeuses : Sur un total de 8000 échantillons analysés 1875 ont présenté des cultures positives à staphylocoques représentant 23% des prélèvements. Parmi les échantillons positifs, 1089 soit 58% étaient des *Staphylococcus* à coagulase négative et 786 soit 42% étaient des *Staphylococcus* à coagulase et DNase positives, et 6125 échantillons ne présentaient aucun germe. En 2007, en Belgique, aucun Staphylocoque n'a été isolé à partir des échantillons prélevés du cloaque et de la cavité nasale de 500 poules pondeuses appartenant à 10 exploitations différentes (Persoons *et al.*, 2009), contrairement à notre étude où nous enregistrons 23% (1875/8000) *Staphylococcus* spp, et 42% (786/1875) de *Staphylococcus aureus*; ceci pourrait être dû probablement au faible échantillonnage réalisé par cette étude, en comparaison avec la notre. De la même façon, au Québec, une étude ponctuelle réalisée par Bernier-Lachance en 2015 sur des échantillons nasaux de 200 poulets rapporte une prévalence de ce germe évaluée à 1.29%, résultat largement inférieur à celui rapporté dans notre étude (Bernier-Lachance *et al.*, 2015). Contrairement à ce qui est connu dans le monde pour le portage du *Staphylococcus aureus* chez ce type de production, notre étude bien que fragmentaire a permis d'apprécier un taux de contamination non négligeable, d'avancer une information importante dans l'orientation d'autres recherches qui permettront une meilleure prise de conscience pour toutes les personnes vivant en confinement avec cette espèce en tenant compte du nombre d'exploitations de ce type d'élevage qui ne cesse d'augmenter dans notre pays.

1.2.1.2. Chez le poulet de chair : Sur un total de 8000 échantillons analysés, 6500 ont présenté des cultures positives à staphylocoques, représentant 81% des prélèvements. Parmi les échantillons positifs, 5711 soit 88% étaient des *Staphylococcus* à coagulase négative et 789 soit 12% étaient des staphylococcus coagulase positive. Ce taux de portage est similaire à ceux rapportés par plusieurs études réalisées en Europe, particulièrement, en Belgique suite aux enquêtes lancées pour le dépistage systématique du SARM dans les élevages autres que ceux du porc. Plusieurs auteurs parmi lesquels Nemati *et al.* en 2008, Persoons *et al.* en 2009, Mulders *et al.* en 2010 et Monecke *et al.* en 2013, rapportent des taux de 12% confirmant notre résultat.

Des études effectuées en Afrique rapportent des taux de portage supérieurs à celui enregistré dans notre étude. Ainsi, au Maroc, l'étude menée par El Ouahabi *et al.*, en 2015 chez ce type de production a abouti à un taux de *S. aureus* de 16 % soit une charge moyenne de contamination de 2.17 log₁₀ UFC/g. En Égypte dans la même année 2015, Khalafalla *et al.* rapportent un taux de portage de 26,6%. Ce dernier taux est dû probablement à une contamination concomitante suite

au non-respect des mesures d'hygiène lors des prélèvements hypothèse avancée par l'auteur lui-même. Un constat similaire a été avancé lors de l'étude menée en 2012 au Nigeria par Suleiman *et al* où ils constatent un taux de portage de 54% soit (54/100 prélèvements réalisés).

1.2.2. Chez l'espèce *Meleagris* (la dinde) : Sur un total de 8000 échantillons analysés, 307 ont présenté des cultures positives à staphylocoques, représentant seulement 4% des prélèvements. Parmi les échantillons positifs, 174 soit 57 % étaient des *Staphylococcus* à coagulase négative et 133 soit 43% étaient des staphylococcus à coagulase positive. 7693 échantillons ne présentaient aucun germe. Comme chez les poulets de chair et les poules pondeuses, très peu de données existent sur la caractérisation et le portage des staphylocoques chez la dinde bien que celui-ci a été détecté dans l'aliment de dinde (Febler *et al.*, 2011, Monecke *et al*, 2013). Cariou *et al.* en 2014, ont rapporté que le taux d'infection dans les élevages de dindes est bien inférieur à celui enregistré dans les bâtiments d'élevage de poulets, de porcs, de vaches laitières ou au niveau des épandages. Leur présence constitue certainement un des facteurs de risque et conclue suite à l'analyse des prélèvements de l'air juste autour des bâtiments d'élevage que la prévalence du SARM était très importante permettant de conclure à une contamination directe par voie respiratoire.

En résumé, le poulet de chair présente le taux de portage par les *Staphylococcus* spp. le plus élevé, suivi des poules pondeuses, des bovins, et enfin de la dinde. Néanmoins le taux de portage par le *Staphylococcus aureus* est plus important chez l'espèce bovine, suivi de la dinde puis la poule pondeuse et enfin le poulet de chair. L'impact du portage nasal a été démontré comme un facteur prédisposant à la survenue d'infection à *S. aureus*, en effet, Wertheim *et al* en 2005 l'ont prouvé et ont alerté sur ses conséquences, ce qui expliquerait probablement l'importante prévalence des mammites bovines et des arthrites chez la dinde dues à *Staphylococcus aureus*.

2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Il est maintenant acquis que l'exposition aux antibiotiques favorise l'évolution des résistances bactériennes et que la colonisation est l'élément central de la dissémination des résistances bactériennes dans une population donnée (Baquero., 1995 ; Baquero., 1996 ; Guillemot., 2000 ; Toutain *et al.* ,2004 et Chauvin *et al.*, 2005). C'est dans ce contexte que s'inscrit notre démarche de collecte de données de résistance aux antibiotiques chez ce germe de portage constituant ainsi un outil de surveillance pour l'analyse du risque sur la santé animale et par la suite sur la santé publique.

2.1. Choix des antimicrobiens

Le choix des antimicrobiens a été effectué selon les recommandations du *CLSI* et de la *CA-SFM* , en tenant compte des résistances naturelles et des différents mécanismes connus du *Staphylococcus aureus* dans le but d'enrichir les données de résistance déjà publiées et de détecter l'apparition éventuelle de nouveaux phénotypes de résistance. La pénicilline a été utilisée comme indicateur des bêta-lactamines sensibles aux pénicillinases, tandis que l'oxacilline représentait ceux qui en sont résistants (Jorgensen *et al.*, 2003). L'oxacilline permet d'étudier la résistance à la méthicilline et compte tenu de son instabilité le *CLSI* recommande l'utilisation de disque chargé avec 30 µg de céfoxitine (NCCLS, 1999 ; NCCLS, 2004 ; Velasco *et al.*, 2005 ; Boubaker *et al.*, 2004 ; Swenson *et al.*, 2005). Les antimicrobiens tels que la combinaison pénicilline-novobiocine et l'érythromycine ont été testés car, ce sont les principes actifs de nombreux traitements chez le bovin. La tétracycline et la combinaison triméthoprim-sulfaméthoxazole sont les deux principaux antimicrobiens utilisés par voie systémique lors de traitement de différentes pathologies aiguës. La gentamicine est un antimicrobien disponible mais non autorisé en Algérie, son choix est justifié par une contribution à une surveillance épidémiologique.

2.2. Résultats phénotypiques

2.2.1. β-Lactamines

Pour cette partie de l'étude de résistance, nous avons choisi de présenter les principales molécules appartenant à cette famille et essayer de leur combiner la discussion de la résistance pour chaque espèce animale étudiée. Il faut souligner que les bêta-lactamines constituent le traitement de première intention des infections staphylococciques (Poole, 2004).

2.2.1.1. Bovins

Nos résultats rapportent un taux de résistance à la pénicilline de 72% (187/258), de 31% à l'oxacilline et à la céfoxitine (80/258) et nulle aux associations Amoxicilline +acide clavulanique et Pénicilline + Novobiocine (0/258). Partant du fait que lorsque le laboratoire de bactériologie signale une résistance à la pénicilline (sans résistance à l'oxacilline), celle-ci implique aussi une résistance à l'ampicilline et à l'amoxicilline, raison pour laquelle les souches ne pas testées pour éviter des redondances dans nos résultats. En revanche, les pénicillines associées à un inhibiteur de pénicillinase (acide clavulanique) ou à des bêtalactamines insensibles aux pénicillinases (céphalosporines) restent actives, ce qui est confirmé dans toutes nos études même chez les autres espèces. En pratique, les céphalosporines de troisième génération sont dix fois moins actives que l'oxacilline sur le staphylocoque (Leclercq, 2002; Werckenthin *et al.*, 2001), ce qui justifie leur inutilisation dans notre expérimentation. Par contre, l'utilisation du disque d'antibiotique pénicilline/novobiocine chargé à 10 UI / 30µg utilisé en pratique bovine pour le traitement intramammaire au tarissement permet de mettre en évidence le synergisme de ces molécules envers les *S. aureus* (Dowling, 2006).

Très peu de résultats sur ces résistances sont rapportés pour les isolats de portage du *S. aureus* chez l'espèce bovine (Salmon *et al.*, 1998; De Oliveira *et al.*, 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002; Erskine *et al.*, 2004), ce qui dénote l'absence ou du moins la faible prévalence des SARM à travers le monde chez cette espèce. Ces données s'avèrent rassurantes en vertu de tous les problèmes associés aux SARM chez les humains. Le lait de consommation pouvant être fort probablement exclu des sources de transmission à l'humain (Salmon *et al.*, 1998; De Oliveira *et al.* 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002; Erskine *et al.*, 2004). De manière générale, sachant que la sécrétion de pénicillinases est présente chez 70 à 90 % des *S. aureus*, la pénicilline est l'antibiotique pour lequel les niveaux de résistance sont les plus élevés. En 2015, Sudhanthirakodi *et al* ont mené une étude de prévalence et d'antibio-résistance de *Staphylococcus aureus* chez les bovins en Inde. Sur un total de 110 échantillons, *Staphylococcus aureus* était confirmé sur 43 d'entre eux, la résistance à la pénicilline était de 86,04% (37/43), de 74,42% (32/43) à l'ampicilline, de 13,95% (6/43) à la méthicilline et de 13,95% (6/43) à la céphalotine. L'étude menée par Hamid *et al.* en 2017, en Corée du sud sur des prélèvements bovins a montré une prévalence des SARM de 16,6% (6/36). Les souches isolées ont montré des taux de résistance de 94,4% (34/36) à la pénicilline, de 83,3% (30/36) à l'ampicilline et de 77,7% (28/36) à l'amoxicilline-sulbactam. Ces taux de résistances demeurent très élevés et similaires à ceux enregistrés au cours de notre étude, soulignant les conséquences de la forte utilisation des antibiotiques de cette famille chez cette espèce. L'étude menée en Argentine, sur

206 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mammites cliniques et sub-cliniques chez les bovins entre 1996 et 1998, a montré que la résistance de ce germe à la pénicilline était la plus importante avec 40,3% (83/206) par rapport à tous les agents antimicrobiens testés (Gentilini *et al.*, 2000). Dans cette même étude, aucune résistance n'a été détectée pour l'oxacilline, la céphalotine et l'amoxicilline-acide clavulanique. Il est à noter qu'en Amérique du sud, suite à l'application d'une politique de changement des pratiques de l'utilisation des antibiotiques chez les bovins, Erskine *et al.* en 2004 ont rapporté une baisse de la résistance du *Staphylococcus aureus* à la pénicilline. Baisse confirmée par d'autres auteurs (Salmon *et al.*, 1998; De Oliveira *et al.*, 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002) qui ont publié également des faibles taux de résistance de l'ordre de 1%, confirmant le danger d'une forte exposition à l'antibiotique dans l'apparition de la résistance.

2.2.1.2. Volaille

Chez la volaille ; c'est le poulet de chair qui présente le plus fort taux de résistance avec 92% pour la pénicilline suivie des poules pondeuses avec un taux de 79% puis la dinde avec un taux relativement bas de 41% (55/133). Concernant les associations pénicilline-novobiocine et amoxicilline-acide clavulanique, la résistance était nulle pour l'ensemble des espèces de volailles sur lesquelles notre étude a porté, confirmant l'absence d'indication de ces antibiotiques chez ces espèces. L'oxacilline et la céfoxitine ont montré les résistances confirmées plus importantes chez la poule pondeuse avec 57%, suivie du poulet de chair avec 53%. La dinde ne présente aucune résistance à ces deux antibiotiques. Chez les volailles, des souches SARM ont été rapportées dès 2003. Plus récemment, ont été identifiées des souches de SARM en Belgique, dont la résistance aux antibiotiques était à nouveau marquée vis-à-vis des tétracyclines, plus rarement des macrolides et du triméthoprim (Nemati *et al.*, 2008 ; Persoons *et al.*, 2009). Cette résistance est surtout observée chez le poulet de chair plutôt que chez la poule pondeuse. 41 *S. aureus* méthicillino-résistants sur 175 échantillons de poulet de chair (23%) étaient détectés suite à une étude récente menée en Egypte par Ashraf *et al.* en 2016, présentant une résistance élevée à l'oxacilline (98%) suivie par la méthicilline (94%); ces résultats sont supérieurs à ceux retrouvés dans notre étude. Quant au taux de résistance à la pénicilline, il était de 68% ; résultat inférieur à ceux notés au cours de notre étude avec 92% et 79% respectivement chez le poulet de chair et les poules pondeuses.

Chez la dinde, nos résultats montrent une résistance de 41% soit (n=55/133) pour la pénicilline, et de 0% pour l'oxacilline, l'amoxicilline additionnée de l'acide clavulanique et la Céfoxitine. L'étude menée en Bretagne entre 2008 et 2012 par Cariou *et al.*, en 2014, sur trente-quatre souches

de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de vingt-neuf lots de dindes futures reproductrices a rapporté la présence d'une seule souche de SARM résistante à la céfoxitine (oxacilline) et 100% des souches étaient résistantes à la pénicilline. Cette même souche confirmée par Friese *et al.* en 2013 possédant le gène *mecA*, et appartenant au CC398. Ces résultats concordent avec ceux de notre étude, la résistance à l'oxacilline et à la méthicilline est nulle ou insignifiante, quant à la résistance à la pénicilline, notre étude rapporte un pourcentage relativement bas par rapport au pourcentage rapporté par Cariou *et al.* dans leur étude en 2014. Nous avons remarqué que la résistance à la pénicilline était la plus importante pour toutes les espèces étudiées, avec le plus fort taux enregistré chez la volaille, pour le poulet de chair avec 92%, suivi de la poule pondeuse avec 79% puis le bovin avec 72% et enfin la dinde de chair avec 41%. Nous concluons ainsi qu'il y a une corrélation entre l'utilisation d'un antibiotique et l'apparition des résistances lorsque celui-ci est très largement utilisé, thèse rapportée déjà par plusieurs auteurs (Baquero., 1995, Baquero., 1996, Guillemot., 2000, Toutain *et al.*, 2004 et Chauvin *et al.*, 2005).

En effet, pour un modèle bactérie/antibiotique-mécanisme de résistance, ces facteurs sont à priori indépendants, mais interagissent l'un avec l'autre et, c'est de cette interaction que naît dans les populations le risque évolutif de la résistance. Il faut comprendre qu'il ne peut y avoir d'augmentation de la fréquence de portage d'une bactérie résistante sans que les deux éléments soient associés. En effet, la diffusion des résistances bactériennes dans une population passe nécessairement par une colonisation chez les espèces pour lesquelles l'exposition à l'antibiotique confère un avantage écologique aux bactéries résistantes par rapport aux bactéries sensibles. Nous concluons que l'exposition d'une population à un antibiotique constitue la condition indispensable à la diffusion d'une bactérie résistante à cet antibiotique (Guillemot., 2000, Baquero., 1995 ; Baquero, 1996)

2.2.2. Résultats des tests complémentaires : Prévalence des *Staphylococcus aureus* méthicillino-résistants (SARM) chez les espèces étudiées

2.2.2.1. Bovins

Chez les bovins, 31 % (80/258) des souches de *Staphylococcus aureus* isolées présentaient une résistance à la méthicilline. Ce résultat est supérieur à ceux rapportés par des travaux effectués aux États Unis d'Amérique en 2011 par le centre de la sécurité des aliments et l'institut de la coopération internationale dans la biologie animale (de 7 à 10%), et en Europe, notamment en France suite à l'enquête menée par Madec et son équipe en 2010, qui rapportent eux, un taux inférieur à 1% suite à la caractérisation de 415 souches de *S. aureus* déduisant que la résistance à la méthicilline était rare chez les bovins. L'étude de Cuny *et al.* en 2010 rapporte que le tiers des

isolats de bovins soit (208/623) étaient des staphylocoques à coagulase négative, et que parmi les 415 souches de *S. aureus* restantes, aucune ne présentait de résistance à la méthicilline. Le même constat a été fait suite à des enquêtes réalisées sur des échantillons dans des abattoirs en France en 2009 par Haenni *et al.* en 2011.

Ces derniers ont évalué le taux de SARM à 6,5% soit 8 sur 123 souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de veaux en provenance de 14 fermes géographiquement indépendantes. Les résultats de toutes ces études soulignent la faible prévalence des SARM chez les bovins en France, estimée à 1% (Botrel *et al.*, 2010), contrairement à notre étude, qui enregistre un taux de 31% de SARM, ce qui mériterait de porter une attention particulière afin d'explorer la piste de l'existence probable de défenses naturelles chez le bovin, pour pouvoir l'exploiter pour réduire les risques engendrés par le portage de ce germe sur l'environnement.

2.2.2.2. Volaille

2.2.2.2.1. Poules pondeuses

786 échantillons prélevés des poules pondeuses soit 42% étaient des *Staphylococcus aureus* parmi lesquels 448 soit 56% étaient méthicillino-résistants.

En dehors du porc, toutes les données de prévalence relatives au SARM au sein des différentes autres filières animales, sont à ce jour extrêmement fragmentaires et sont concentrées sur les cas d'infections plutôt que sur le portage (Madec *et al.*, 2010). L'existence du *Staphylococcus aureus* méthicillino-résistant chez la volaille a été signalée dans plusieurs pays du monde dès 2003 spécialement en Corée et au Japon (Nemati *et al.*, 2008 ; Persoons *et al.*, 2009, Madec *et al.*, 2010). Dans notre étude, 56% des souches *Staphylococcus aureus* isolées pour cette filière étaient méthicillino-résistantes légèrement supérieur au résultat de Febler *et al.* en Allemagne en 2011 ; lesquels décrivent une prévalence de 50%. Néanmoins Hermans *et al.* (2008) suite à leur étude sur le portage des MRSA chez la poule pondeuse, concluent à un taux très faible et même nul des MRSA en argumentant avec l'utilisation limitée des antibiotiques dans ce type d'élevage.

