

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



**UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA**

**Faculté des Sciences**

**Département de biochimie**

**THESE**

En vue de l'obtention du diplôme

**de Doctorat en microbiologie**

Spécialité : **Microbiologie Appliquée**

Thème :

**Les Staphylocoques : sensibilité aux antibiotiques et profil  
moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline**

Présentée et soutenue par

**Mohamed Amine ALIOUA**

Devant le JURY

Directeur de thèse : **Pr. Mazouz DEKHIL**

Président de jury : **Pr Djamila GACEMI-KIRANE**

Examineur : **Pr Abdelaziz TOUATI**

Examineur : **Pr. Djamel-Eddine BENOURETH**

Examineur : **Pr. Sabrina NEDJAI**

**Université d'Annaba**

**Université d'Annaba**

**Université de Béjaia**

**Université de Guelma**

**Université d'Annaba**

ANNEE : 2014-2015

## **Remerciements**

Je commence par remercier **Dieu le tout Puissant** qui m'a donné la capacité d'achever ce travail et qui m'a aidé à dépasser toutes les difficultés que j'ai rencontrées. Je lui demande de guider mes pas dans le chemin qui méritera son approbation.

### **A mon président de thèse le Professeur Djamila GACEMI-KIRANE,**

Vous me faites le très grand honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail. Vos qualités professionnelles et votre rigueur sont pour moi des exemples à suivre. J'espère que notre compagnonnage va perdurer dans le temps malgré la distance.

### **A mon directeur de thèse le Professeur Mazouz DEKHIL,**

Je vous remercie pour m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire. Vous avez toujours été disponible pendant mon stage ainsi que la rédaction de ma thèse. La pertinence de vos remarques et la justesse de vos corrections sont pour moi un exemple de rigueur et je vous en remercie. Je m'engage, à mon tour, à transmettre l'esprit de compagnonnage que vous m'avez inculqué.

Aux membres du jury,

### **A Madame le Professeur Sabrina NEDJAI,**

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

### **A Monsieur le Professeur Abdelaziz TOUATI,**

Vous avez bien voulu vous intéresser à ce travail et accepter avec gentillesse de faire partie de ce jury et de juger notre travail malgré vos nombreuses occupations. Nous vous en remercions.

**A Monsieur le Professeur Djamel-Eddine BENOURETH,**

Je vous suis profondément reconnaissant d'avoir accepté de siéger à ce jury malgré vos nombreuses occupations.

**A Monsieur le Docteur Kamel AMOURA,**

Vous avez participé patiemment à l'élaboration de ce travail, votre gentillesse, votre disponibilité souvent à des heures tardives m'ont énormément aidée. Vous trouvez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

**A mon père,**

Pour sa confiance réitérée pendant toute la thèse, et qui m'a toujours encouragé durant toutes ces années.

**A ma mère,**

Pour son amour, sa tendresse et ses prières, et son encouragement durant toutes ces années.

**A mon frère et ma sœur,**

Pour nos éternels fous rires.

**A tout le personnel médical et paramédical** du service de microbiologie de l'hôpital Dorban – Annaba.

**A tous ceux** qui, de près ou de loin ont participé à notre formation.

Mes derniers remerciements et non les moindres, s'adressent à ma femme. Elle est simplement le pilier de toutes mes constructions et la base de tous mes projets. Elle a su, tout au long de cette thèse, réfréner mes "ras le bol" et m'encourager dans ma voie. Son soutien a été sans faille et je lui serai éternellement reconnaissant. Elle est la clef de ma réussite, sans elle à mes côtés, cette réalisation n'aurait pas la même saveur.