2.2.2.2.2. Poulet de chair

Sur un total de 789 souches de *S. aureus* isolées, 394 ont été confirmées méthicillino-résistantes soit un taux de 50%. Plusieurs études publiées à travers le monde sur la prévalence du SARM chez ce type de production rapportent des taux nettement inférieurs à celui de notre étude. Ainsi, en Amérique du nord, les résultats des travaux rapportent tous des prévalences assez similaires entre elles et relativement basses comprises entre 0% et 3,9%. Aux États Unis d'Amérique, en 2015, Abdalrahman *et al.* rapportent un taux de 1,8% (2/114). Au Canada, une étude publiée suite à une collecte d'échantillon provenant de plusieurs provinces rapporte également une prévalence

de 1,2% de SARM (Weese., et *al.* 2010). En Europe aussi, plusieurs études rapportent des taux allant de 16 à 25 % en Allemagne et aux Pays-Bas (Abdallahman., 2015, Fessler., 2011, Weese, et *al.* 2010, De Boer, et *al.* 2009, Hanson, et *al.*, 2011 ; Bhargava, et *al.*, 2011) qui restent faibles comparativement à notre résultat. Certains pays d'Asie rapportent aussi des taux variant de 0% à 4% nettement inférieurs au résultat de notre étude (Hiroi *et al.*, 2012). Ces faibles taux sont aussi confirmés par l'étude menée au Japon par Kitai *et al.* en 2005. Notre étude rapporte un taux largement supérieur à beaucoup travaux réalisés en Afrique. Au Nigéria l'étude sur le portage du *Staphylococcus méthicillino résistant* chez ce type de production a révélé un taux de 0,9% (13/1400) avec la présence du gène *mecA*, soulignant ainsi le rôle potentiel de la volaille dans la diffusion de SARM (Otal, 2015). Karmi en 2013 en Égypte a enregistré un taux 44 % (11/25), bien inférieur à celui enregistré au cours de notre étude. Une autre étude plus récente (2016) menée sur la caractérisation des *Staphylococcus aureus* méthicillino -résistants du poulet de chair, a noté un taux de 23% soit (41/175 échantillons aléatoires) avec 5 souches examinées au hasard entérotoxigéniques et une seule souche porteuse du gène de virulence de leucocidine (PVL) (Ashraf *et al.*, 2016). Notons qu'un taux assez élevé a été rapporté suite à une étude effectuée en Allemagne dans le cadre de l'évaluation de la contamination au niveau des bâtiments d'élevage du poulet de chair et a rapporté un taux de 54% de MRSA (Frieze *et al.*, 2013). Toutes ces données reflètent la réalité du terrain de ce type de production dans la région de l'étude. En effet, sa détention presque exclusive par le secteur privé dont une forte proportion appartient aux petits élevages excédant les 60 % du total de marché (Kaci *et al.*, 2013), sa forte exposition aux antibiotiques est effectivement un facteur de risque associant la présence de gènes de multirésistance, la contribution à leur dissémination et à l'enrichissement progressif de l'environnement par des populations bactériennes multi résistantes. Ainsi, vu que ce type de production échappe apparemment totalement au contrôle des autorités sanitaires, il pourrait être considéré comme sentinelle afin d'évaluer et quantifier l'usage des antibiotiques.

2.2.2.2.3. Dinde

Le taux de portage du *Staphylococcus aureus* enregistré chez la dinde par notre étude est de 43% (133/307), aucune souche n'a été confirmée methicillino- résistante. Notre résultat négatif, diffère de tous ceux rapportés par les études publiées en rapport avec cette espèce. Ainsi, Febler *et al.* déclarent un taux de 52,4% dans une étude réalisée en Allemagne en 2011. Dans ce même pays, Richter *et al.* en 2012 ont montré une forte prévalence de portage de SARM dans les troupeaux de dindes, évaluée à 90% (soit 18 troupeaux sur 20). Une autre étude de prévalence menée dans la région de Bretagne en France entre 2008 à 2012 conclue à 34 souches de SARM isolées à partir

d'un total de 29 lots de dindes reproductrices parmi les souches isolées, 91,2% appartiennent au complexe clonal (CC) 398, associé aux animaux d'élevage (Cariou *et al.*, 2014).

Une étude effectuée en Allemagne dans le cadre de l'évaluation de la contamination dans les bâtiments d'élevage de dinde a rapporté un taux de 77% de MRSA (Frieze *et al.*, 2013), ce qui expliquerait probablement l'hypothèse d'une éventuelle contamination des sujets par l'écosystème dans lequel ils se trouvent. D'où la nécessité d'appliquer les mesures de biosécurité pour réduire la pression microbienne exercée par ce genre de bactéries.

2.2.3. Aminosides

En Algérie, en dehors de la néomycine et de la kanamycine, l'usage de la gentamicine est interdit chez les animaux (Arrêté du 20 juin 2016). L'étude de sa résistance aux antibiotiques a été effectuée dans le cadre de l'épidémiologie-surveillance.

Pour toutes les espèces étudiées, les résistances aux antibiotiques appartenant à cette famille étaient presque identiques. Pour la néomycine et la kanamycine, elles variaient entre 11% (27/258) et 12% (27/219). Depuis 2015, les recommandations du comité du CLSI, stipulent que lors de la réalisation de l'antibiogramme, l'utilisation du disque de la néomycine ou de la kanamycine suffit pour généraliser l'interprétation phénotypique pour ces deux antibiotiques. Dans notre étude, nous ne pouvons considérer les résultats de résistance vis-à-vis de la kanamycine des poules pondeuses et du poulet de chair, car, le nombre de souches testées était insignifiant. Pour la néomycine, en général, les résultats étaient presque identiques, ils étaient de 11% (27/258) pour les bovins, et 10% (81/774) pour la poule pondeuse et 10% (701/777) le poulet de chair.

Chez la dinde, il a été relevé un taux de 74% (98/133) de résistance pour la néomycine, soit le plus fort taux signalé pour cette molécule par rapport aussi bien aux bovins, que les poules pondeuses et le poulet de chair. Le taux de résistance est relativement élevé pour la kanamycine avec 26% (35/133), ce qui pourrait probablement faire suite à la méconnaissance des pratiques de traitement liées à cette espèce, dont l'élevage n'a connu son développement et son industrialisation qu'à partir de 2014 (Ferrah, 2018). Quant à la résistance à la gentamicine, les résultats enregistrés au cours de notre étude étaient faibles, variant de 0% chez les bovins et la dinde à 3% chez les poules pondeuses et le poulet de chair. Partant de ce constat, nous déduisons sa probable timide circulation chez ces espèces malgré son retrait de la nomenclature en Algérie à l'instar d'autres pays comme le Canada (Erskine *et al.*, 2004). Reverdy en 2005, dans une communication a déclaré qu'il s'est produit une perte de la résistance des SARM à la gentamicine à partir des années 90, confirmant les résultats de notre étude. Toutes ces résistances constatées chez *Staphylococcus aureus* et spécialement le SARM, s'expliquent par la plasticité de son génome qui lui confère en plus de la capacité de s'adapter à toutes les conditions environnementales, l'acquisition des gènes

de résistance aux antibiotiques et de développer des mécanismes de régulation pour s'adapter à des concentrations encore croissantes d'antibiotiques. De Neeling et al. (2007) ; Denis et al. (2009) et Guardabassi et al. (2007) confirment la co-résistance de ce germe à d'autres familles d'antibiotiques notamment et moins souvent pour les aminosides (kanamycine, gentamicine).

Les aminoglycosides sont un groupe d'antibiotiques conservant une activité bactéricide vis-à-vis de nombreuses bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Après plus de 50 ans d'utilisation, ils gardent toujours un intérêt thérapeutique. Leur utilisation doit se consigner dans un cadre strict de prescription avec des indications limitées, en aspirant l'obtention d'une synergie bactéricide avec un inhibiteur de la paroi bactérienne en s'accompagnant d'une surveillance adaptée. Les bactéries résistent aux aminoglycosides par le biais d'enzymes modifiant les groupements hydroxyles et amines de ces antibiotiques (Dowling, 2006).

2.2.3.1. Macrolides et Lincosamides

Les macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS) sont des antibiotiques bactériostatiques vis-à-vis des *S. aureus*. La résistance aux MLS peut être constitutive, résistance à toutes les molécules du groupe, ou inducible, résistance aux macrolides uniquement (Giguère, 2006 ; Fluit *et al.*, 2001 ; Werckenthin, 2001). Ces antibiotiques sont utilisés le plus souvent comme traitement alternatif aux pénicillines chez les animaux allergiques à celles-ci, cette molécule peut être utilisée par voie intraveineuse ou orale et atteindre toutes les structures de la peau contrairement aux β -lactamines (De Oliveira *et al.*, 2000). L'apparition des résistances à ces antibiotiques constitue actuellement l'une des préoccupations majeures du monde scientifique (James *et al.*, 2005).

2.2.3.2. Érythromycine et la clindamycine

2.2.3.2.1. Chez les bovins

Chez les bovins, il a été enregistré un taux de résistance de 51% (126/249) à l'érythromycine et de 67% (167/249) à la clindamycine. Pratiquement toutes les études rapportées à travers le monde en rapport avec le *Staphylococcus aureus* chez le bovin concernent les mammites. Plusieurs travaux sur la résistance de ce germe aux antibiotiques dont ceux réalisés par Werckenthin *et al.*, en 2001 rapportent de très faibles taux de résistance, comparativement aux résultats de notre étude. Au Canada, seules 2,8% des souches étaient résistantes à la clindamycine, constat expliqué par le fait que cet antibiotique n'y est pas largement utilisé. L'étude réalisée entre 1996 et 1998 en Argentine sur 206 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mammites cliniques et sub-cliniques, a noté que 24 souches (11,6 %) étaient résistantes à l'érythromycine. Un même constat a été établi lors d'autres études antérieures menées en Allemagne entre 1992 et 1999, avec des taux respectifs de 3 % (4 /133), 2% (3/133) et 5% (4/133) pour l'érythromycine, la

lincomycine/clindamycine et la streptomycine (Erskine *et al.*, 2002). Au Brésil, sur 66 souches, les mêmes auteurs rapportent des taux de résistance de 4,5% (3/66) et 12% (8/66) respectivement pour la linco-/clindamycine et streptomycine.

Toutes ces données confirment la conclusion de l'Observatoire National de l'Épidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) en 2009, qui note qu'entre 1993 et 2009, la proportion des souches de SARM sensibles à l'érythromycine est passée de 7,6 à 58,2 %. De la même manière une étude sur la contamination du lait dans l'ouest Algérien rapportent des taux bas de résistance à l'érythromycine de l'ordre de 5% (Chaalal *et al.*, 2018). Dans le cadre du portage chez l'homme, des études réalisées en Algérie rapportent des taux plus importants 46,2% (Touaitia *et al.*, 2015) et 64% (Alioua, 2015).

Dans certains pays méditerranéens également il a été enregistré des taux relativement élevés, tels qu'en Libye (47 %) (Buzaid *et al.*, 2011), en Tunisie (49%) (Mastouri., 2006) et au Maroc (89,8%). Enfin, des taux beaucoup plus importants atteignant 93,9% ont été enregistrés aux Etats-Unis (Soraa et al. 2012). Toutes ces précédentes observations viennent corroborer les résultats de notre étude, qui découleraient probablement d'une forte exposition des bovins à cette famille d'antibiotique. Le même constat a été avancé dans le cadre du portage de ce germe, en médecine humaine en Algérie par Alioua en 2015, qui l'a expliqué comme conséquence au traitement des infections à staphylocoques essentiellement à base de ces antibiotiques, avec leur disponibilité sur le marché algérien et leur accessibilité sans prescription médicale.

2.2.3.2.2 : Chez la volaille

Les taux de résistances à cette famille d'antibiotiques enregistrées chez la volaille sont compris entre 45% et 93%. Ce taux est de 54% (426/786) pour l'érythromycine et 70% (550/786) pour la clindamycine chez les poules pondeuses. Il est de 45% (357/789) pour l'érythromycine et 72% (568/789) pour la clindamycine chez le poulet de chair. Chez la dinde ces taux sont de 93% (122/133) pour l'érythromycine et de 69% (92/133) pour la clindamycine.

Toutes ces données confirment que cette famille d'antibiotique est très utilisée chez la volaille notamment dans le cadre d'infections surtout respiratoires. Des résistances importantes mais légèrement inférieures aux nôtres ont été avancés par Ashraf et son équipe en Égypte en 2016 avec un taux de 41.5%. En Allemagne, en 2012, Richter et ses collaborateurs, ont avancé un pourcentage très élevé évalué à 83,2% de souches résistantes à l'érythromycine et à la clindamycine.

2.2.4. Tétracyclines

Les tétracyclines incluent la chlortétracycline, l'oxytétracycline, la tétracycline, la doxycycline et la minocycline. Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre d'action utilisés en médecine vétérinaire, plus particulièrement chez les animaux de production et la volaille. Pendant longtemps, les tétracyclines ont été utilisées abondamment comme promoteurs de croissance (avant leur interdiction en Algérie en 2006) sous forme de doses sous optimales qui ont favorisé le développement de résistances plus particulièrement chez les bactéries à Gram négatif. Elles sont également utilisées en prophylaxie dans les grandes populations animales (Giguère, 2006). La résistance est souvent de type plasmidique et interfère avec le transport actif de la molécule de tétracycline à travers la membrane interne de la cellule, sachant qu'en pratique de laboratoire et selon les recommandations du CLSI, 2016, les organismes sensibles à la tétracycline sont aussi considérés comme sensibles aux autres molécules de cette famille, cependant certains organismes classés comme intermédiaires ou résistants à la tétracycline peuvent être sensibles à la doxycycline ou à la minocycline ou aux deux. Notons aussi que les SARM présentent presque systématiquement une résistance associée à la tétracycline conférée par le gène *tetM* plus fréquent chez les *S. aureus* ou le gène *tetK* (Chopra *et al.*, 2001).

2.2.4.1. Bovins

Bien que les tétracyclines soient les antibiotiques le plus largement utilisés chez les bovins, il a été enregistré un taux de résistance relativement faible 26% (66/255) par rapport aux autres espèces étudiées. Toutes les études sur *Staphylococcus* réalisées chez les bovins concernent le lait et les mammites ; elles rapportent toutes des valeurs inférieures à celle que nous avons enregistrée. Ainsi, Sudhanthirakodi *et al.*, (2015) et Hamid *et al.* (2017) ont noté des valeurs respectives de 13,95% et 16,6%. D'autres auteurs tels que Sabour *et al.*, (2004) ont enregistré des valeurs beaucoup plus faibles 1,9%.

En France, le réseau d'épidémiologie-surveillance de l'antibio-résistance des bactéries pathogènes animales (RESAPATH) déclare que dans la filière bovine, dans le cadre du portage, les souches de *S. aureus* restent très rares (moins de 1 %) présentant une unique résistance associée aux tétracyclines.

Nos résultats nous permettent de conclure que les tétracyclines ont une relative efficacité vis-à-vis de ce germe.

Nous concluons à l'efficacité des tétracyclines vis-à-vis de ce germe, malgré sa large utilisation. Le bovin présenterait-il alors des mécanismes de défenses au niveau de son appareil respiratoire supérieur encore inconnu pour lutter contre la colonisation importante de ce germe ?

2.2.4.2. Volaille

Dans cette étude, les résultats enregistrés chez la volaille sont élevés. Il a été noté des taux de résistances respectifs de 86% (114/133), 74% (581/786) et 44% (348/783), chez la dinde, le poulet de chair et les poules pondeuses.

Ces résultats alarmants sont certainement dus à l'utilisation irréfléchie de cette famille d'antibiotique, principalement dans les infections respiratoires en dehors des facteurs de croissance après leur interdiction en 2006. Les risques pour le consommateur sont en premier lieu, celui du transfert de ces résistances vers l'homme, et en second lieu, la présence des résidus de cette molécule dans la viande de volaille, source non négligeable de protéines pour la population algérienne. Titouche en 2014 a rapporté dans son étude un taux de 75,81% de présence de résidus de tétracyclines dans la viande de volaille.

Il peut sans doute être admis qu'une résistance associée aux tétracyclines est très classique ; en effet, dans toutes les études effectuées sur ce germe au niveau de beaucoup de pays à travers le monde, la co-résistance aux tétracyclines est observée. En effet, en Belgique notamment, des souches de *Staphylococcus aureus* ont été identifiées à nouveau marquée par des forts taux de résistance vis-à-vis des tétracyclines (Nemati *et al.*, 2008 ; Persoons *et al.*, 2009). Cette résistance est surtout observée chez le poulet de chair plutôt que chez la poule pondeuse, résultat qui corrobore celui de notre étude. D'autres pays européens comme les Pays-Bas ou encore le Danemark, observent une co-résistance aux tétracyclines (De Neeling *et al.*, 2007 ; Denis *et al.*, 2009; Guardabassi *et al.*, 2007). Un constat grave a été déduit suite à une étude menée entre 2007 et 2009, dans laquelle 921 souches de *Staphylococcus aureus* ont été isolées respectivement chez des porcs et leurs éleveurs au niveau de 47 fermes. 100 % des isolats isolés étaient résistantes à l'oxytétracycline (Cuny *et al.* 2009, van Loo *et al.* 2007 ; Denis *et al.* 2009) expliquant le risque de transfert de cette résistance de l'animal vers l'homme alors que nous savons que chez celui-ci, les cyclines sont principalement utilisées pour traiter les infections broncho-pulmonaires, la brucellose, ainsi que pour le traitement de fond en dermatologie.

2.2.5. Association triméthoprine/sulfaméthoxazole

Les antimicrobiens de la classe des sulphonamides quand ils sont utilisés seuls comme le sulfaméthoxazole, ne sont pas très efficaces, car une grande majorité des bactéries en sont résistantes. Toutefois, la combinaison du triméthoprine et du sulfaméthoxazole produit une synergie et prévient le développement rapide de la résistance chez les bactéries. Cette combinaison possède un spectre d'action large, mais inactif en présence de tissus nécrotiques (Singleton, 2005 ; Prescott, 2006). Ils sont peu utilisés actuellement en raison de leurs nombreux effets secondaires et suite à la fréquence des souches résistantes.

Notre étude rapporte des taux assez faibles 0% pour les bovins et la dinde de chair, 21% et 28% respectivement pour les poules pondeuses et du poulet de chair.

2.2.5.1. Bovins

Le résultat de la résistance à cette association est nul (0/252). En pratique vétérinaire, l'association triméthoprine/sulfaméthoxazole est utilisée dans le traitement des infections systémiques comme dans le cas des mammites aiguës à *S. aureus* (Prescott, 2006). De très faibles taux de résistances ont été signalés jusque-là. L'étude de Schlegelova *et al.* en 2001 sur 151 souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir des mammites, la résistance à cette combinaison d'antibiotiques était nulle. Un résultat similaire a été rapporté par Shitandi en 2004 dans une étude de comparaison entre lait en provenance de petites et de grandes exploitations au Kenya, avec un pourcentage de résistance de 5% et 6% respectivement pour les grandes et les petites exploitations. Cet auteur a insisté dans son étude sur la présence de résidus de ces antibiotiques dans le lait et l'impact sur le transfert de résistance vers l'homme. Ce résultat est confirmé également par Titouche dans son étude en 2014 dans laquelle il note la présence de 36,29% de résidus de sulfamides dans le lait de la région centre de l'Algérie. Rappelons que nous ne disposons pas de résultats sur notre problématique de portage chez le bovin afin de pouvoir mieux focaliser les points critiques et comparer les données de résistance. Tous les résultats dont nous disposons concernent l'étude de *Staphylococcus aureus* en tant que pathogène responsable de mammites. Nous pouvons relier ce résultat nul de taux de résistance au fait que les éleveurs ainsi que leur encadrement technique préfèrent utiliser des antibiotiques de dernière génération pour avoir les meilleurs résultats.

2.2.5.2. Chez la volaille

Les résultats que nous avons enregistrés sont de 21% (167/777) chez les poules pondeuses, 29% (39/133) chez la dinde de chair et 28% (218/780) chez les poulets de chair. Ces taux presque similaires confirment les résultats des études de Nemati *et al.* (2008) et Persoons *et al.* (2009) qui notent que les souches de *Staphylococcus aureus* identifiées en Belgique présentaient une résistance rare à cette combinaison. Dans le cadre d'études comparatives, trois souches de SARM, isolées en 2003, 2004 et 2006, à partir des bovins appartenaient toutes au groupe clonal ST8 décrit en premier lieu chez l'homme, puis découvert chez les animaux, et présentaient plusieurs résistances associées, en particulier à l'association sulfamides/triméthoprine (Kadlec *et al.*, 2009 ; MADEC *et al.*, 2010). D'où l'intérêt de mettre l'accent sur l'éventuelle circulation de ce germe avec son arsenal de résistances entre les espèces animales, vers l'homme et vice versa.

2.2.6. Fluoroquinolones

En médecine vétérinaire les fluoroquinolones sont indiqués pour le traitement des affections respiratoires, digestives dans le cadre de septicémie et des mammites chez les bovins. Nous avons testé l'enrofloxacin, dont l'interprétation est croisée entre l'ensemble des fluoroquinolones (Walker *et al.*, 2006).

Chez les *S. aureus* résistants aux fluoroquinolones, plusieurs mutations chromosomiques au niveau des gènes codant pour la topoisomérase IV et l'ADN gyrase ont été identifiées. Ces mutations entraînent une diminution de l'affinité des fluoroquinolones pour les sites cibles (Fluit *et al.*, 2001 ; Lowy, 2003). Contrairement à la situation chez les humains, très peu de choses sont connues sur les séquences des gènes et les mutations chez les staphylocoques d'origine animale. Selon Moritz en 2001, l'enrofloxacin est largement utilisée en aviculture dans certains pays, et de nombreux scientifiques estiment, à l'appui d'un nombre croissant de données, que l'émergence d'espèces de *Staphylococcus aureus* résistantes aux quinolones traduit l'utilisation de ces produits en médecine vétérinaire. Le SARM est résistant à toutes les β -lactamines souvent résistant aux aminosides, macrolides et fluoroquinolones (BMR). Actuellement, ce germe a développé une résistance croisée entre les diverses fluoroquinolones. D'après les différents réseaux d'ONERBA, l'incidence des souches de SARM sensibles aux fluoroquinolones est très faible, en effet, elle ne dépassait pas les 12 % en 2010. En moyenne, elle se retrouve aux environs de 11 %. Il faut préciser qu'en 1994, elle n'était que de 4,5 %.

2.2.6.1. Bovins

Chez les bovins, le taux de résistance à l'enrofloxacin enregistré au cours de notre étude est de 87% (225/258). Ce résultat est en contradiction avec celui enregistré par l'étude de Chaalal *et al.*, en 2018, qui rapportent un taux de 0% sur des *Staphylococcus aureus* isolés à partir de lait.

Le réseau d'épidémio-surveillance de l'antibio-résistance des bactéries pathogènes animales en France a publié en 2014 de très faibles taux de résistance de ce germe à cette classe d'antibiotiques allant de 2 à 4% suite à une large campagne pour la réduction de l'utilisation de cette catégorie de médicament en médecine vétérinaire. Les quinolones ont été classées comme antibiotiques critiques car identifiées comme particulièrement générateurs de résistances. En effet, notre souci majeur à travers ce résultat inquiétant et dans le cadre du portage sur un effectif assez représentatif de bovins dans la région d'étude est d'informer la population et les scientifiques des dangers auxquels sont exposés les individus vivant en confinement avec cette espèce.

2.2.6.2. Volaille

Les taux de résistances enregistrés pour cette espèce avec ses différents types de production variaient de 21% (167/783) pour les poules pondeuses à 45% (356/786) pour les poulets de chair. Le plus fort taux de résistance a été enregistré pour la dinde avec 89% (118/133). Ceci pourrait s'expliquer par l'utilisation abusive de ces molécules, car l'une des pratiques les plus courantes dans nos élevages en Algérie serait l'utilisation surtout des fluoroquinolones lors de la mise en place de chaque nouvelle bande appliquée par l'éleveur lui-même dans la plupart des cas sans avis de son vétérinaire consultant.

Nos résultats contredisent ceux publiés par Ashraf *et al*, en 2016 en Égypte, qui ont noté 41 souches de *Staphylococcus aureus* Methicillino-Résistants isolées du poulet de chair, toutes sensibles à l'enrofloxacin ; la norfloxacin et la ciprofloxacin. Cependant nos résultats corroborent ceux publiés en Europe, suite à des études réalisées sur d'élevages de dindes notamment en France avec 32,4% de résistance à la ciprofloxacin (Argudín *et al*. 2013) et en Allemagne avec 31,2% de résistance aux fluoroquinolones (Richter *et al*. 2012).

L'étude effectuée en Bretagne entre 2008 et 2012, sur trente-quatre isolats isolés à partir d'élevages de dindes a enregistré un taux de résistance de 32,4% à la ciprofloxacin (Argudín *et al*. 2013). Une de ces souches présentait des résistances vis à vis de la streptomycine, la clindamycine, la ciprofloxacin et la tétracycline et possédait des gènes importants pour la pathogénicité chez l'homme. L'étude menée par Richter *et al*. en 2012 en Allemagne a montré une forte prévalence de portage de SARM dans les troupeaux de dindes avec une résistance de 31,2% aux fluoroquinolones. Par contre, l'étude menée par Ashraf *et al*, en 2016 en Égypte sur de 41 souches de *Staphylococcus aureus* Methicillino-Résistants isolées du poulet de chair a déterminé que toutes les souches étaient sensibles à l'enrofloxacin ; la norfloxacin et la ciprofloxacin.

2.2.6. Glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) :

La plupart des bactéries à Gram positif y compris les *Staphylococcus aureus* qu'ils soient sensibles ou résistantes à la méticilline sont sensibles aux glycopeptides avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) généralement égales à 4µg/ml. Les glycopeptides sont des antibiotiques de réserve, « de dernier recours », sans autre alternative thérapeutique disponible, utilisés exclusivement en milieu hospitalier dans le cas de maladies graves, des infections dues à des bactéries multi résistantes, mais ayant conservé une sensibilité pour ces molécules. Ce sont

des antibiotiques ayant une action spécifique qui nécessitent une surveillance particulière. Ils ne peuvent généralement pas être prescrits en première intention sauf dans certains cas précis.

Les souches de *S. aureus* ne répondant pas au traitement par la vancomycine ont une sensibilité diminuée à cet antibiotique. Ainsi, selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM), une concentration minimale inhibitrice (CMI) de vancomycine comprise entre 4 et 16 µg/ml définit une souche de sensibilité diminuée ou intermédiaire (Dumitrescu *et al.*, 2010).

D'après le réseau de l'observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques en France, en 2009 (ONERBA, 2009), les souches SARM sont sensibles à plus de 99,6% aux deux molécules antibiotiques de la famille des glycopeptides. Cette résistance est donc rare et son émergence est étroitement liée à des pics épidémiques impliquant les SARM du clone «ibérique». Dans le domaine médical en 2012, au CHU d'Angers (France), le pourcentage de sensibilité était de 100%. L'émergence d'un niveau élevé de résistance à la mupirocine (médicament à usage local efficace pour limiter la colonisation des sujets porteurs) et d'une sensibilité diminuée aux glycopeptides (utilisés comme traitement d'attaque dans les infections à SARM) est inquiétante (Heym *et al.*, 2002, Wagenvoort, 2000). Ces types de résistance ont récemment fait l'objet d'articles dans plusieurs pays dont la France, le Royaume-Uni et la Belgique, et risquent d'être sous-reconnues du fait du manque de sensibilité des méthodes de détection utilisées en laboratoire. Notre étude rapporte une absence totale de résistance à la vancomycine pour toutes les espèces animales sur lesquelles les prélèvements ont été effectués.

2.2.6.1. Bovins

Dans cette étude, il a été enregistré un taux nul (0/249) de résistance à la vancomycine. Ce résultat est très rassurant si nous considérons qu'avant son interdiction en 2006, l'avoparcine, antibiotique ayant une structure proche de la vancomycine a été pendant longtemps largement utilisé dans les aliments pour les volailles, les veaux, les bovins à l'engrais et les agneaux, en raison de ses effets favorables sur leur croissance.

2.2.6.2. Volaille

Tous les isolats isolés chez tous les types de production étaient sensibles à cet antibiotique. Ces résultats corroborent ceux de Hermans *et al.* en 2007 suite à leur étude sur le portage du *Staphylococcus aureus* methicillino-résistant chez les poules pondeuses et chez le poulet de chair et ceux d'Argudín *et al.* en 2013, qui ont testé 34 souches toutes sensibles à vancomycine. Madec *et al.* ; en 2010 notent que la sensibilité des souches de SARM est habituelle pour les glycopeptides

(vancomycine, teicoplanine). Par contre, en Algérie, en médecine humaine, nous assistons ces dernières années à l'augmentation des SARM dans les hôpitaux, favorisant ainsi l'intégration des glycopeptides dans les schémas thérapeutiques, ce qui a engendré la détection en 2011 de 3 souches de SARM résistantes à la vancomycine à Tlemcen, avec des CMI de 16 µg/ml, 64 µg/ml, et 128 µg/ml), appuyés par la détection du gène *vanA* (Rebiahi ;2011). De même en Tunisie, l'étude réalisée par Mastouri *et al.* en 2006 a permis de noter une sensibilité diminuée à la vancomycine sur 96 souches de SARM.

Nous devons nous inspirer des expériences des autres pays afin de réduire l'exposition de nos élevages aux antibiotiques afin de réduire le phénomène de résistance et ainsi préserver la santé humaine. En effet, à travers le monde, à partir de 2005, grâce aux différentes actions menées dans les filières, l'exposition aux antibiotiques a diminué de 48 %. Entre 2015 et 2016, cette exposition aux céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération et aux fluoroquinolones a diminué respectivement de 21 % et de 22 %. (ANSES, 2016).

2.2.7. Profil de multirésistance des *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques

On parle de résistance croisée quand elle résulte d'un seul mécanisme biochimique et concerne des antibiotiques appartenant à la même famille (CA-SFM, 2004). La Co-résistance par contre, est liée à plusieurs mécanismes, plusieurs gènes de résistance sont alors impliqués et concerne des antibiotiques appartenant à différentes familles.

2.2.7.1. Bovins

2.2.7.1.1. Profil de résistance des SASM aux antibiotiques chez les bovins

Bien que l'ensemble des souches SASM isolées à partir de toutes les espèces étudiées, étaient sensibles à l'oxacilline, elles présentaient cependant des résistances à beaucoup d'autres antibiotiques. Ainsi, Rubin *et al.* en 1999 déclarent que le pouvoir pathogène des SARM est similaire à celui des SASM.

Nos résultats nous ont permis d'obtenir 11 profils de résistance différents détectés chez les SASM dont trois souches présentaient une résistance à 5 antibiotiques avec une co-résistance à quatre familles d'antibiotique. 41 souches ne présentaient de résistance qu'à un seul antibiotique : la pénicilline (38) et l'enrofloxacin (3).

2.2.7.1.2. Profil de résistance des SARM aux antibiotiques chez les bovins

L'étude de la résistance des SARM a révélé l'existence de 8 profils différents, dont la résistance croisée allait de deux à quatre familles d'antibiotiques. 15 souches présentaient le profil [OXA-PEN - FOX-TCY], 10 souches le profil [OXA- PEN- FOX-ERY], 6 souches le profil [OXA- PEN- FOX-ENR]. 8 et 4 souches présentaient respectivement une résistance croisée à 3 familles

d'antibiotiques soit [OXA- PEN – FOX- NEO-KAN-TCY] et [OXA- PEN- FOX-ERY-ENR]. Deux souches présentaient une résistance croisée à 4 familles d'antibiotiques soit [OXA- PEN – FOX- NEO -KAN-TCY-ENR], d'où l'intérêt d'utiliser la résistance à la méthicilline comme marqueur de multirésistance car, nos résultats montrent que les souches de SARM sont très souvent résistantes à plus de trois classes d'antibiotiques (Grohs en 2009). Madec *et al.* en 2010 ont décrit le *S. aureus* comme un germe initialement sensible à la quasi-totalité des antibiotiques habituellement actifs vis-à-vis des bactéries à Gram positif, s'est rapidement et efficacement adapté aux introductions successives de nouvelles molécules en pratique médicale courante, et de nombreux mécanismes de résistance sous-tendent cette adaptation, telles que des mutations ponctuelles ou l'acquisition de séquences exogènes d'ADN, intégrées ou non au chromosome, de type transposon, intégrons et gènes cassette. Ces mêmes auteurs ont conclu, après comparaison de plusieurs enquêtes européennes, à la transmission des souches de SARM entre animaux, probablement lors de certaines étapes de regroupement favorisant les contacts et conduisant à des résistances associées quasi constantes à certains antibiotiques, comme les tétracyclines, les fluoroquinolones et les macrolides.

2.2.7.1.3. Comparaison des profils de résistances des SASM et SARM chez les bovins

Toutes les souches SARM isolées à partir de bovins étaient multirésistantes, phénomène constaté à un degré moindre chez les SASM. Nous confirmons ainsi la présence chez les SARM des associations de résistance à de nombreux antibiotiques de la famille des bêtalactamines avec les tétracyclines dans la plupart des profils, suivi de l'enrofloxacin, puis des aminoglycosides. Ce résultat est confirmé par l'article d'Oliveira *et al.* en 2002 dans lequel ils déclarent qu'à partir des années soixante les souches de SARM présentaient des résistances à des antibiotiques de différentes classes surtout les tétracyclines et les macrolides.

Par la suite, Witte *et al.* en 2007 et Kuroda *et al.* en 2001 déclarent que ces souches de SARM ont acquis une résistance aux aminoglycosides et que dans toutes les régions du monde, les phénotypes de résistance des SARM ont évolué depuis 1995. Néanmoins les souches de SASM isolées à partir de cette espèce présentaient, en dehors d'une résistance habituelle à la pénicilline constatée chez 38 souches, des profils regroupant l'association pénicilline-tétracyclines, pénicilline-érythromycine et pénicilline-aminoglycosides-tétracyclines-quinolones.

Un fait important qu'il faudrait retenir de ces profils de résistances chez les souches de *Staphylococcus aureus* méthicillino sensibles ou résistantes, est l'absence d'association de résistance aux sulfatriméthoprime, ce qui pourrait conclure à un phénotype spécifique à l'espèce

bovine, qu'il faudrait confirmer par typage moléculaire et rechercher ainsi son appartenance clonale.

2.2.7.1.2. Chez les poules pondeuses

2.2.7.1.2.1. Profil de résistance des SASM aux antibiotiques chez les poules pondeuses

21 profils de résistance différents ont été recensés chez les souches SASM isolées des poules pondeuses, parmi lesquelles, 14 souches présentaient une résistance uniquement aux fluoroquinolones. Les autorités compétentes doivent se pencher sur cette observation pour prendre rapidement des mesures afin de minimiser leur usage. Parmi les 20 profils restants, 13 montraient une co-résistance entre cotrimoxazole, tétracyclines ; quinolones et macrolides et 7 souches entre aminoglycosides, cotrimoxazole, tétracyclines et macrolides. Nous pouvons conclure que malgré l'absence du gène *mec A*, ces souches sont considérées comme des bactéries hautement résistantes, dont le risque de dissémination doit être pris en considération. Soulignons aussi, l'important taux de résistance associée entre pénicilline et macrolides (133 souches), alors que ces derniers constituent le traitement alternatif lors de résistance à la pénicilline.

2.2.7.1.2.2. Profil de résistance des SARM aux antibiotiques chez les poules pondeuses

24 profils de résistance ont été obtenus lors de notre étude pour les SARM. Toutes les souches présentaient une multirésistance. 14 souches présentaient une co-résistance à 5 familles d'antibiotiques et une résistance croisée à 4 antibiotiques au sein des β -lactamines dont le profil est le suivant [*OXA -PEN - AMC -FOX -NEO- SXT -TCY -ENR*]. 7 autres souches présentaient une co-résistance à 5 familles d'antibiotiques et une résistance croisée à 4 antibiotiques au sein des β -lactamines et à deux antibiotiques au sein des aminoglycosides dont la Gentamycine et la Néomycine soit [*OXA -PEN -AMC -FOX- NEO -GEN -SXT -TCY -ENR*]. Nous concluons que la pénicilline devait souvent être associée en plus des autres β -lactamines à toutes les familles d'antibiotiques.

2.2.7.1.2.3. Comparaison des profils de résistances des SASM et SARM chez les poules pondeuses

De la même manière que pour les bovins, nous constatons que les SARM présentaient des multirésistances avec des profils regroupant jusqu'à neuf antibiotiques [*OXA -PEN -AMC -FOX- NEO -GEN -SXT -TCY -ENR*]. 148 souches présentaient une association de résistance entre trois antibiotiques au sein des β -Lactamines et aux macrolides. Beaucoup de combinaisons de profils de résistance ont été remarqués chez ce type de production, particulièrement chez les SARM.

Ce qui expliquerait l'importante exposition de ce type de production aux antibiotiques, ainsi le *Staphylococcus aureus* a su développer au fil du temps différents mécanismes conjuguant l'inhibition de la synthèse protéique, la synthèse des enzymes, les modifications de la cible, les mécanismes d'efflux et l'acquisition de différents gènes de résistance ce qui compliquerait l'intervention pour son éradication si nous ne disposons pas d'outils de détection efficaces.

2.2.7.1.3. Chez le poulet de chair

2.2.7.1.3.1. Profil de résistance des SASM aux antibiotiques chez le poulet de chair

17 profils de résistances ont été définis chez les souches SASM isolées des poulets de chair. La résistance à la pénicilline était ubiquitaire, la co-résistance était marquée avec 100 souches pour les macrolides, avec 55 souches pour les tétracyclines et les macrolides, 14 souches présentaient une co-résistance entre macrolides, quinolones, tétracyclines, cotrimoxazole et β -lactamines. Ces SASM peuvent être aussi considérées comme hautement résistantes et potentiellement dangereuses pour l'environnement et surtout la santé humaine.

2.2.7.1.3.2. Profil de résistance des SARM aux antibiotiques chez le poulet de chair

20 profils de résistance ont été obtenus lors de notre étude pour les SARM isolées à partir du poulet de chair. Toutes les souches présentaient une multirésistance. Le plus grand nombre était marqué par la co-résistance des β -lactamines–Tétracyclines avec 72 souches ; 8 souches présentaient une résistance à 9 antibiotiques appartenant à 5 familles d'antibiotiques différentes. 8 souches présentaient une résistance croisée à 4 antibiotiques au sein des β -lactamines et une co-résistance à 5 familles d'antibiotiques dont le profil est le suivant [OXA-PEN-AMC-FOX-NEO-GEN-SXT-TCY-ENR]. 144 souches présentaient une résistance croisée à 4 antibiotiques au sein des β -lactamines.

7 autres souches présentaient une co-résistance à 5 familles d'antibiotiques et une résistance croisée à 3 antibiotiques au sein des β -lactamines soit [OXA -PEN-FOX -NEO-SXT -TCY-ERY]. Ces résultats nous permettent de conclure tout comme pour les poules pondeuses, que la pénicilline était associée à toutes les familles d'antibiotiques pour 322 souches. Beaucoup de profils sont partagés entre les poules pondeuses et le poulet de chair notamment chez les SASM [PEN -ERY ; TCY- ENR-ERY ; PEN- SXT-ERY] ; et les SARM [OXA-PEN-AMC-FOX-TCY] ; [OXA-PEN-AMC-FOX-NEO-GEN-SXT-TCY-ENR], [OXA-PEN-AMC-FOX-NEO-SXT-TCY-ENR] ; [OXA-PEN-AMC-FOX-NEO-TCY] ; ce qui expliquerait certainement la libre circulation de ces différentes souches avec ces différents profils entre ces deux types de production. Leur typage serait intéressant pour déterminer à quel(s) clone(s) ils appartiennent.