Table des matières	
Acronymes et abréviations .....	11
Liste des figures .....	14
Liste des tableaux .....	15
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b> .....	16
<b>CHAPITRE 2 : REVUE DE LITTERATURE</b> .....	19
<b>1. <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	20
<b>1.1. Caractéristiques générales</b> .....	20
<b>1.2. Portage de <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	21
<b>1.3. Infections à <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	22
<b>1.4. Facteurs de virulence et physiopathologie</b> .....	23
<b>1.4.1. Facteurs intervenant dans la colonisation, l'adhésion, l'invasion, la diffusion</b> 23	
<b>1.4.1.1. La protéine A</b> .....	23
<b>1.4.1.2. La protéine de liaison au collagène</b> .....	23
<b>1.4.1.3. La protéine de liaison à la fibronectine</b> .....	23
<b>1.4.1.4. La protéine de liaison au fibrinogène (<i>clumping factor</i>)</b> .....	23
<b>1.4.1.5. Les sidérophores</b> .....	23
<b>1.4.1.6. La coagulase</b> .....	24
<b>1.4.1.7. La staphylokinase</b> .....	24
<b>1.4.1.8. La FAME</b> .....	24
<b>1.4.2. La résistance à la phagocytose</b> .....	26
<b>1.4.2.1. Les exopolysaccharides capsulaires</b> .....	26
<b>1.4.2.2. L'apoptose des cellules épithéliales</b> .....	26
<b>1.4.3. Entérotoxines, <i>TSST-1</i>, et exfoliatines</b> .....	26
<b>1.4.4. Activité superantigénique</b> .....	26
<b>1.4.5. Rôle du système <i>agr</i> dans la régulation des facteurs de virulence</b> .....	27
<b>2. <i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline</b> .....	27
<b>2.1. Emergence du SARM</b> .....	27
<b>2.2. Caractéristiques moléculaires du SARM</b> .....	28
<b>2.2.1. Gène <i>mecA</i> et cassette chromosomique staphylococcique</b> .....	28
<b>2.2.2. Composition de la SCCmec</b> .....	29
<b>2.2.2.1. Complexe <i>ccr</i></b> .....	29
<b>2.2.2.2. Complexe <i>mec</i></b> .....	31
<b>2.2.2.3. Les régions J</b> .....	31

2.2.1.	Nomenclature de SCCmec.....	32
2.2.2.	La leucocidine de Panton-Valentine.....	35
2.3.	Méthodes de détection de la résistance à la méticilline .....	36
2.3.1.	Identification de l'espèce <i>S. aureus</i> .....	36
2.3.2.	Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF .....	37
2.3.3.	Test céfoxitine.....	39
2.3.4.	Screening test à l'oxacilline.....	39
2.3.5.	Détection du gène <i>mecA</i> par PCR.....	40
2.3.6.	Détection rapide des SARM.....	40
2.3.7.	La résistance à la méticilline due au variant <i>mecA<sub>LGA25I</sub></i> .....	41
2.4.	Typage moléculaire de SARM.....	43
2.4.1.	Profil de macro restriction génomique par électrophorèse en champs pulsé (pulsotype ou analyse PFGE).....	43
2.4.2.	Techniques basées sur la PCR .....	44
2.4.2.1.	La PCR multiplex .....	44
2.4.2.2.	La PCR en temps réel ( <i>Real time PCR</i> ou <i>RT-PCR</i> ).....	45
2.4.2.3.	La Rep PCR ( <i>Repetitive Palindromic Extragenic Elements PCR</i> ).....	45
2.4.2.4.	La RAPD ( <i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i> ) .....	46
2.4.3.	Techniques basés sur le séquençage .....	46
2.4.3.1.	<i>Multilocus sequence typing (MLST)</i> .....	46
2.4.3.2.	Typage du gène <i>spa</i> .....	47
2.4.4.	Puce à ADN.....	47
3.	Epidémiologie du SARM.....	49
3.1.	Epidémiologie du SARM-H.....	49
3.2.	Principaux clones mondiaux de SARM-H.....	49
3.3.	Epidémiologie du SARM communautaires.....	50
3.3.1.	Origine du SARM-C .....	50
3.3.2.	Définition du SARM-C .....	51
3.3.3.	La prévalence du SARM-C .....	51
3.3.3.1.	La situation aux États-Unis : la souche USA300 .....	51
3.3.3.2.	Les SARM communautaires en Europe .....	52
3.3.3.3.	La situation en Algérie .....	53
3.3.4.	Infections à SARM-C.....	53
3.3.5.	Emergence du SARM-C comme cause d'infections associées aux soins.....	53
3.3.6.	Implications de l'émergence du SARM-C comme pathogène hospitalier .....	54