2.2.7.1.3.3. Comparaison des profils de résistances des SASM et SARM chez le poulet de chair

Dans ce cas aussi, nous remarquons que la multirésistance était aussi, comme pour les bovins et la poule pondeuse, beaucoup plus marquée chez les SARM que chez les SASM. Cette multirésistance a été notée pour neuf antibiotiques chez les SARM, alors que pour les SASM, la multirésistance la plus importante a été observée pour cinq antibiotiques. D'une manière générale, toutes les souches SARM et SASM isolées à partir du poulet de chair présentaient un phénotype de résistance plus diversifié surtout chez les SARM indiquant la probable forte exposition de ce type de production à toutes les familles d'antibiotiques qui se trouvent sur le terrain.

2.2.7.1.3. Chez la dinde de chair

2.2.7.1. 4.1.Profil de résistance des SASM aux antibiotiques chez la dinde de chair

Aucune souche SARM n'a été détectée chez cette espèce, néanmoins 12 profils de résistances étaient définis chez les souches SASM isolées de la dinde de chair. La résistance à la pénicilline était présente pour 41 souches. La co-résistance était marquée chez 10 souches pour les macrolides-tétracyclines-quinolones-aminosides soit le profil [NEO- ENR-TCY-ERY-CLI]. 25 souches avaient une résistance croisée pour les macrolides [CLI- ERY]. 1 seule souche présentait une résistance unique à la pénicilline. Remarquons pour cette espèce la présence de la clindamycine dans 5 profils différents chez 48 souches de *Staphylococcus* methicillino-sensibles et l'apparition du cotrimoxazole dans un seul profil associé à la néomycine [NEO-SXT].

D'une manière générale pour toutes les espèces étudiées, les souches de *Staphylococcus aureus* SARM et SASM, présentaient une très importante hétérogénéité dans les profils de résistance qui étaient partagés quelquefois entre trois espèces et même toutes les espèces étudiées. Ce expliquerait certainement leur circulation entre elles et pourquoi pas même chez l'homme. La seule spécificité est la présence d'une multirésistance associée avec le cotrimoxazole (SXT) chez les bovins et dont la présence n'était retrouvée chez aucune autre espèce étudiée sauf chez la dinde où elle est apparue dans un seul profil, et la présence de la clindamycine chez la dinde alors qu'elle n'est apparue dans aucun autre profil chez les autres espèces étudiées.

Ceci pourrait s'expliquer par l'importante exposition des bovins au cotrimoxazole et la dinde à la clindamycine ou par l'existence de certains profils liés à l'espèce.

3. Caractéristiques moléculaires des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de différentes espèces animales

En matière de caractérisation moléculaire des souches de *Staphylococcus aureus*, l'étude des clones dans le but d'évaluer les prédominants en Algérie n'a été réalisée que pour le domaine

médical. Ainsi, Antri *et al.* en 2011 et Djahmi *et al.* en 2013 ont démontré que ce sont des clones européens qui circulent en Algérie avec un pourcentage allant de 13,7% à 75 %.

3.1. Phénotype de résistance et profil pathogénique des souches d'origine bovine

La confirmation de la présence du gène *mecA* chez les souches d'origine bovine avec des associations de résistance marquées pour les quinolones, les aminoglycosides, les tétracyclines et le cotrimoxazole, ainsi que la présence du gène codant la toxine Panton Valentine sont des observations importantes à considérer, surtout si on veut la comparer aux profils des autres espèces animales qui ont fait l'objet de notre étude. En effet, beaucoup de similitudes ont été détectées, comme la co-résistance à quatre familles d'antibiotiques et la résistance croisée au sein de la famille des β -lactamines à trois antibiotiques [OXA-PEN-FOX-NEO-KAN-TCY-ENR] avec la présence du gène *mecA* et le gène qui code pour la LPV.

La souche N°11 isolée en 2012 présente quant à elle le profil [OXA-PEN-FOX-NEO-SXT-TCY] avec le gène *mecA* et la PVL. La souche N°12 isolée en 2013 avec le profil suivant [OXA-PEN-AMC-FOX-TCY] est *mecA* positif et PLV positif, et la souche N°1 isolée en 2014 ayant un profil [OXA-PEN-FOX-NEO-KAN-TCY] et *mecA* positif et PLV positif. Les wilayas concernées par cette étude pour cette espèce sont Bouira, Boumerdès et Bejaia. Ces profils bien que similaires entre eux, ne présentaient ni de spécificité entre les wilayas ni entre les années, mais étaient déjà prédits par la littérature suite à différentes études à travers le monde, pas spécialement pour cette espèce, mais pour toutes les autres espèces animales et l'homme. Plusieurs auteurs (Lee, 2003 ; Velasco *et al.* 2005) expliquaient que si l'on confirme la présence du gène *mecA* chez un staphylocoque, celui-ci serait certainement résistant à plusieurs familles d'antibiotiques.

En revanche, Jouy *et al.* en 2008, rapportent que les premiers SARM décrits chez le porc, présentaient quasi constamment des résistances associées, notamment aux tétracyclines, mais globalement ils étaient peu multi-résistants aux macrolides et aux fluoroquinolones. Plus tard s'y est ajoutée la co-résistance à d'autres familles d'antibiotiques, en particulier les macrolides et apparentés (lincosamides), moins souvent les aminosides (kanamycine, gentamicine, tobramycine), voire le triméthoprim mais plus rarement le cotrimoxazole (De Neeling *et al.*, 2007; Denis *et al.*, 2009 ; Guardabassi *et al.*, 2007) confirmant ainsi nos résultats.

La présence du gène de la toxine Panton Valentine dans toutes les souches constitue un danger pour la population humaine en Algérie qui selon les études de Antri *et al.* en 2010, rapportent de fort taux de SARM-PVL+ allant de 50% aussi bien dans la communauté qu'en milieu hospitalier.

Les SARM hospitaliers PVL+ étaient multi résistants aux antibiotiques compliquant leur approche thérapeutique.

Bittar *et al.* en 2009 , expliquaient les sérieuses complications dues à la présence de la toxine Panton Valentine chez les *S. aureus* communautaires et hospitaliers, et rapportaient l'intérêt d'utiliser des techniques telles que la Maldi-tof pour leur rapide détection. Toujours en Algérie, Bouguessa-Ramdani *et al.* en 2006 ont mis l'accent sur la forte prévalence des souches de *Staphylococcus aureus* isolées entre 2003 et 2004, dont 18 communautaires et 27 hospitalières avec 5 SARM-H, présentant en plus de la leucocidine Panton Valentine, une association de résistance notamment avec les aminoglycosides dont la gentamycine , les tétracyclines , les macrolides , les lincosamines et même les quinolones. Les mêmes auteurs ont ajouté que dans ces cas, le recours à l'utilisation des glycopeptides était indispensable, et ils ont ajouté que toute la communauté locale et surtout médicale doit être informé de l'émergence de ces souches très virulentes.

Notre recherche n'a détecté aucune souche présentant le gène *mecC* (International World Group for *SCCmec* Cassette [IWG-*SCCmec*]) nouveau variant du gène *mecA*. Ce dernier a été décrit pour la première fois dans des prélèvements de mammites bovines au Royaume-Uni et au Danemark (Vandenesh *et al.*, 2009), chez l'homme en France (Barraud *et al.*, 2013), et que l'hypothèse d'une origine bovine des souches de SARM *mecC* est encore retenue et que bon nombre de souches humaines décrites appartiennent à des clones exclusivement bovins (Laurent *et al.*, 2012).

3.2. Phénotype de résistance et profil pathogénique des souches d'origine aviaire : Poulet de chair et Poules pondeuses

De la même façon que pour les bovins, le gène *mecA* a été retrouvé chez toutes les souches d'origine aviaire. Cependant, le gène codant pour la PVL n'a pas été détecté chez deux isolats isolés à partir du poulet de chair appartenant à deux zones géographiques différentes (Bouira et Bejaia) toutes les deux prélevées en 2014. Pour l'ensemble des profils, nous avons remarqué en plus des associations de résistance enregistrées pour les bovins, la résistance au cotrimoxazole, ce qui nous amène à réfléchir au devenir du traitement des infections mineures à *Staphylococcus aureus* PVL positif chez l'homme où le traitement de choix est selon Ramdani-Bouguessa *et al.*, (2006) est le cotrimoxazole.

Ces résultats, suggèrent aussi des transferts horizontaux et une probable dissémination géographique large des différents mécanismes de résistance. L'hypothèse de la transmission des gènes codant pour la leucocidine de Panton-Valentine se fait selon un mode horizontal par le biais

d'un élément génétique mobile est retenue (Prevost *et al.*, 1995, Van Der Vijver *et al.*, 1972 ; Laurent *et al.*, 2012, Marisa *et al.*, 2012).

En Algérie, les travaux se font sous formes de vagues successives dans le domaine médical où les données épidémiologiques concernant ce germe, bien qu'elles soient nombreuses sont néanmoins encore assez partielles. Dans le domaine vétérinaire, nous ne disposons encore d'aucune donnée relative au portage par contre pour les denrées alimentaires d'origine animale, nous assistons de plus en plus à la publication de plusieurs travaux. La caractérisation des souches doit être génétique afin d'ouvrir, à l'instar des autres pays du monde un champ de comparaison en matière de santé animale, notamment chez les espèces vivant en confinement avec l'homme et écarter l'hypothèse de spécificité d'hôte.

En effet, la multiplicité des hôtes animaux possibles dilue cette hypothèse de source unique exclusive. Mais surtout, la question qui reste entière est celle du véritable risque pour l'homme, encore mal identifié, tant sur un plan quantitatif que sur la nature de la voie d'exposition. La caractérisation moléculaire ainsi que les potentiels pathogénique et épidémique de ces souches restent donc à explorer.

Notons qu'il faut insister sur l'obligation d'intégrer à l'analyse de routine une PCR permettant de détecter le gène *mecC*, car si nous utilisons le technique de PCR ciblant le gène *mecA*, sans amplifier le gène *mecC*, les souches phénotypiquement résistantes à la méticilline et porteuses du gène *mecC* peuvent au final, sur la base d'une PCR *mecA* négative, être considérées à tort comme sensibles à la méticilline (Garcia-Alvarez *et al.*, 2011 et Shore *et al.*, 2011).

Dans notre cas, la recherche du gène *mec C* a été effectuée car intégrée systématiquement au laboratoire de l'ANSES par rapport à une standardisation des techniques dans le cadre du suivi épidémiologique de sa diffusion. Ce gène, contrairement aux résultats de notre étude, a été rapporté avec des taux importants notamment, aux USA avec 59 %, en Afrique centrale avec 48,8 % et en Grèce avec 75 % (Dauwalder *et al.*, 2010).

CONCLUSION

La médecine humaine est confrontée depuis ces dernières années à l'émergence et à la dissémination rapide des bactéries multirésistantes (BMR) conduisant à des impasses thérapeutiques, provoquant ainsi une véritable menace pour la médecine humaine et vétérinaire (Messenger *et al.*, 2014). *Staphylococcus aureus*, bactérie commensale parmi les plus fréquentes et pathogène opportuniste de l'homme et des animaux, constitue un problème majeur de santé publique en raison de sa virulence, de son pouvoir épidémique et de sa résistance aux antibiotiques. En effet, ce germe a su développer des résistances à chaque nouvel antibiotique introduit depuis un demi-siècle et par conséquent est devenu un pathogène redoutable. Le secret de son pouvoir d'adaptation a été partiellement percé par le séquençage de son génome effectué par les équipes de Baba et d'Hiramatsu (Kuroda *et al.*, 2001 ; Oliveira *et al.*, 2002). En effet, une partie de son chromosome assure sa maintenance et l'autre partie associe des facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques et grâce aux échanges de matériel génétique avec d'autres espèces bactériennes par des phénomènes de transfert horizontal, il diversifie son génome, provoquant ainsi la diffusion de nouveau clone de SARM. (Bukharie *et al.*, 2001 ; Ito *et al.*, 2003 ; Durand *et al.*, 2006). Le portage de *S. aureus* par les animaux surtout de rente pose un problème majeur de santé publique. En effet, certains animaux sont des réservoirs potentiels de ce germe et par conséquent peuvent être des véhicules de sa transmission aussi bien aux denrées alimentaires qu'à l'homme vivant à leur contact.

L'objectif de notre étude était de déterminer la prévalence du portage nasal de *Staphylococcus aureus* chez certains animaux de basse-cour. Les espèces étudiées sont l'espèce *Gallus gallus* avec deux types de production (Poulets de chair et poules pondeuses), les *Phasianidés* avec la sous famille des *Meleagridinae* (dindes de chair) et les bovins. Les résultats obtenus devraient apporter plus d'éclairage sur le risque de transmission des SARM recombinés vers l'homme au niveau des quelques wilayas ciblées du centre de l'Algérie.

Au terme de notre travail réalisé sur un nombre de prélèvements assez représentatif (32000) de la région concernée (Boumerdès, Bouira, Bejaia et Tizi-Ouzou) pendant six années (2009 à 2014), les résultats obtenus ont révélé des taux de portage nasal de SARM variables d'une espèce à une autre. Ces résultats restent importants vis-à-vis de toutes les données disponibles dans la littérature.

Notre étude nous a permis de constater de forts taux de multiresistance chez toutes les espèces étudiées, avec quelques variations selon les espèces en rapport avec leur exposition aux antibiotiques. Les isolats obtenus ont présenté aussi bien des associations de résistances classiques

notamment aux tétracyclines et aux macrolides/lincosamides qu'aux associations de résistances aux fluoroquinolones à peine rapporté par la littérature et une absence de résistance aux glycopeptides. Des résistances ont également été rapportées chez certaines souches (sulfamides/triméthoprim), dont il conviendra d'affiner la représentativité. Enfin, la plupart des souches (sans distinction d'espèce, ni d'origine, ni de l'année du prélèvement) ayant fait l'objet de l'étude moléculaire étaient virulentes, présentant la toxine PVL et le gène *mecA*. Cette étude consacrée au portage du SARM chez certaines espèces animales en général en confinement avec l'homme, confirme le danger de la présence d'un réservoir animal Livestock-Associated MRSA (LA-MRSA), de sa libre circulation entre les espèces et notamment renforce l'éclairage sur un risque possible de son passage vers l'homme et la forte probabilité d'exposer la santé humaine à ce danger.

Il convient, avant toute chose, de reconnaître et de déplorer la réalité de l'existence de l'hypothèse d'une transmission d'infections humaines dues à des souches de SARM d'origine animale. Au-delà de ce constat, l'analyse du risque doit également prendre en compte la nature des facteurs d'exposition. Et il semble clair, tant au travers des données sur le portage animal que de celles sur la faible prévalence des infections humaines à SARM, que l'exposition professionnelle constitue le principal, sinon le seul facteur de risque de transmission croisée. Ce constat est, de plus, étayé par beaucoup d'études qui montrent que, les personnes en contact, étaient colonisés par un clone de *Staphylococcus aureus* d'une façon transitoire tant qu'ils étaient en contact avec l'hôte principal. Les conclusions à tirer doivent également tenir compte de l'absence de données encore disponibles en Algérie sur les niveaux de prévalence du SARM animal dans les filières animales malgré l'existence de travaux pertinents en médecine humaine.

Ce travail devrait permettre, au fil du temps, de mieux documenter le risque global du SARM animal pour l'homme et surtout dans le cadre du portage. Les données préliminaires sont néanmoins en faveur d'une prévalence relativement importante et donc, d'un risque assez important de transfert vers l'homme.

Nous pensons que le risque de transmission animal-homme doit être sérieusement pris en charge dans le cadre de travaux individuels. Il serait intéressant d'élaborer des directives nationales afin de lancer des enquêtes à grande échelle, se basant sur des indicateurs du terrain dans le but d'avoir une idée sur la prévalence du portage du SARM chez certaines espèces animales à risque, à leur environnement puis étendre ces enquêtes dans un premier lieu à l'homme soumis aux situations de fortes expositions (contexte professionnel).

PERSPECTIVES

1. Nos résultats malgré leur représentativité et leur importance restent préliminaires et doivent être complétés par :

- Une caractérisation moléculaire des souches de SARM
- Une Identification exacte de leur origine et l'exploration de leur potentiel pathogénique et épidémique.
- Une Étude de la spécificité d'hôtes.
- Une comparaison des caractéristiques des souches animales avec les souches humaines
- Mettre en place une surveillance de l'évolution de la résistance du *Staphylococcus* sp. aux glycopeptides
- Outre l'aspect résistance, d'autres aspects surtout toxigéniques en utilisant l'outil moléculaire doivent compléter notre étude ainsi comparer les différentes caractéristiques avec celles de la population humaine.

2. L'investigation du clone de SARM d'origine animale portant le gène *mecC* qui a émergé, et s'est disséminé rapidement ces dernières années aussi bien chez l'animal que chez l'homme mérite d'être menée dans le cadre de recherches dans notre pays.

3.Élargir notre étude aux animaux de compagnie en raison leurs contacts très rapprochés avec l'homme et de la place particulière de la médecine individuelle dont ils bénéficient.

4. Étendre l'étude du portage à d'autres espèces que celles déjà connue comme le mouton, la chèvre, le rat.

5. Inclure le dépistage du *Staphylococcus non aureus* très négligé malgré son importance

6. Le contexte actuel est expliqué par l'amplification de germes pathogènes et l'émergence de germes de portage avec l'augmentation incessante des taux de résistance chez l'animal et surtout chez l'homme et la raréfaction des nouveaux antibiotiques donc il est impératif de préserver la santé humaine en élaborant des directives réfléchies sur le bon usage des antibiotiques chez l'animal.

En effet, dans le contexte *One Health*, la FAO travaille en étroite collaboration avec l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) dans le cadre d'une initiative tripartite, ainsi qu'avec d'autres partenaires, centres de

référence, universités, groupements régionaux, en collaboration entre les différents secteurs, ainsi qu'entre les entités et les disciplines politiques et économiques dans le but d'intervenir efficacement sur des axes stratégiques tels que :

- La mise sur le marché d'antibiotiques sûrs et efficaces
- Le renforcement de l'encadrement des pratiques commerciales et des règles de prescription
- L'amélioration du dispositif de suivi de la consommation des antibiotiques et la mise en place de celui pour l'antibiorésistance.
- La nécessité d'améliorer et de standardiser les méthodes de détection et de quantification de résistance aux antibiotiques, pour disposer de données sûres et comparables
- La promotion d'une même approche à l'échelon maghrébin, africain et même international.
- La surveillance et la compréhension de la présence de résistances chez les bactéries d'origine non humaine et l'évaluation du risque environnemental.
- La promotion des bonnes pratiques et la sensibilisation de tous les acteurs.
- Le développement des alternatives évitant les recours aux antibiotiques

.....**Quelles sont les tendances à venir ?**

La résistance antibiotique cause aujourd'hui 700.000 décès par an dans le monde, selon des experts britanniques elle pourrait causer 10 millions de morts par an“ dans le monde en 2050.

(Source: Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Future Health and Wealth of Nations - Review on antimicrobial resistance - 11 December 2014)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarts, H.J., Boumedine, K.S., Nesme, X., Cloeckert, A. (2001). Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. 2001 Vet Res. May-Aug;32(3-4):363-80.
- Abdalrahman, L.S., Stanley, A., Wells, H., Fakhr, M.K. (2015) Isolation, Virulence, and Antimicrobial Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) Strains from Oklahoma Retail Poultry Meats. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 May 29; 12(6):6148-61.
- Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L'alimentation, de L'environnement et du Travail (Anses) - Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV). (2016) Suivi des ventes d'antibiotiques vétérinaires. [https://www.anses.fr/fr/content/suivi-des-ventes d'antibiotiques](https://www.anses.fr/fr/content/suivi-des-ventes-d-antibiotiques) [dernière consultation le 30/10/2016] SIVA
- Alioua, M.A. (2015) Les Staphylocoques : sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en microbiologie Spécialité : microbiologie Appliquée Université Badji Mokhtar – Annaba .Faculté des Sciences Département de biochimie.
- Antri K., Rouzic N., Dauwalder O., Boubekri I., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Tazir M., Ramdani-Bouguessa N., Etienne J. (2011). High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 526–532.
- Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R., Buckner, M.M.C. and Finlay, B.B., “Quorum sensing in bacterial virulence”, *Microbiology*, 156, (2010), 2271-2282.
- Anzai, T., Kamada, M., Kanemaru, T., Sugita, S., Shimizu, A., Higuchi, T. (1996) Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from mares with metritis and its zoo epidemiology. *J. Equine Sci.* Volume 7 Issue 1 Pages 7-11
- Argudin, M., Cariou, N., Salandre, O., Le Guennec, J., Nemeghaire, S., Butaye, P. (2013) Genotyping and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from diseased turkey. *Avian Pathol CAVP*-2013-0083.R1
- Armand-Lefevre L., Ruimy R., Andreumont A., (2005). Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis*. 11 : 711–714
- Armand-Lefevre, L., Ruimy, R., Philippon, A., Andreumont, A. (2010) L'histoire du *Staphylococcus aureus* ST398: Un Paradigme Médical du 21ème Siècle. *Staphylococcus aureus* ST 398: A medical paradigm of the 21st century. *Bull. Acad. Vét. France* — 2010 - Tome 163 - N°3 www.academie-veterinaire-france.fr. (Communication présentée le 20 mai 2010)
- Ashraf, A., Abd El Tawab, A., Maarouf, A. A., El-Hofyand, F., Dina, I., Mousa, H. (2016) Bacteriological and Molecular studies on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from chicken meat and its products in Kaliobia Governorate. *Benha Veterinary Medical Journal*, VOL. 31, NO. 1:64-72, 2016
- Avril J.L., Dabarnet H., Denis F., Onteil H. (1992) Bactériologie clinique , 2^{ème} édition Ellipses, Paris, 9-30.
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H (2003) Bactériologie clinique. 3^{ème} édition. ellipses, Paris. 8-28. SBN 10 : 2729899081
- Balaban N., Rasooly A. (2000) “*Staphylococcal enterotoxins*”, *Int J Food Microbiol* 61, (2000), 1-10.
- Baptiste, K.E., Williams, K., Williams, N.J., Wattret, A., Clegg, P.D., Dawson, S., Corkill, J.E., O'Neill, T., Hart, C.A. (2005) *Methicillin-resistant staphylococci* in companion animals. *Emerg. Infect. Dis*. 11, 1942–1944.

- Baquero, F. (1995) Pneumococcal resistance to beta-lactam antibiotics : A global geographic overview. *Microb Drug Resist* 1995 ; 1 : 115-20.2 .
- Baquero, F. (1996) Trends in antibiotic resistance of respiratory pathogens : an analysis and commentary on a collaborative surveillance study. *J Antimicrob Chemother* 1996 ; 38 (Suppl. A) : 117-32.
- Baranton, G., E. Carniel, D. Guiso, et I. Postic. «Méthodes de typage moléculaire des bactéries. Applications à l'épidémiologie Molecular fingerprinting of bacteria. Epidemiological interest Saint Girons Médecine et Maladies Infectieuses , 1995, 25: 1240-1242.
- Barraud, O., Laurent, F., François, B., Bes, M., Vignon, P., Ploy, MC. (2013) Severe human bone infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel mecC variant. *J Antimicrob Chemother* 2013 [PMID:23833187, in press].
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, T.C., Truck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, *American Journal of Clinical Pathology*, 45, Pp. 493 - 496.
- Bautista L., Gaya P., Medina M., Nunez M.(1988) "A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci", *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2, (1988), Pp. 566-569.
- Becker, K., Keller, B., Von-Eiff, C. (2001) "Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, (2001),5551-5557.
- Ben Nejma, M., Mastouri, M., Bel Hadj, Jrad B., Nour, M.(2013) Characterization of ST80 Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77:20–4.
- Bergdoll, M.S.(1979) "Staphylococcal intoxications", In: Riemann, H., Bryan, FL., Food-borne infections and intoxications, Academic press New York, (1979), 443-494.
- Berger, T. (2016) Doit-on s'inquiéter de l'usage d'additifs antibiotiques en élevage ? », la revue électronique en sciences de l'environnement , Volume 16.
- Bernier-Lachance, J.(2015) Prévalence et caractérisation de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline d'origine aviaire au Québec.Thèse de doctorat :Sciences vétérinaires. Université de Montréal. Faculté de médecine vétérinaire. <http://hdl.handle.net/1866/13374>.
- Bhargava, K., Wang, X., Donabedian, S., Zervos, M., da Rocha, L., Zhang, Y. (2011).Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Retail Meat, Detroit, Michigan, USA. *Emerg Infect Dis.* 17(6): 1135–1137. PMC3358215.PMID: 21749794
- Biberstein, E.L. and Hirsh, D.C., "Staphylococci", veterinary Microbiology, Blackwell Science, Malden, USA, (1999), 115-119.
- Billy, C. (2003) Détection génotypique des résistances bactériennes : de la phénotypie à la génotypie, deux méthodes complémentaires Réanimation -Vol12-N3-p192_197. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. DOI: 10.1016/S1624-0693(03)00042-2.
- Bismuth, R., Leclercq, R.(2000) *Staphylococcus aureus* et antibiotiques. In : Précis de bactériologie clinique. (ed. Freyney JRF, Hansen W, Bollet C), ESKA, Paris. 611-918.
- Bittar, F., Ouchenane, Z., Smati, F., Raoult, D., Rolain, J.M.(2009)MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Nov;34(5):467-70.
- Blanc, D.S.,Kuhn, G., Zanetti, G.(2010) Critères et Méthodes de différenciation des souches In Le Loir, Y., Gautier, M (2010) *Staphylococcus aureus*. Monographie de microbiologie :Collection dirigée par Jean-Paul Larpent (Lavoisier) ; 2010. ISSN:1625-9319 ISBN: 978-2-7430-1195-6. Pp.22-40.
- Botrel, M. A., Haenni, M., Morignat, E., Sulpice, P., Madec, Jy., Calavas, D. (2010) Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France. *Foodborne Pathog. Dis.* 7(5):479-487.

- Boubaker K, Diebold P, Blanc DS, Vandenesch F, Praz G, Dupuis G.(2004) Panton-Valentine leukocidin and staphylococcal skin infections in schoolchildren. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10:121–4.
- Bourgeois, C.M., Mescle, J.F., Zucca, J.(1996) “ Aspect microbiologique de la sécurité alimentaire et de la qualité des aliments”, Microbiologie Alimentaire, Lavoisier TEC & DOC, Tome 1, France, (1996), 106-119.
- Brun, Y., Bes, M., Vandenesch, F.(2000)*Staphylococcus*. In: Freney J,Hasen W et Bollet C, eds. Précis de bactériologie clinique. Paris : Eska,2000 ; 795-819 .
- Brun, Y., Bes, M., Vandenesch, F.(2003) Actualités permanentes en pathologies cliniques . In Freney J., Renaud F. Bollet C., et Leclercq (Eds), Eska, Paris, 2003. Section IV, chapitre 1. 55 pages.
- Brun, Y., Bes, M., Vandenesch, F.(2007) “*Staphylococcus*”, Dans le Freney, J., Renaud, F., Leclercq, R. et Riegel, P., Précis de Bactériologie Clinique, 2^e édition ESKA, Paris,(2007), 812.
- Buckingham, SC., Mcdougal, LK., Cathey, LD., Comeaux, K., Craig, AS., Fridkin SK. (2004) Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children’s Hospital. *Pediatr Infect Dis J* 2004 ;23:619–624.
- Bukharie, HA., Abdelhadi, MS., Saeed, IA., Rubaish, AM., Larbi, EB. (2001) Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001 ; 40(1-2):1-4.
- Bulletin Epidémiologique. (2012). Santé Animale et Alimentation N°53/Spécial Antibiotiques et Antibiorésistances (<http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/BEH-Bulletin-epidemiologique-hebdomadaire>).
- Buzaid, N., Elzouki, A.N., Taher, I., Ghenghesh, K.S.(2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a tertiary surgical and trauma hospital in Benghazi, Libya. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011 Oct 13;5(10):723-6.
- Cain, T.C., Lubman, D.M., Weber, W.J., Vertes, A., 1994. Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Rapid comm mass spectrom.* 12, 1026-1030.
- Cal, H.Y., Archambault, M., Gyles, C.L ;Prescott, J.F. Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: CUITent usage and future applications. *Anim Health Res Rev* 2003;4(2). 73-93.
- Carbonnelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Vargues, R. (1987) Bactériologie médicale Techniques Usuelles, SIMEP-MASSON Paris.
- Cariou, N., Argudín, M. A., Robineau, B., Malher, X.(2014) Identification d’un Nouveau pathogène pour la dinde reproductrice : *Staphylococcus aureus* CC398, responsable d’arthrites identification of a new pathogen for turkey breeders: *Staphylococcus aureus* CC398, causing arthritis :*Bull. Acad. Vét. France* — 2014 - Tome 167 - N°1 www.academie-veterinaire-defrance.org.
- CA-SFM / Eucast. (2014) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.Recommandations 2014 . Pp 46-53.
- CA-SFM (2004) Comité de l’antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Communiqué Janvier 2004 (<http://www.sfm.asso.fr/nouv/general.php?pa=2>)
- Cattoir, V., Leclercq, R.(2012) β –Lactamines et Staphylocoques .In .Courvalin ,P.et Leclercq,R., (édition ESKA)(2012) *Antibiogramme* .75002 Paris .3^{ème} édition .ESKA.pp 136-145.
- Chaalal, W., Chaalal, N., Bourafa, N., Kihal, M., Diene, S.M., Rolain, J.M.(2018) Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Products in Western Algeria. *Foodborne Pathog Dis.* 2018 Jun;15(6):353-360.

- Chang, S., Sievert, D.M., Hageman, J.C., Boulton, M.L., Tenover, F.C., Downes, F.P., Shah, S., Rudrik, J.T., Pupp, G.R., Brown, W.J., Cardo, D., Fridkin, S.K. (2003) Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the van A resistance gene. *N Engl J Med*. 348: 1342-1347.
- Chauvin, C., Bouvarel I., Beloeil, P.A., Orand, J.P., Guillemot, D., Sanders, P., (2005) A pharmaco-epidemiological analysis of factors associated with antimicrobial consumption level in turkey broiler flocks. *Vet. Res.*, 36, 199-211.
- Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X.X., Kondo, Y., Trakulsomboon, S., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chavalit, T., Song, J.H., Hiramatsu, K. (2006) *Staphylococcal* Cassette Chromosome mec (SCCmec) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in 11 Asian Countries: a Proposal for a New Nomenclature for SCCmec Elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50: 1001–12.
- Chopra, I., Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001 ;65(2). 232-260.
- Claydon, M. A., S. N. Davey, V. Edwards-Jones, et D. B. Gordon. «The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry.» *Nat. Biotechnol.*, 1996, 14(11):1584-6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2016): Performance Standards for antimicrobial susceptibility tests. Approved standard. Twelfth edition M100S .26th Edition. CLSI supplement M100S. CLSI document M100-S26. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard-Third Edition. CLSI document M31-A3, 2008. Vol.28(No. 8).
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI .(2014)Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement (M100. -S24): Tableau extrait du document M100-S24 Volume 34 N°1.2014.
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2015) Performance Standards for antimicrobial susceptibility tests. Approved standard. Twelfth edition M02-A12. Vol 35 N°1 Replace M02-A11. Vol 32 N°1.
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2016) Performance Standards for antimicrobial susceptibility tests. Approved standard. VET06 | Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from Animals, 1st Edition. Item Order Code: VET06-ED1.
- Cohen P.R .(2007) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: a review of epidemiology, clinical features, management, and prevention. *Int J Dermatol* 2007; 46:1–11.
- Costa ,A.M., Kay, I., Palladino, S. (2005) .Rapid detection of *mecA* and *nuc* genes in *Staphylococci* by real-time multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*;51(1):13-7.
- Coughlan, K., Olsen, K.E., Boxrud, D., Bender, J.B. (2010) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in resident animals of a long term care facility. *Zoonoses Public Health*. 2010; 57(3):220-6.
- Courcol, R. (2009) Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale ? *Rev Francoph Lab* ;2009 :61–4.
- Couto, N., Pomba, C., Moodley, A., Guardabassi, L. (2011) Prevalence of methicillin resistant *Staphylococci* among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Vet Rec* 2011; 169:72.
- Couture, B. (1990) Bactériologie médicale « Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical ». Vigot, Paris. 15-32.

- Cunha, Mdel., Calsolari, R.A., Junior, J.P.(2007) “Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase negative staphylococci”, *Microbiol. Immunol.* 51, 4, (2007), 381-390.
- Cunningham, R., Cockayne, A., Humphreys, H. (1996) Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bone and joint infections. *J Med Microbiol* 1996; 44:157–64.
- Cuny, C., Friedrich, A., Kozytska, S., Layer, F., Nübel, U., Ohlsen, K., Strommenger, B., Walther, B., Wieler, L., Witte, W.(2010) Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int J Med Microbiol.* 300: 109–117.
- Cuny, C., Kuemmerle, J., Stanek, C., Willey, B., Strommenger, B., Witte, W. (2009) Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterization and comparison with MRSA from humans. *Eur. Surveill.* 11, 44–47.
- Cuny, C., Layer, F., Strommenger, B., Witte W. (2011) Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLOS One* 2011;6: e02436.
- Dauwalder, O., Ferry, T.; Thomas, D., Lina, G (2010) Problèmes sanitaires liés à la présence de *S.aureus* : Les autres infections : In *Staphylococcus aureus*. Le Loir, Y., Gautier, M (2010) Lavoisier ; 2010. ISBN: 978-2-7430-1195-6. ISSN : 1625-9319.
- Davis M.F., Iverson S.A., Baron P., Vasse A., Silbergeld E.K., Lautenbach E., Morris D.O.(2012) “Household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci”, *The Lancet Infectious Diseases*, 12, (2012), 703-716.
- De Boer E, Zwartkruis-Nahuis JT, Wit B, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Bosch T, van Oosterom RA, Vila A, Heuvelink AE. (2009) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol.* 2009 Aug 31;134(1-2):52-6.
- De Buyser, M.L., Hennekinne, J.A., (2010). Culture en laboratoire, méthodes d’isolement et de detection .In. Le Loir, Y., Gautier, M., (2010) *Staphylococcus aureus* . Monographie de microbiologie : Collection dirigée par Jean-Paul Larpent (Lavoisier). ISSN: 1625-9319 , Paris, 65-81.
- De Buyser, M.L., Sutra, L., (2005). *Staphylococcus aureus* In: Federighi M. *Bactériologie alimentaire – Compendium d’hygiène des aliments* (2^{ème} édition). Economica, Paris, 25-51.
- De Neeling, A.J., van den Broek, M.J., Spalburg, E.C., van Santen-Verheuevel, M.G., Dam-Deisz, W.D., Boshuizen, H.C., van de Giessen, A.W., van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W.(2007) High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol.* 2007 Jun 21;122(3-4):366-72.
- De Oliveira, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A., Aarestrup, F.M. (2000) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J Dairy Sci* 2000;83(4). 855-862.
- Delarras C. (2007). *Staphylococcus*, *Micrococcus* et ex-*Micrococcus*. 357-385.
- Delpech M.(2000). *Ann Biol Clin* (Paris) 2000; 58:29–38.
- Denis, O., Suetens, C., Hallin, M., Catry, B., Ramboer, I., Dispas, M., Willems, G., Gordts, B., Butaye, P. Struelens, M.J.(2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerg Infect Dis.* 15: 98–1101.
- Descy, J., Meex, C., Melin, P., Hayette, M.P., Huynen, P., De Mol, P. (2010) [MALDI-TOF mass spectrometry in clinical bacteriology or how to identify a bacteria within one minute]. *Rev Médicale Liège* 2010 (65) 29–34.
- Devriese, L.A., Oeding, P.(1976). Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *Rec. Vet. Sci.* 21: 284.

- Djahmi, N., Messad, N., Nedjai, S., Moussaoui, A., Mazouz, D., Richard, J-L., Sotto, A., Lavigne, Jp. (2013).Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clin Microbiol Infect*; 2013 Sep;19(9):E398-404.
- Dowling, P.M. (2006) Aminoglycosides. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*.4th ed., Ames, Blackwell publishing, 2006. 207-229.
- Dowling, P.M. (2006) Miscellaneous antimicrobials: ionophores, nitrofurans, nitroimidazoles,rifamycins, oxazolidinones, and others. In : *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* ,4th ed., Ames, Blackwell publishing, 2006.285-300.
- Duclos ,P., Caillet, J., Javelot, P.(1986) Flore bactérienne aérobie des cavités nasales du lapin d'élevage. *Ann. Rech. Vet.*, 1986, 17 (2), 185-190.
- Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy , M.É.,Tristan , A., Vandenesch, F.M.S.(2010) Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. N° 11, vol. 26, novembre 2010 . Les points-clés en 2010 Medecine/Sciences Volume 26, N° 11 ; pp. 943-949.
- Duquette, R.A., Nuttall, T.J.(2004) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? *J Small Anim Pract* 2004;45(12):591-7.
- Durand G., Bes M., Meugnier H., Enright M.C., Forey F., Liassine N., Wenger A., Kikuchi K., Lina G., Vandenesch F., Etienne J.(2006) Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital and community-acquired infections in France. *J Clin Microbiol* 2006 ; 44 : 847-53.
- El Kouri , D., Pottier, M.A., Trewick, D., Le Gallou, F., Baron, D., And Potel , G. (1998) “ Infections à staphylocoques: aspects cliniques et bactériologiques”, *Encycl Méd Chir, Maladies Infectieuses*, Elsevier, Paris, (1998) ,8.
- EL Ouahabi, H . , Tahri, L., Serghini, A., Belaouchou, A. , Fekhaoui, M. (2015) Prévalence du *Staphylococcus aureus* isolé à partir des fientes de poulet de chair en élevage dans la région de Rabat - Salé - Kénitra (Maroc) [Prevalence of *Staphylococcus aureus* isolated from broiler litter in Rabat - Salé - Kénitra, Morocco] *International Journal of Innovation and Applied Studies* ISSN 2028-9324 Vol. 17 No. 4 Sep. 2016, pp. 1149-1154 .
- Enright, M.C., Spratt, B.G. (1999)Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 1999;7:482–7.
- Eriksen, N.H., Espersen, F., Rosdahl, V.T., Jensen, K.(1995) Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. *Epidemiol Infect* 1995;115:51–60.
- Erskine, R., Walker, R.D., Bolin, C.A., Bartlett, P.C., White, D.G. (2002) Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J.Dairy .Sci* 2002 ;85(5).1111-1118.
- Erskine, R.J., Cullor, J, Schaellibaum, M., Yancey, B., et Zecconi ,A. (2004) Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antimicrobial drugs. NMC annual meeting proceedings. 2004.400-414
- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, European Centre For Disease Prevention and Control. (2010) Antimicrobial resistance surveillance in Europe: *Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net), 2010. Stockholm: ECDC; 2011
- Fanny, V., Maher, S., Gilles, P. (2008) Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires*. Dossier scientifique : Infections à pneumocoque et à *Staphylococcus aureus*.Virulence Factors. Volume 2008, Issue 407, Pages 61-69.
- Farzana, K., Shah, S.N., Jabeen, F.(2004) Antibiotic resistance pattern against various isolates of *Staphylococcus aureus* from raw milk samples. *J. Res. Sci.* (Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan) 15, 145–151