3.4.	<b>Facteurs de risques d'acquisition de SARM</b>	55
3.5.	<b>Un nouveau clone de SARM émergeant : ST398</b>	55
4.	<b>Antibiotiques anti-staphylococciques</b>	57
4.1.	<b>Introduction</b>	57
4.2.	<b>Acide pseudomonique</b>	59
4.2.1.	<b>Mécanisme d'action de la mupirocine</b>	59
4.2.2.	<b>Mécanisme de résistance</b>	59
4.3.	<b>Aminoglycosides ou Aminosides</b>	60
4.3.1.	<b>Mécanisme d'action des aminosides</b>	60
4.3.2.	<b>Mécanisme de résistance</b>	60
4.4.	<b>Antibiotiques phosphoniques</b>	61
4.4.1.	<b>Mécanisme d'acion des antibiotiques phosphoniques</b>	61
4.4.2.	<b>Mécanisme de résistance</b>	61
4.5.	<b><math>\beta</math>-Lactamines</b>	61
4.5.1.	<b>Mécanisme d'action des <math>\beta</math>-lactamines</b>	62
4.5.2.	<b>Mécanisme de résistance</b>	62
4.5.2.1.	<b>Résistance aux <math>\beta</math>-lactamines par production de <math>\beta</math>-lactamases</b>	62
4.5.2.2.	<b>Résistance à la méticilline</b>	62
4.5.2.3.	<b>Autres mécanisme de résistance à la méticilline</b>	63
4.6.	<b>Fluoroquinolones</b>	63
4.6.1.	<b>Mécanisme d'action des fluoroquinolones</b>	63
4.6.2.	<b>Mécanisme de résistance</b>	64
4.7.	<b>Fusidanines</b>	64
4.7.1.	<b>Mécanisme d'action des fusidanines</b>	64
4.7.2.	<b>Mécanisme de résistance</b>	64
4.8.	<b>Glycopéptides</b>	65
4.8.1.	<b>Mécanisme d'action des glycopeptides</b>	65
4.8.2.	<b>Mécanisme de résistance</b>	65
4.9.	<b>Lipopeptides</b>	66
4.9.1.	<b>Mécanisme d'action des lipopeptides</b>	66
4.9.2.	<b>Mécanisme de résistance</b>	66
4.10.	<b>Macrolides, Lincosamides et Synergystines (MLS)</b>	66
4.10.1.	<b>Mécanisme d'action des macrolides, lincosamides et synergystines</b>	67
4.10.2.	<b>Mécanisme de résistance</b>	67
4.11.	<b>Oxazolidinones</b>	68