- Fasquelle, R. (1974) *Éléments de bactériologie médicale*. 9^{ème} édition. Flammarion, Paris. 27-36.
- Fauchere, J.L., Avril, J.L. (2002) *Bactériologie générale et médicale*. Ellipses, Paris. 213-217
- Febler, A. T., Kadlec K., Schwarz, S. (2011) Novel apramycin resistance gene *apmA* in bovine and porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:373–375.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G. (2004) Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 186, 1518-1530.
- Felten, A., Casin, I. (2003) Détection simple des staphylocoques résistants à la méticilline grâce à un disque de céfoxitine ou de latamoxef. *Revue Française des Laboratoires* Volume 2003, Issue 352, April 2003, Pages 27-30.
- Felten, A., Grandry, P.H., Lagrange, Casin, I. (2002) Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 40:2766-2771.
- Ferrah, A. (2018) Algérie : La filière « Dinde » 30 ans après. Contribution à l'analyse des structures et de la stratégie des acteurs (1989-2014). <https://www.researchgate.net/publication>
- Fessler, A.T., Kadlec, K., Hassel, M., Hauschild, T., Eidam, C., Ehrlich, R., Monecke, S., Schwarz, S. (2011) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. *Appl Environ Microbiol.*
- Fitzgerald, J.R. (2012) "Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat", *Trends in Microbiology*, (2012), 192-198.
- Fleurette J. (1990) "*Staphylococcus* et *Micrococcus*", Dans le Minor L., Veynon M., *Bactériologie Médicale*, Flammarion Médecine-Sciences, 2^e édition, Paris, (1990), 773-794.
- Fluit, A.C., Visser, M.R., Schmitz, F.J. (2001) Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(4):836-871.
- Freney, J. (2007) *Précis de bactériologie clinique*. Paris: Éd. ESKA ISBN :978-2-7472-1159-8
- Friedrich, A., Witte, W., Harmsen, D., De Lencastre, H., Hryniewicz, W., Scheres, J., Westh, H., SeqNet.org participants (2006) SeqNet.org: a European laboratory network for sequence-based typing of microbial pathogens. *Euro Surveill.* ;11(1):E060112.4.
- Friese, A., Schulz, J., Zimmermann, K., Tenhagen, B.A., Fetsch, A., Hartung, J., Rösler, U. (2013) Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Apr;79(8):2759-66.
- Funke, G., Funke-Kissling, P. (2004) «Evaluation of the new Vitek 2GN card for identification of clinically relevant gram-negative rods,» *J. Clin. Microbiol.* 42(9):4067-71.
- Ganière, J. P. (2010) Health status of domestic fauna: zoonotic infectious diseases: In Proceedings of the XXXVII symposium of the National Institute of medicine agricultural. Zoonoses New, Congress Vinci Centre, Tours, France, 2010.
- Garcia-Álvarez, L., Holden, M.T.G., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J., Holmes, M.A., (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2011;11:595–603.
- Garnier F., Denis F. (2011) "Cocci à Gram positif", In Ploy, M.C., Denis, F., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R., *Bactériologie Médicale, Techniques Usuelles*, 2^e édition, Elsevier Masson, Paris, (2011), 288.

- Geneviève Pelletier-Jacques., (2012) Etude de la virulence et de la résistance aux antibiotiques des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline chez le porc à l'abattoir au Québec . Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en sciences vétérinaires option microbiologie . Département de pathologie et microbiologie Faculté de médecine vétérinaire.
- Gentilini, E., Denamiel, G., Llorente, P., Godaly, S., Rebuelto, M., Degregorio, O. (2000) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal Of Dairy Science* Volume 83, Issue 6, June 2000, Pages 1224-1227
- Giguère, S. (2006) Tetracyclines and glycyclines. In *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4th ed., Arnes, Blackwell publishing, 2006. 231-240.
- Giguère, S. (2006) Macrolides, azalides and ketolodes. In *Antimicrobial therapy III veterinary medicine*. 4th ed., Ames, Blackwell publishing, 2006. 191-205.
- Graveland, H., Wagenaar, J.A., Broekhuizen-Stins, M.J., Oosting-Schothorst, I., Schoormans, A., Van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W., Mevius, D., Heederick, D. (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veal calf farmers and veal calves in The Netherlands. In: *Proceedings of the American Society for Microbiology Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens*, Copenhagen, Denmark, 15–18 June (2008), pp. 62–63
- Graveland, H., Wagenaar, J.A., Heesterbeek, H., Mevius, D., van Duijkeren, E., Heederik, D. (2011) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming : human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene. *PLoS One* 5, e10990
- Grohs, P. (2009) Trends in *Staphylococcus aureus* antimicrobials susceptibilities: is methicillin still a relevant multiresistance marker?. *Pathologie Biologie*, 2009. 57(1): p. 1-8.
- Grosjean, J., Clave, D., Archambaud, M., Pasquier, C. (2011) *Bactériologie et Virologie pratique*, DE BOECK, 2 ème édition, Belgique, (2011), 73-78.
- Grundmann, H., Aanensen, D.M., Van Den, Wijngaard, C., Spratt, Bg., Harmsen, D., Friedrich, A.W (2010) Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis. *PLoS Med.* 2010 Jan;7(1):e1000215.
- Guardabassi, L., Stegger, M., Skov, R. (2007). Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish slaughter pigs. *Vet. Microbiol.* 122, 384–386. doi:10.1016/j.vetmic.2007.03.021.
- Gueudet, T., Lemblé, C. (2004). *Détection de la résistance à l'oxacilline chez Staphylococcus aureus : comparaison de cinq techniques utilisables en routine*. *Pathologie Biologie*, 52(10), 617–621. doi:10.1016/j.patbio.2004.09.005 .
- Haenni, M., Saras, E., Chatre, P., Medaille, C., Bes, M., Madec, J.Y., Laurent, F., (2012) A USA300 variant and other human-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains infecting cats and dogs in France *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 67, Issue 2, 1 February 2012, Pages 326–329.
- Haenni, M., Chatre, P., Boisset, S., Carricajo, A., Bes, M., Laurent, F., Madec, J.Y., (2011) *Staphylococcal* nasal carriage in calves: multiresistant *Staphylococcus sciuri* and immune evasion cluster (IEC) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *J. Antimicrob. Chemother* 66, 1927-1928.
- Hamid, S., Bhat, MA., Mir, IA., Taku, A., Badroo, GA., Nazki, S., Malik, A. (2017) Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis, *Veterinary World*, 10(3): 363-367.
- Hartmann, F.A., Trostle, S.S., Klohn, A.A (1997) Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a postoperative wound infection in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1997;211(5).590-592.

- Haveri M, Suominen S, Rantala L, Honkanen-Buzalski T, Pyörälä S. (2005) Comparaison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. *Vet Microbiol.* 2005 Mar 20;106(1-2):97-102. Epub 2005 Jan 22.
- Heczko, PB. , Hoffler, U., Kasprowicz, A., Pulverer, G. (1981) Quantitative studies of the flora of the nasal vestibule in relation to nasal carriage of *Staphylococcus aureus* .*J. Med Microbiol* 1981 ;14(3) :233-41.
- Hermans RA1, Kee VR, Moores KG, Ross MB.(2008) Etiology and treatment of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Health Syst Pharm.* 2008 Feb 1;65(3):219-25.
- Hermans, K., De Herdt, P., Baele, M., Devriese, L.A. (2001) Secreted antigens as virulence-associated markers in *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Vet. Microbiol.*, 81(4):345-52.
- Heym, B., Le Moal, M., Armand-Lefèvre, L., Nicolas-Chanoine, MH. (2002) Multilocus sequence typing (MLST) shows that the 'Iberian' clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has spread to France and acquired reduced susceptibility to teicoplanin. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50, p323- 329.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., Ito, T. (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 9: 486-493.
- Hiroi, M., F. Kawamori, T. Harada, Y. Sano, N. Miwa, K. Sugiyama, Y. Hara-Kudo, and T. Masuda. (2012) Antibiotic resistance in bacterial pathogens from retail raw meats and food-producing animals in Japan. *J. Food Protect.* 75(10):1774-1778.
- Hoquet, F., Higgins, R., Lessard, P., Urins, A. , Marcous, M. (1985) Comparison of the bacterial and fungal flora in the pharynx of normal horses and horses affected with pharyngitis. *Can. Vet. J.* 26, 342-346.
- Huletsky, A., Giroux, R., Rossbach, V., Gagnon ,M., Vaillancourt, ,M., Bernier, M., Gagnon ,F., Truchon, K., Bastien, M., Picard, F.J, Van Belkum, A., Ouellette ,M., Roy, P.H., Bergeron, M.G. (2004) New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2004 May;42(5):1875-84.
- International Working Group On The Classification Of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). (2009) Classification of *Staphylococcal* Cassette Chromosome Mec (Sccmec) : guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4961–7.
- Isenberg, H., Gavan, T., Smith, P. ,Sonnenwirth, A., Taylor, W. ,Martin, W. ,Rhoden D. ,Balows, A. «Collaborative investigation of the AutoMicrobic system Enterobacteriaceae biochemical card,»*J. Clin. Microbiol.*, 1980, 11(6):694-702.
- Ito, T., Okuma, K., Ma, X.X., Yuzawa ,H., Hiramatsu ,K. (2003) Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome : genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 2003 ; 6 : 41-52.
- Jaffe, R.I., Lane, J.D., Albury, S.V., Niemeyer, D.M.(2000) Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. *J Clin Microbiol.* 2000 Sep;38(9):3407-12.
- James, S., Lewis, I.i., James, H., Jorgensen. (2005) Inducible clindamycin resistance in Staphylococci: Should clinicians and microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis.* 2005 Jan 15;40(2):280-5.
- Jarraud, S., Mougél, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F.(2002) Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 2002 Feb;70(2):631-41.

- Jehl, F. ; Prévost, Gilles (2010) Les infections nosocomiales à *Staphylococcus aureus* .In. Le Loir, Y., Gautier, M., (2010) *Staphylococcus aureus* .Monographie de microbiologie :Collection dirigée par Jean-Paul Larpent (Lavoisier).ISSN:1625-9319 ,Paris,197 -202.
- Jevons, M.P.(1961) “CEL BENIN” - resistant *Staphylococci*. *Br Med J* 1961 Jan 14; 1(5219): 124–125. PMID: PMC1952888
- Joffin, J.N ., Leyral, G. (2006) Microbiologie Technique Tome 1 ” Dictionnaire des techniques”. CRDP AQUITAINE. Bordeaux. 189-250.
- Jorgensen, J.H., Turnidge., J.D.(2003) Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington,D.C., ASM press, 2003; 1108-1127
- Jouy, E., Le Roux , A., Tocqueville, V., Granier , S.A., De Buyser,M.L., Brisabois, A., Sanders, P., Kempf , I., Kobish, M., Chauvin, C.(2008) Prévalence du portage de SARM par les porcs à l’abattoir. In Comptes rendus du Congrès RICAI, 4-5 décembre 2008, Paris. *Bull. Acad. Vét.* Tome 163 - N°3 www.academie-veterinaire-france.fr
- Juhasz-Kaszanyitzky, E., Janosi, S., Somogyi, P., Dan, A., Van Der Graaf-Van Bloois L., Van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A.,(2007) MRSA transmission between cows and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 630–632
- Kaci A., Cheriet F. (2013) Analyse de la compétitivité de la filière de viande de volaille en Algérie : tentatives d’explication d’une déstructuration chronique. *New Medit.* 2 : 11-21.
- Kadlec, K., Ehricht, R., Monecke, S., Steinacker, U., Kaspar, H., Mankertz, J., Schwarz, S. (2009) Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother.* 64: 1156–1164.
- Kahl, Bc., Mellmann, A., Deiwick, S., Peters, G., Harmsen, D. (2005) Variation of the Polymorphic Region X of the Protein A Gene during Persistent Airway Infection of Cystic Fibrosis Patients Reflects Two Independent Mechanisms of Genetic Change in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005 ; 43:502–5.
- Karmi, M. (2013) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry meat in Qena, Egypt, *Veterinary World* 6(10): 711-715.
- Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K.(2000) A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome mec, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1549–55.
- Kearns, AM., Pichon, B., Hill, R.L., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacocks,J., Maskell, D.J., Holmes, M.A.(2011) 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
- Khalafalla, F.A., Abdel-Atty, N.S., Soad, A., Abdel, Wanis., and Adel, S., Hanafy. (2015) Food Poisoning Microorganisms in Chicken Broiler Meat *Global Veterinaria* 14 (2): 211-218, 2015 ISSN 1992-6197© IDOSI Publications, 2015
- Khambaty, F.M., Bennett, R.W., Shah, D.B. (1994) “Application of pulse field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak”, *Epidemiol. Infect.* 113, (1994), 75-81.
- Kikuchi,K.,Takahashi N., Piao ,C. , Totsuka ,K ., Nishida ,H., Uchiyama ,T., (2003).Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease in neonatal and perinatal wards .*J Clin Microbiol.*41 :3001-3006.
- Kirby, W.M.(1944). Extraction of a highly potent Penicillin inactivator from Penicillin resistant *Staphylococci*.Vol. 99, No. 2579 :452-3.
- Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Uji, T., Kitagawa, H. (2005) Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science* 67, 107–110.

- Kloos, W. E., Bannerman, T. L. (1999) *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Manual of Clinical Microbiology, 7th edition, Pp.264–282. Edited by P. R. Murray. Washington, DC: American. Society for Microbiology.
- Kloos, W. E., Lambe J. R. D. W. (1981) “*Staphylococcus*”. In: Manual of Clinical Microbiology, 4th edition. Am. Soc. For Microbiology, Washington DC, 222-235.
- Kloos, W. E., Schleifer, K. H. (1986) “Genus IV. *Staphylococcus*”, In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, (1986), 1013-1035.
- Köck, R., Schaumburg, F., Mellmann, A., Köksal, M., Jurke, A., Becker, K., Friedrich, A. W. (2013) Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. 2013;8(2):e55040.
- Kopp, B.J., Nix, De., Armstrong, E.P. (2004) Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Ann. Pharmacother.* 2004; 38:1377–82.
- Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Graviss E.A., Naidich, S., Musser, J.M., Kreiswirth, B.N.(2004) spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol*, 42(2): p. 792-9.doi: 10.1128/JCM.42.2.792-799.2004
- Kounasso, Y., Foundou, Z.(2007).Exploitation des données de localisation génomique (les puces à ADN) Séminaire interdisciplinaire de bioinformatique BIF7002 Rapport de la conférence du 21 mars 2007 Par Mr. Pierre-Étienne Jacques
- Krziwanek, K., Metz-Gercek, S., Mittermayer, H. (2009) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from human patients, upper Austria. *Emerg Infect Dis.* 15: 766–769.
- 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.(2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001 ; 357 : 1225-40.
- Labro M.T., Bryskier J.M. (2014) Bacterial resistance: an emerging “zoonosis”? *Exp Rev Anti Infect Ther* 2014;28:1-21.
- Lapierre, P., Huletsky A., Fortin, V., Picard, F.J., Roy, P.H, Ouellette, M., Bergeron, M.G. (2003) Real-time PCR assay for detection of fluoroquinolone resistance associated with *grlA* mutations in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* Jul;41 (7):3246-51.
- Laurent, F., Chardon, H., Haenni, M., Bes, M., Reverdy, M.-E., Madec, J.-Y., Lagier, E., Vandenesch, F., Tristan, A.(2012) New European methicillin resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mecA*-variant gene: human and animal isolates in France. *Emerg Infect Dis*, 18, 1465-1467.
- Le Loir Y., Baron F., Gautier M., 2009. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res GMR* 2003;2:63–76
- Le Loir, L.Y. et Gautier, M. (2010), “ *Staphylococcus aureus*”, Monographie de microbiologie, Lavoisier, Paris, 1-113.
- Le Minor, L., Veron, M., 1990. Bactériologie Médicale «*Staphylococcus* et *Micrococcus*» J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794.
- Leclercq R. (2002) Résistance des staphylocoques aux antibiotiques ; *Ann Fr Anesth Réanim*, 21 : 375-83. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. S0750765 802006226/FLA
- Leclercq, H., Monsel, D.A.A.(1989) Microbiologie, le tube digestif, l'eau et les aliments. Édition DOIN. 1989

- Lee, J.H., (2003) Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6489–6494.
- Leekha S., Diekema D.J., Perencevich E.N. (2012) “Seasonality of staphylococcal infections”, *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18, (2012), 927-933.
- Leonard F.C., Markey B.K. (2008) “Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals”, *Veterinary Journal*, London, England, (2008), 27-36.
- Lina, G., Etienne ,J.,Vandenesch ,F.,(1997) Les infections et syndromes toxiques à *Staphylococcus aureus*. In : Mege J.,Revillard J., Raoul D. *Immunité et infections –Concepts immunopathologiques et perspectives thérapeutiques* .Arnette ,Paris.29-140.
- Loeffler, A., Boag, A.K., Sung, J., Lindsay, J.A., Guardabassi, L., Dalsgaard, A., Smith, H., Stevens, K.B., Lloyd ,D.H.(2005) Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:692–7
- Lowy, F D. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine* 1998 Aug 20; 339(8):520-532.
- Lowy., F. D. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003;111(9).1265-1273.
- Luini, M., Cremonesi, P., Magro ,G., Bianchini, V., Minozzi, G., Castiglioni, B., Piccinini, R.(2015) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates. *Vet Microbiol.* 178, 270-4.
- Madec J.Y. (2013) Résistance aux antibiotiques chez l’animal : quel risque pour l’Homme ?Antimicrobial resistance in animals: A risk for humans? *Journal des anti-infectieux* (2013) 15, 178—186
- Madec, J.Y ., Haenni, M. (2010)Les Staphylocoques dorés Résistants à la Meticilline (SARM) chez les animaux en France: Prévalence et résistances associées : Meticillin-Resistant: Prevalence and co-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) among animals in France .communication présentée le 20 mai 2010) *Bull. Acad. Vét. France* -Tome 163 - N°3 www.academie-veterinaire-france.fr
- Marchal, N. , Bourdon, J.I. (1973). Milieux de Culture et Identification Biochimique des Bactéries. Doin. Paris. 99-105.
- Marisa ,H., Jouy, E., Madec ,J.Y., Laurent, F.(2012) *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) :un partage entre l’Homme et l’animal ?*Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* no 53/Sécial Antibiotiques et Antibiorésistances.
- Martineau ,F., Picard, F.J, Lansac, N., Ménard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M. G.(2000) Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 44(2): 231–238.
- Mastouri M, Nour M, Ben Nejma M, Bouallegue O, Hammami M, Khedher M. (2006) Antibiotics resistance of meticilline-resistant *Staphylococcus aureus*: detection of the first glycopeptides low sensibility strains in Tunisia. *Pathol Biol (Paris)*. 2006 Feb;54(1):33-6.
- Menoueri , N., Richard, Y., Brunet, J., Oudar, J.(1988) Flore bactérienne aérobie et aéro-anaérobie des cavités nasales de l’agneau de bergerie. *Ann. Rech. Vét.* 19, 175-180
- Messenger, A.M, Barnes, A.N, Gray, G.C (2014). Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroponosis): a systematic review of seldom-documented human biological threats to animals. *PLoS One.* 9, 8905577(20):7151-7.
- Meyer,A ., Deiana ,J., Bernard, A.(2004) “Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés”, Doin editeurs Groupe Liaisons SA, France, (2004), 423.

- Mirzaei, B., Babaei, R., Asiabar, AP., Bameri, Z.(2015)Detection of both vanA et vanB genes in vanA phenotypes of *Enterococci* by Taq Man RT-PCR. *Braz J Microbiol.* 2015 1;46(1):161-5.
- Monecke ,S., Ruppelt, A., Wendlandt ,S., Schwarz, S., Slickers, P., Ehricht ,R., Cortez de Jackel ,S . (2013) Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from diseased poultry .*Veterinary Microbiology* 162 (2013) 806–812.
- Moon , J.S., Lee, A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Kim, M.N., Paik , Y.H., Park, Y.H., Joo, Y.S.,Koo, H.C.(2007) Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant *staphylococci* isolated from bovine mastitis in Korea. *J. Dairy Sci.* 90, 1176–1185.
- Moritz V. V. (2001) Conf. OIE 2001, 123-134 123 Résistance aux ntibiotiques, notamment en aviculture. <http://www.oie.int/doc/ged/D2943.PDF>
- Moussaoui ,L. (2012) Applications de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF à la bactériologie et à la distinction de variants génétiques .Thèse pour l’obtention du grade de Docteur de l’université de Strasbourg .Spécialité : Sciences médicales- Recherche clinique et innovation technologique. HAL Id: tel-00872251 .<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00872251>.
- Moussaoui,W., Bouakaze.C., Prevost.,G.(2009) Applications de la spectrographie de Masse Maldi-Tof à l’identification bactérienne *Bull.Soc.Fr.Microbiol.*,24,(1),2009.
- Mulders M. N., Haenen AP, L, C, Poldervaart Es, Bosch T, W, D, D, Graat Ea, Mevius D, Voss A, W.(2010) Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 138(05):743–755.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.(1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986 ;51 Pt 1:263-273.
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1986) - Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*Vol.155,pp. 335-350.
- Murchan ,S., Kaufmann , M.E., Deplano ,A., De Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C.E., Fussing ,V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., El Solh, N., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjo, U., Coombes, G., Cookson ,B.(2003) Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 2003;41:1574–85.
- Naas T, Fortineau N, Spicq C, *et al.* Three-year survey of community-acquired *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a French university hospital. *J Hosp Infect* 2005;6:321-329.
- NCCLS (1999) "Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approuved Standard.NCCLS M31-A.
- NCCLS (2004). "Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Informational supplement. NCCLS M31-S1 VoI24(17): 35 pages.
- Nemati ,M., Hermans , K., Lipinska , U., Denis, O., Deplano, A., Struelens, M.,Devriese ,L.A., Pasmans , F., Haesebrouck, F.(2008) Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3817–3819.
- Nishifuji, K., Sugai, M., Amagai, M. (2008) . “*Staphylococcal* exfoliative toxins: molecular scissors of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals”, *Journal of Dermatological Science*, 49, (2008), 21-31.

- Novick, R.P. (1990), "Staphylococci", Microbiology, 4 th ed., New York, 539-560.
- Nussenblatt ,V., Lemma ,V.,Kumwenda N ,Broadhead R.,Neville,M.C.,Taha,T.E.,SSemba,R.D.,(2005).Epidemiology and microbiology of subclinical mastitis among HIV-infected women in Malawi .*Int J STD* , **16** :227-232.
- O'mahony, R., Abbott, Y., Leonard , F.C., Markey, B.K., Quinn , P.J., Pollock, P.J., Fanning, S., Rossney, A.S. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. *Vet.Microbiol.* 109, 285–296
- Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) (2009) Rapport d'activité 2009-10/ Annual Report 2009-10. Vivactis Plus Ed. 2011. ISBN 978-2-916641-53-9.
- Ogston A.(1881)Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *Br Med J* 1881;1:369.b2– 375.
- Oliveira D.C., Tomasz A., Lencastre H.(2002). Secrets of success of a human pathogen: Molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002 ; 2 : 180-9.
- Oliveira, D.C., Lencastre, H. (2002) Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 ; 46 : 2155-61.
- O'seaghdha, M., Schooten, C.J., Kerrigan, S.W., Emsley, J., Silverman, G.J., Cox, D., Lenting , P.J., Foster, T.J.(2006) "Staphylococcus aureus protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions",*The FEBS Journal*, 273, (2006), 4831-4841.
- Olatu, J.O., Kabir, J. J, Okolochae.C., Umoh, V.P., Kwaga, J.K.P., Owolodun ,A.O.(2015) Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in chicken carcasses and live birds in Zaria, Nigeria FUTA. *Journal of Research in Sciences*, 2015 (1): 132-138
- Palladino S., Kay I.D., Costa A.M., Lambert E.J., Flexman J.P.(2003) Real-time PCR for the rapid detection of vanA and vanB genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003 Jan;45(1):81-4.
- Panlilio, A.L, Culver, D.H., Gaynes ,R.P., Banerjee, S., Henderson, T.S, Tolson, J.S, , Martone, W.J (1992) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol* 1992;13(10): 13:582–6.
- Panton, P.N., Valentine, F.C.O. (1932) .*Staphylococcal* toxin. *Lancet.* 1932 ;219 :506–508.
- Pantosti, A., Venditti, M. (2009)What is MRSA. *Eur Respir* 2009;34:1190-6
- Pantucek , R., Svec, P., Dajcs , J. J., Machova, I., Cernohlavkova , J., Sedo ,O., Gelbicova , T., Maslanova, I., Doskar . (2013) *Staphylococcus petrasii* sp. nov. including *S. petrasii* subsp. *petrasii* subsp. nov. and *S. petrasii* subsp. *croceilyticus* subsp. nov., isolated from human clinical specimens and human ear infections. *Syst Appl Microbiol* 36, 90–95.
- Pellerin, J. L. (1995) L'apport du laboratoire de bactériologie dans le diagnostic et le traitement des pyodermites et des otites suppurées des carnivores domestiques .*Point Vétérinaire* ,26 (164), 13-24.
- Pellerin, J. L.,Gautier ,M ,Le loir ;Y .(2010) Identification de l'espèce au sein du genre In : Le Loir, Y. , Gautier, M Lavoisier (2010). *Staphylococcus aureus*. ISBN: 978-2-7430-1195-6.ISSN :1625-9319.pp :1-22
- Persoons, D., Van Hoorebeke, S., Hermans, K., Butaye, P., De Kruif, A., Haesebrouck, F., Dewulf, J.(2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 452–453. Press, Washington, D.C. ASM Press, c1995. NLM ID: 9442686
- Pletinckx ,L.J., Verhegghe, M., Dewulf, J., Crombé, F., De Bleeker, Y., Rasschaert, G., Goddeeris, B.M., De Man, I.(2011) Screening of poultry-pig farms for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: sampling methodology and within herd prevalence in broiler flocks and pigs. *Infect Genet Evol.* 2011 Dec;11(8):2133-7.

- Poole, K.(2004) Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(17). 2200-2223.
- Prescott, J.F. (2006) Beta-lactam antibiotics: penam penicillins. In *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4th ed., Ames, Blackwell publishing, 2006. Pp.121-137.
- Prescott, J.F. (2014) The resistance tsunami, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology *Vet Microbiol* 2014;171:273-8.
- Prévost, G., Cribier, B., Couppié, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbancon, V., Monteil, H., and Piemont, Y. (1995). Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* 63, 4121–4129.
- Proctor R. A., von Eiff C., Kahl B. C., Becker K., McNamara P., Herrmann M., Peters G.. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Microb. Rev.* 4, 295–305
- Quincampoix , J.C., Mainardi, J.L. (2001)Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation*. 10, 267-275.
- Quinn , P.J., Markey , B.K., Leonard ,F.C., Fitz Patrick, E.S., Fanning ,S., Hartigan, P.J. (2011) “*Staphylococcus* species”, *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2^e edition, Wiley-Blackwell, USA, (2011), 179.
- Rahal , K., Benslimani, A., Tali-Maamar, H., Missoum, M. F. K.,. Kechih. Bounar, S .,Ammari H.(2011)Standardisation de l’antibiogramme à l’échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) 6^{ème} édition 2011 .
- Rainard ,P.,Gilbert,F.(2010) Les mammites dues à *Staphylococcus aureus* In Le Loir, L.Y. et Gautier, M. (2010) “ *Staphylococcus aureus*” Monographie de microbiologie, Lavoisier, Paris, 211-232.
- Ramatla, T. , Lubanza, N., Mulunda, M ., Rendani, N. (2016)Prevalence and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated from Beef Carcasses at Abattoirs in North West Province Kamla-Raj 2016 *J Hum Ecol*, 56(1,2): 188-195 (2016)
- Ramdani-Bouguessa N¹, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, Vandenesch F, Tazir M, Etienne J.(2006) Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Mar;50(3):1083-5.
- Rebiahi , S.A., Abdelouahid, D.E., Rahmoun, M., Abdelali, S., Azzaoui. (2011) Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria) Emergence de souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine isolées du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (Algérie Nord-ouest) Elsevier Masson SAS.
- Rich, M., Roberts, L., Kearns, A.M. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from companion animals. *Vet. Microbiol.* 105, 313–314.
- Richter, A., Sting, R., Popp, C., Rau, J., Tenhagen, B. A., Guerra, B., Hafez, H.M., Fetsch, A. (2012) Prevalence of types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey flocks and personnel attending the animals. *Epidemiol Infect* 140: 2223–2232.
- Robinson, D.A., Enright, M.C. (2003) Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(12):3926-34 .
- Rossney, A.S., Herra, C.M., Brennan, G.I., Morgan, P.M., O’connell, B., (2008)Evaluation of the Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay using the GeneXpert real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens. *J Clin Microbiol* 2008;46:3285–90.
- Rubin, R. J., Harrington, C. A., Poon, A.,Dietrich, K. , Greene, J. A., Moiduddin, A.(1999) The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg Infect Dis*. 1999 Jan-Feb; 5(1): 9–17.

- Ruimy, R., Dos-Santos M., Raskine L., Bert F., Masson R., Elbaz S., Bonnal, C., Lucet, J.C., Lefort, A., Fantin, B., Wolff, M., Hornstein, M., Andreumont, A. (2008) Accuracy and potential usefulness of triplex real-time PCR for improving antibiotic treatment of patients with blood cultures showing clustered gram-positive cocci on direct smears. *J Clin Microbiol* 2008;46:2045–2051 Vol. 46, N°6.
- Ryffel, C., Tesch, W., Birch-Machin, I., Reynolds, P. E., Barberis-Maino, L., Kayser, F. H., Berger-Bachi, B. (1990) Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene* 94:137–138
- Sabour, P.M, Gill, J.J., Lepp, D., Pacan, J.C., Ahmed, R., Dingwell, R., Leslie, K.(2004) Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. *J Clin Microbiol* 2004;42(8). 3449-3455.
- Salmon, S.A., Watts, J.L., Aarestrup, F.M., Pankey, J.W., Yancey, R.J. (1998) Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *J Dairy Sci* 1998;81(2).570-578.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. et Brown, P.(1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995, vol. 270, pp. 467-470.
- Scheres, H. (2006) Westh, and on behalf of the SeqNet.org participants SeqNet.org: European laboratory network for sequence-based typing of microbial pathogens. *Euro Surveill.* 11. [Online.] <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/060112.asp#4>.
- Schijffelen M.J., Boel C.H., Van Strijp J.A., Fluit A.C., (2010) Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics* 2010;11:376.
- Schlegelova, J., Rysanek, D., Sediva, L., Babak, V. (2001) Comparison of methods for the determination of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2001 Feb;48(1):21-9
- Seguin, J.C., Walker, R.D., Caron, J.P., Kloos, W.E., George, C.G., Hollis, R.J., Jones, R.N., Pfaller, M.A.(1999) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. *J Clin Microbiol* 1999;37(5). 1459-1463
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., Scola, B.L., Fournier, P.E., Rolain, J.M., Raoult, D.(2009) Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009;49:543–51.
- Shopsin, B., Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN..(1999), Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, 1999. 37(11): p. 3556-3563.
- Shore, A.C., Deasy, E.C., Slickers, P., Brennan, G., O'connell, B., Monecke, S., Ehricht, R., Coleman, D.C. (2011) Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 3765-3773
- Singleton, P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies "cours" 6^{ème} édition. Dunod. Paris. 479-508.
- Song, J.H., Hsueh, P.R., Chung, D.R., Ko, K.S., Kang, C.I., Peck, K.R., Yeom, J.S., Kim, S.W., Chang, H.H., Kim, Y.S., Son, S.I., J.J.S., So, T.M.K., Lalitha, M.K., Yang, Y., Huang, S.G., Wang, H., Lu, Q., Carlos, C. C., Perera, J.A., Chiu, C.H., Liu, J.W.,

Chongthaleong, A., Thamlikitkul, V., Van, P.H. (2011) Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1061–9.

- Sora, N., Tali, A., Addebous, A., Zahlane, K., Bouskraoui, M., Chabaa, L. (2012). Epidémiologie et résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* dans un hôpital pédiatrique au CHU de Marrakech. *J Biol Médicale*.39–43.
- Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale en médecine humaine et vétérinaire selon les recommandations de L'O.M.S. (2014) 7^{ème} édition. Algérie. 2014.Pp 42-44.*Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis* 2007;13:594–600.
- Stefani, S., Chung, D.R., Lindsay, J.A., Friedrich, A.W., Kearns, A.M., Westh, H., Mackenzie, F.M.(2012) “Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39, (2012), 273-282.
- Stegger, M., Andersen, P.S., Kearns, A., Pichon, B., Holmes, M., Edwards, G., Laurent, F., Teale, C., Skov, R., R.(2012) Rapid Detection, differentiation and typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA*(LGA251).*Clin Microbiol Infect*. 2012 Apr;18(4):395-400.
- Stein RA.(2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. the new zoonosis. *Int J Infect Dis* 2009;13(3):299-301
- Stepan, J., Pantucek, R., Doskar, J.(2004) “Molecular diagnostics of clinically important *staphylococci*”, *Folia Microbio*, 49, 4, (2004), 353-386.
- Stephen, H.G., Hawkey, M.P., “Principles and practice of clinical bacteriology”, 2^e edition, John Wiley and Sons, Birmingham, (2006), 73-86.
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., Witte, W.(2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*;41(9). 4089-4094.
- Stryjewski, M.E., Corey, G.R. (2014) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2014;58 Suppl 1:S10–9.
- Suarez, S.(2013) Microbiologie clinique et spectrométrie de masse. Microbiologie clinique et spectrométrie de masse. Thèse pour l'obtention du grade de DOCTEUR Sciences de la Vie et de la Santé Discipline : Infectiologie Médecine humaine et Pathologie. Université Descartes - Paris V, 2013. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00920410>
- Sudhanthirakodi Sudhanthiramani, C.H., Swetha, S., Bharathy, S.(2015) Prevalence of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* from raw milk samples collected from the local vendors in the region of Tirupathi, India *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916 Available at www.veterinaryworld.org/Vol.8/April-2015/8.pdf
- Sutra, L., “ Manuel de Bactériologie Alimentaire ”, Polytechnica, Paris, (1998), 53-80.
- Swenson, J.M., Clark, N.C., Sahm, D.F., Ferraro, M.J., Doern, G., Hindler, J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Reller, L.B., Weinstein, M.P. (2005) Molecular characterization and multi-laboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *Journal of clinical microbiology* 1995 ; 33(11):3019-3021.
- Thompson BL, Dwyer DM, Ussery XT, et al.. Handwashing and glove use in a longterm Care facility. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:97-103.
- Titouche, Y., Chergui, A., Salmi, Dj., Hakem, A., Houali, K., Meheut, T., Vingadassalon, N., Chenouf, N., Hennekinne, J.A., Auvray, F.(2014) Caractérisation de *Staphylococcus aureus* dans les produits laitiers traditionnels algériens. Poster . 13^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie.

- Tomlin, J., Peadar, M.J., Lloyd, D.H., Howell, S., Hartmann, F., Jackson, H.A., Muir, P. (1999) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in dogs. *Vet Rec* 1999;144(3): 60-64.
- Touaitia, R., Bouteffnouchet, N., Djahoudi, A. (2015) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and/or intermediate susceptibility to vancomycin isolated from private laboratories in Annaba "Algeria". *J Chemi and Pharm Research*. 7(5):780-786.
- Toutain, P.L., Lees, P., (2004) Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 27, 467-477.
- Trad, S., Allignet, J., Frangeul, L., Davi, M., Vergassola, M., Couve, E., Morvan, A., Kechrid, A., Buchrieser, C., Glaser, P., El-Solh, N. (2004) DNA microarray for identification and typing of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42:2054-64.
- Urwin, R. and M.C. Maiden, Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol*, 2003. 11(10): p. 479-87.
- Van Der Vijver, J.C.M., Van, Es, Boon, M., Michel, M.F. (1972) Lysogenic Conversion in *Staphylococcus aureus* to Leucocidin Production. *J Virol* 1972; 10: 318-9.
- Van Duijkeren, E., Box, A.T., Heck, M.E., Wannet, W.J., Fluit, A.C. (2004) Methicillin-resistant *staphylococci* isolated from animals. *Vet Microbiol* 2004; 103(1-2):91-97.
- Van Leeuwen, W.B., Jay, C., Snijders, S., Durin, N., Lacroix, B., Verbrugh, H.A., Enright, M. C., Troesch, A., Van, Belkum, A. (2003) Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* with DNA array technology. *J Clin Microbiol* 2003;41:3323-6.
- Van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., De Neeling, A., Van De Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., Voss, A., Kluytmans, J. (2007) Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis*. 13: 1834-1839
- Vandenberg, M.F.Q., Yzerman, E.P.F., Van Belkum, A., Boelens, H.A.M., Sijmons, M., Verbrugh, H.A. (1999) Follow-Up of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage after 8 Years: Redefining the Persistent Carrier State. *J Clin Microbiol* 1999;37:3133-40.
- Vandenesch, F. (1997) Régulation de l'expression des exoprotéines de *Staphylococcus aureus*. *Médecine et Maladies Infectieuses* Volume 27, Supplement 4, pp : 150-158 [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(97\)80014-5](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(97)80014-5)
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.E., Etienne, J. (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes : worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003 ; 9 : 978-84.
- Vandenesch, M.F., Verbrugh, H.A. (1999) Carriage of *Staphylococcus aureus* : epidemiology and clinical relevance. *J Lab Clin Med*, 133:525-534.
- Vandenesch, F., Lina, G., Henry, T. (2012) "Staphylococcus aureus Hemolysins, bicomponent Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors", *Front Cell Infect Microbiol*, 2, (2012), 12.
- Vandenesch, F., Laurent, F., Tristan, A. (2017). Rapport d'activité du Centre de national de référence des staphylocoques pour l'année 2016 du des Staphylocoques pp 1-98 <http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files/download?mode=inline&data=7450583>.
- Vandenesch, F., Lina, G., Gillet, Y., Etienne, J., Crémieux, A.C. (2009). The end of the controversy: Panton Valentine is the culprit. *Med Sci (Paris)*. 2009 Nov;25(11):984-6.
- Velasco, D., Del Mar, M., Cartelle, M., Beceiro, A., Perez, A., Molina, F., Moure, R., Villanueva, R., Bou, G. (2005) Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2005;55(3):379-382.
- Veloso, T.R., Chaouch, A., Roger, T., Giddey, M., Vouillamoz, J., Majcherzyk, P., Que, Y., Rousson, V., Moreillon, P., Entenza, J.M. (2013) Use of a human-like low-grade bacteremia

model of experimental endocarditis to study the role of *Staphylococcus aureus* adhesins and platelet aggregation in early endocarditis. *Infect Immun.* 2013 Mar;81(3):697-703.

- Veras, J. F., Do, Carmo, L. S., Tong, L. C., Shupp, J. W., Cummings, C., Dos Santos, D. A., Cerqueira, M. M., Cantini, A., Nicoli, J. R., Jett, M. (2008) "A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcal* isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil", *Int. J. Infect. Dis.*, 12, 4, (2008), 410-415.
- Verdier, I., Durand, G., Bes, M., Taylor, K. L., Lina, G., Vandenesch, F., Fattom, A.I.; Etienne, J. (2007) Identification of the Capsular Polysaccharides in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates by PCR and Agglutination Tests. *J Clin Microbiol.*, 45(3): 725–729.
- Verhegghe, M., Pletinckx, L.J., Crombé, F., Vandersmissen, T., Haesebrouck, F., Butaye, P., Heyndrickx, M., Rasschaert, G. (2012) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in pig farms and multispecies farms. *Zoonoses Public Health.* 60(5):366-74.
- Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., Wulf, M. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming *Emerg Infect Dis.* 2005 Dec;11(12):1965-6.
- Wagenvoort, J.H.T. (2000) Dutch measures to control MRSA and the expanding European Union. *Eurosurveillance* 2000; 5: 26-8.
- Walker, R.D., Dowling, P.M. (2006) Fluoroquinolones. In *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4th ed., Ames, Blackwell publishing, 2006. 263-284.
- Wals, H. T.R., Howe, R.A. (2002) The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol.* 56: 657-675.
- Walther, B., Wieler, L.H., Vincze, S., Antão, E.M., Brandenburg, A., Stamm, I., Kopp, P. A., Kohn, B., Semmler, T., Lübke-Becker, A. (2012) MRSA variant in companion animals. *Emerg Infect Dis.* 2012 Dec; 18(12): 2017–2020.
- Walther, B., Friedrich, A.W., Brunnberg, L., Wieler, L.H., Lübke-Becker, A. (2006) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veterinary medicine: a "new emerging pathogen"? *Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr.* 119, 222–232.
- Weese, J.S., Avery, B.P., Reid-Smith, R.J. (2010) Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. *Letters in Applied Microbiology* Volume 51, Issue 3.
- Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.E., Kolonay, J.F., Shetty, J., Killgore, G.E., Tenover, F.C. (2003) Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science.* 302: 1569-1571.
- Werckenthin, C., Cardoso, M., Martel, J.L., Schwarz, S. (2001) Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet Res* 2001;32(3-4). 341-362. © INRA, EDP Sciences.
- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H. A., Nouwen, J. L. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet. Infect. Dis.* 2005, 5: 751 – 762.
- Wertheim, H.F., Van Kleef, M., Vos, M.C., Ott, A., Verbrugh, H.A., Fokkens, W. (2006) Nose picking and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2006. 27(8): p. 863-7. Pathogenic staphylococci in poultry L.A. Devriese Faculty of Veterinary Medicine, University of Gent Coupure 1, 24, B-9000 Gent, Belgium.
- Westin, L., Miller, C., Vollmer, D., Canter, D., Radtkey, R., Nerenberg, M., O'Connell, J.P. (2001) Antimicrobial resistance and bacterial identification utilizing a microelectronic chip array. *J Clin Microbiol* 2001; 39(3). 1097-1104.
- Witte, W., Strommenger, B., Stanek, C., Cuny, C. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 255–258.
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial Resistance: Global report on surveillance. 2014 <http://www.who.int/drug-resistance/documents/surveillance-report>.

- Xu, Y., Rivas, J.M., Brown, E.L., Liang, X., Höök, M. (2004) Virulence potential of the staphylococcal adhesin CNA in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen. *J Infect Dis.* 15 juin 2004;189(12):2323-33.
- Yamasaki O., Yamaguchi T., Sugai M., Chapuis –Cellier C ., Arnaud F., Vandenesch F., Etienne J., Lina J.(2005) Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins .*J Clin Microbiol* 43(4) :1890-1893.
- Yoshimura, H., Ishimaru, M., Kojima, A. (2002) Minimum inhibitory concentrations of 20 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Japan. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002 ; 49(9).457-460.
- Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., Gotz, F.(2008) “Characterization of toxin production of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from food and starter cultures”, *Int. J. Food Microbiol.*, 127, 3, (2008), 246-251.
- Zhang, K., McClure, J.A., Elsayed, S., Conly, J.M. (2008) Novel *Staphylococcal* cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ; 53(2):531-40.
- Zhang, K., Sparling, J., Chow, B.L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D.L., Gregson, D.B., Louie, T., Conly, J.M.(2004) New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4947-4955.

ANNEXES

Annexe 1. Composition de certains milieux

- **Milieu de transport pour écouvillons Axon Lab AG**

Le bouillon nutritif est destiné à l'enrichissement des *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA; méthicillino-résistant *Staphylococcus aureus*) et *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (MSSA; méthicillino-sensible *Staphylococcus aureus*) à partir de prélèvements cliniques. Le bouillon d'enrichissement staphylocoques peut en outre être utilisé comme milieu de transport pour écouvillons.

- **Gélose pour la conservation des souches**

Peptone	10.0 g
Extrait de viande.....	5.0 g
Chlorure de sodium	5.0 g
Agar	10.0 g
pH= 7.3	

Annexe 2

- **Test de la catalase**

Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes ;

Ajouter quelques colonies identiques de la souche à tester .

Observer l'apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase + .

Pas de bulles : catalase –

- **Test de la coagulase libre**

0,5 ml de bouillon cœur-cervelle déjà incubé avec la souche à tester pendant 18 à 24 h à 35 ±2°C, additionné de 0,5 ml de plasma oxalaté ;

Homogénéiser et incubé à 35 ±2°C à l'étuve.

L'observation est possible à partir de 30 min et jusqu'à 24 heures d'incubation.

Si coagulation du plasma : souche coagule +, orientation vers *S.aureus* , dans le cas contraire , orientation vers SCN.

Résumé :

Depuis quelques années et dans plusieurs pays, le portage du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline(SARM) chez l'homme et chez l'animal pose un sérieux problème surtout suite à la confirmation de son transfert éventuel de l'animal à l'homme et vice versa et surtout dans les lieux de confinement .

Ce travail a pour objectifs, la détermination du portage du SARM chez certaines espèces animales notamment la volaille et les bovins et l'étude de leurs profils d'antibio-résistance.

Au total 32000 écouvillonnages en provenance de quatre wilayas du centre du pays sont analysés durant la période de 2009 à 2014.

24000 sont d'origine aviaire avec 8000 des poules pondeuses, 8000 poulets de chair et 8000 de dindes chair et 8000 proviennent des bovins. La prévalence du portage de *Staphylococcus aureus* est de 55 % chez les bovins ,42% chez les poules pondeuses, 12 % chez les poulets de chair et de 43% chez la dinde de chair .Les prévalences des SARM enregistrées sont de 31%,56% et 50% puis 0% respectivement chez les bovins, les poules pondeuses , les poulets de chair et la dinde de chair. La résistance à la vancomycine est nulle pour toutes les souches testées.

Les SARM isolées à partir de la volaille pour les deux types d'élevages présentent une résistance croisée aux aminoglycosides, aux fluoroquinolones, aux macrolides, sulfamides et aux cyclines. Toutes les souches SARM, présentent une résistance croisée aux fluoroquinolones, macrolides, aminoglycosides, cotrimoxazole et aux cyclines.

Les isolats de SARM prélevés à partir des bovins présentent des résistances croisées de 12% avec les aminoglycosides ,31% avec les cyclines,16% avec les quinolones, 19% avec les macrolides . Les *Staphylococcus aureus* sensibles à la méthicilline(SARM) identifiés à partir de cette espèce présentent majoritairement une résistance croisée aux aminosides, cyclines, quinolones et macrolides mais par contre tous les isolats de *Staphylococcus aureus* étaient sensibles à la gentamicine et au cotrimoxazole.La diffusion des SARM chez différentes espèces animales peut poser un problème de santé publique nécessitant la détermination et la compréhension des caractères de résistances aux antibiotiques. En effet ; l'application d'une politique de dépistage des animaux porteurs peut permettre de lutter contre ces germes en évitant leur dissémination au sein des populations et aboutir ainsi à développer des stratégies de prévention.

Mots clés : Bovin, Volaille, Portage , *Staphylococcus aureus*, SARM .

Summary :

In recent years and in several countries, the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in humans and animals is a serious problem, especially following the confirmation of its possible transfer from animals to humans especially in the confinement areas.

The objectives of this study are to determine the carriage of MRSA in certain animal species, particularly poultry and cattle, and their antimicrobial resistance profiles.

A total of 32000 swabs collected from four departments in northern region of Algeria are analyzed during the period from 2009 to 2014.

24000 are of avian origin of which 8000 were from laying hens ,8000 from broiler chickens and 8000 were from flesh turkeys. A Total 8000 samples were from bovine origin.

The prevalence of carriage of *Staphylococcus aureus* is 55% in cattle, 42% in laying hens, 12% in broilers and 43% in broiler turkeys. The recorded prevalence of MRSA is 31%. % and 50% then 0% respectively in cattle, laying hens, broilers and flesh turkey. Resistance to vancomycin is zero for all strains tested.

MRSA isolated from poultry for both types of farms is cross-resistant to aminoglycosides, fluoroquinolones, macrolides, sulfonamides and cyclins. All SASM strains have cross-resistance to fluoroquinolones, macrolides, aminoglycosides, cotrimoxazole and cyclins.

MRSA isolates from cattle show cross-resistance of 12% with aminoglycosides, 31% with cyclins, 16% with quinolones, 19% with macrolides. Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) identified from this species predominantly cross-resistance to aminoglycosides, cyclins, quinolones, and macrolides, but all *Staphylococcus aureus* isolates were sensitive to gentamicin and cotrimoxazole. MRSA in different animal species can pose a public health problem requiring the determination and understanding of the characters of antibiotic resistance. Indeed ; the application of a screening policy for carrier animals can help fight against these germs by preventing their spread within populations and thus lead to develop prevention strategies.

Key words: Cattle, Poultry, Carriage , *Staphylococcus aureus*, MRSA.

الملخص:

في السنوات الأخيرة وفي العديد من البلدان، يعد نقل المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) في البشر والحيوانات مشكلة خطيرة، لا سيما بعد تأكيد انتقالها المحتمل من الحيوانات إلى البشر وخاصة في مناطق الحبس. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد نقل هذه الجرثومة في أنواع حيوانية معينة، لا سيما الدواجن والماشية، ودراسة ملامح مقاومة مضادات الميكروبات.

تم تحليل 32000 عينة أجريت على الحيوانات التي اختيرت للمعينة على مستوى أربع محافظات من وسط الجزائر خلال الفترة من عام 2009 إلى عام 2014.

24000 من أصل الطيور من بينها 8000 من الدجاج البياض، 8000 من دجاج اللحم و 8000 عينة من الديك الرومي و 8000 عينة من أصل بقري.

معدل انتشار المكورات العنقودية الذهبية هو 55 ٪ عند الأبقار، 42 ٪ عند الدجاج البياض ، 12 ٪ عند الدجاج اللحم و 43 ٪ لدى الديك الرومي . انتشار نقل المكورات العنقودية الذهبية اتصف بالأرقام التالية 42 ٪ لدى الدجاج البياض، و 12 ٪ لدى دجاج اللحم و 55 ٪ لدى الأبقار، في حين كان لدى الديك الرومي 43 ٪ من نقل المكورات العنقودية الذهبية. مقاومة الفانكوميسين هي صفر لجميع السلالات التي تم اختبارها.

معدل انتشار بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين هو 57 ٪، 50 ٪، 31 ٪ ثم صفر، على التوالي عند الدجاج البياض، دجاج اللحم، الأبقار ولدى الديك الرومي. المقاومة للمضاد الحيوي الفنكومييسين منعدمة لدى جميع السلالات التي تم اختبارها.

بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين المعزولة من الأبقار تتمتع بنفس المقاومة المتعددة ولكن بدون مقاومة السلفوناميد، لكن بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية الغير مقاومة للميثيسيلين أبدت في الغالب مقاومة للأمينوغليكوزيدات، السايكلونات، الكينولونات والماكروليدات، لكن جميع السلالات المعزولة من المكورات العنقودية الذهبية كانت حساسة للجنتاميسين والكوتريموكساسول.

استنتاج هذه النسبة العالية من المقاومة للمضادات الحيوية لدى بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين عند الدواجن والأبقار أوجب علينا تطبيق استراتيجيات للوقاية والسيطرة على هذا الوباء.

الكلمات الدالة: المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين، مقاومة المضادات الحيوية، الدواجن، الأبقار .

Résumé :

Depuis quelques années et dans plusieurs pays, le portage du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) chez l'homme et chez l'animal pose un sérieux problème surtout suite à la confirmation de son transfert éventuel de l'animal à l'homme et vice versa et surtout dans les lieux de confinement.

Ce travail a pour objectifs, la détermination du portage du SARM chez certaines espèces animales notamment la volaille et les bovins et l'étude de leurs profils d'antibio-résistance. Au total 32000 écouvillonnages en provenance de quatre wilayas du centre du pays sont analysés durant la période de 2009 à 2014. 24000 sont d'origine aviaire avec 8000 des poules pondeuses, 8000 poulets de chair et 8000 de dindes chair et 8000 proviennent des bovins.

La prévalence du portage de *Staphylococcus aureus* est de 55 % chez les bovins, 42% chez les poules pondeuses, 12 % chez les poulets de chair et de 43% chez la dinde de chair. Les prévalences des SARM enregistrées sont de 31%, 56% et 50% puis 0% respectivement chez les bovins, les poules pondeuses, les poulets de chair et la dinde de chair. La résistance à la vancomycine est nulle pour toutes les souches testées. Les SARM isolées à partir de la volaille pour les deux types d'élevages présentent une résistance croisée aux aminoglycosides, aux fluoroquinolones, aux macrolides, sulfamides et aux cyclines. Toutes les souches SARM, présentent une résistance croisée aux fluoroquinolones, macrolides, aminoglycosides, cotrimoxazole et aux cyclines. Les isolats de SARM prélevés à partir des bovins présentent des résistances croisées de 12% avec les aminoglycosides, 31% avec les cyclines, 16% avec les quinolones, 19% avec les macrolides. Les *Staphylococcus aureus* sensibles à la méthicilline (SASM) identifiés à partir de cette espèce présentent majoritairement une résistance croisée aux aminosides, cyclines, quinolones et macrolides mais par contre tous les isolats de *Staphylococcus aureus* étaient sensibles à la gentamicine et au cotrimoxazole. La diffusion des SARM chez différentes espèces animales peut poser un problème de santé publique nécessitant la détermination et la compréhension des caractères de résistances aux antibiotiques. En effet ; l'application d'une politique de dépistage des animaux porteurs peut permettre de lutter contre ces germes en évitant leur dissémination au sein des populations et aboutir ainsi à développer des stratégies de prévention.

Mots clés : Bovin, Volaille, Portage, *Staphylococcus aureus*, SARM.

Summary :

In recent years and in several countries, the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in humans and animals is a serious problem, especially following the confirmation of its possible transfer from animals to humans especially in the confinement areas. The objectives of this study are to determine the carriage of MRSA in certain animal species, particularly poultry and cattle, and their antimicrobial resistance profiles.

A total of 32000 swabs collected from four departments in northern region of Algeria are analyzed during the period from 2009 to 2014. 24000 are of avian origin of which 8000 were from laying hens, 8000 from broiler chickens and 8000 were from flesh turkeys. A Total 8000 samples were from bovine origin.

The prevalence of carriage of *Staphylococcus aureus* is 55% in cattle, 42% in laying hens, 12% in broilers and 43% in broiler turkeys. The recorded prevalence of MRSA is 31%, 56% and 50% then 0% respectively in cattle, laying hens, broilers and flesh turkey. Resistance to vancomycin is zero for all strains tested. MRSA isolated from poultry for both types of farms is cross-resistant to aminoglycosides, fluoroquinolones, macrolides, sulfonamides and cyclins. All SARM strains have cross-resistance to fluoroquinolones, macrolides, aminoglycosides, cotrimoxazole and cyclins. MRSA isolates from cattle show cross-resistance of 12% with aminoglycosides, 31% with cyclins, 16% with quinolones, 19% with macrolides. Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) identified from this species predominantly cross-resistance to aminoglycosides, cyclins, quinolones, and macrolides, but all *Staphylococcus aureus* isolates were sensitive to gentamicin and cotrimoxazole. MRSA in different animal species can pose a public health problem requiring the determination and understanding of the characters of antibiotic resistance. Indeed ; the application of a screening policy for carrier animals can help fight against these germs by preventing their spread within populations and thus lead to develop prevention strategies.

Key words: Cattle, Poultry, Carriage, *Staphylococcus aureus*, MRSA.

المخلص:

في السنوات الأخيرة وفي العديد من البلدان، يعد نقل المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) في البشر والحيوانات مشكلة خطيرة، لا سيما بعد تأكيد انتقالها المحتمل من الحيوانات إلى البشر وخاصة في مناطق الحبس.

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد نقل هذه الجرثومة في أنواع حيوانية معينة، لا سيما الدواجن والماشية، ودراسة ملامح مقاومة مضادات الميكروبات.

تم تحليل 32000 عينة أجريت على الحيوانات التي اختبرت للمعانة على مستوى أربع محافظات من وسط الجزائر خلال الفترة من عام 2009 إلى عام 2014.

24000 من أصل الطيور من بينها 8000 من الدجاج البياض، 8000 من دجاج اللحم و8000 عينة من الديك الرومي و8000 عينة من أصل بقر.

معدل انتشار المكورات العنقودية الذهبية هو 55 % عند الأبقار، 42 % عند الدجاج البياض، 12 % عند الدجاج اللحم و43 % لدى الديك الرومي. انتشار نقل المكورات العنقودية

الذهبية اتصف بالأرقام التالية 42 % لدى الدجاج البياض، و12 % لدى دجاج اللحم و55 % لدى الأبقار، في حين كان لدى الديك الرومي 43% من نقل المكورات العنقودية الذهبية.

مقاومة الفانكوميسين هي صفر لجميع السلالات التي تم اختبارها.

معدل انتشار بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين هو 31 %، 50 %، 57 %، 31% ثم صفر، على التوالي عند الدجاج البياض، دجاج اللحم، الأبقار ولدى الديك الرومي.

المقاومة للمضاد الحيوي الفانكوميسين منعدمة لدى جميع السلالات التي تم اختبارها.

بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين المعزولة من الأبقار تتمتع بنفس المقاومة المتعددة ولكن بدون مقاومة السلفوناميد، لكن بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية

الغير مقاومة للميثيسيلين أبدت في الغالب مقاومة للأمينوغليكوزيدات، السايكلينات، الكينولونات والماكروليدات، لكن جميع السلالات المعزولة من المكورات العنقودية الذهبية كانت

حساسة للجنتاميسين والكوتريموكساسول.

استنتاج هذه النسبة العالية من المقاومة للمضادات الحيوية لدى بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين عند الدواجن والأبقار أوجب علينا تطبيق استراتيجية للوقاية

والسيطرة على هذا الوباء.

الكلمات الدالة: المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين، مقاومة المضادات الحيوية، الدواجن، الأبقار.