4.11.1.	Mécanisme d'action des oxazolidinones.....	68
4.11.2.	Mécanisme de résistance .....	68
4.12.	Phénicolés.....	69
4.12.1.	Mécanismes d'action des phénicolés .....	69
4.12.2.	Mécanisme de résistance .....	69
4.13.	Rifamycines .....	69
4.13.1.	Mécanisme d'action des rifampycines .....	70
4.13.2.	Mécanisme de résistance .....	70
4.14.	Sulfamides et Triméthoprime .....	70
4.14.1.	Mécanisme d'action des sulfamides en association ou non avec le triméthoprime .....	70
4.14.2.	Mécanisme de résistance .....	71
4.15.	Tétracyclines et Glycylcyclines .....	71
4.15.1.	Mécanisme d'action des tétracyclines et des glycylcyclines.....	71
4.15.2.	Mécanisme de résistance .....	71
5.	Mesures et control des infections à SARM.....	75
5.1.	Dépistages des patients .....	75
5.2.	Dépistage du personnel .....	75
5.3.	Isolement et précaution barrière.....	75
5.4.	Hygiène des mains .....	76
<b>CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES .....</b>		<b>77</b>
1.	Plan de l'étude .....	78
2.	Lieu et période de l'étude .....	78
3.	Procédure de l'étude .....	79
3.2.	Critères d'inclusion et de non-inclusion .....	79
3.4.	Etude bactériologique.....	80
3.4.1.	Prélèvement et transport.....	80
3.4.2.	Protocole de recherche de <i>S. aureus</i> dans les produits pathologiques .....	80
3.4.3.	Antibiogramme .....	83
3.4.4.	Recherche de la résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> à l'oxacilline .....	83
3.4.4.1.	Test de diffusion du disque de céfoxitine.....	83
3.4.4.2.	Test de screening à l'oxacilline .....	83
3.4.5.	Conservation des souches .....	85
3.4.6.	Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF .....	85
3.4.6.1.	Principe.....	85

3.4.6.2.	Préparation de la matrice IVD HCCA .....	86
3.4.6.3.	Préparation des échantillons.....	87
3.4.6.4.	Validation des résultats .....	87
3.5.	Etude moléculaire .....	89
3.5.1.	Préparation du tampon de lyse.....	89
3.5.3.	Identification moléculaire des souches de <i>S. aureus</i> et détection du gène <i>mecA</i>	90
3.5.3.1.	Principe.....	90
3.5.3.2.	Produits de biologie moléculaire .....	91
3.5.3.3.	Souches de contrôle .....	91
3.5.3.4.	Mode opératoire.....	91
3.5.3.5.	Mesure de la fluorescence .....	95
3.5.3.6.	Résultats .....	96
3.5.4.	Détection de la leucocidine de Panton-valentine (PVL) .....	96
3.5.5.	Typage du gène <i>spa</i> .....	98
3.5.5.1.	La PCR .....	98
3.5.5.2.	Réaction de séquence.....	102
3.5.5.3.	Purification par <i>Sephadex</i> .....	103
3.5.5.4.	Détermination du Spa type : Alignement des séquences avec <i>Bioedit</i> ...	105
3.5.6.	Multilocus sequence typing (MLST) .....	106
3.5.6.1.	La PCR .....	106
3.5.6.2.	Réaction de séquence.....	108
3.5.6.3.	Purification par <i>sephadex</i> .....	109
3.5.6.4.	Détermination du <i>Sequence Type</i> (ST).....	109
3.5.7.	Typage SCCmec .....	110
3.5.7.1.	M-PCR 1 (complexe <i>ccr</i> ) .....	110
3.5.7.2.	M-PCR 2 (complexe <i>mec</i> ) .....	112
3.5.7.3.	Interprétation SCCmec .....	113
3.2.	Analyse statistique .....	115
<b>CHAPITRE 4 : RESULTATS</b> .....		117
1.	Présentation des prélèvements .....	118
2.	<i>S. aureus</i> : données épidémiologiques et cliniques .....	120
2.1.	Identification de l'espèce <i>S. aureus</i> .....	120
2.2.	Taux de densité d'incidence des infections à <i>S. aureus</i> .....	120
2.3.	Caractéristiques démographiques des patients .....	121

2.4.	Répartition des patients selon les hôpitaux .....	122
2.5.	Répartition des patients selon le type de service.....	122
2.6.	Les différentes infections causées par <i>S. aureus</i> .....	124
2.7.	Répartition des infections à <i>S. aureus</i> selon les tranches d'âge.....	124
2.8.	Répartition des infections à <i>S. aureus</i> selon l'origine de l'acquisition.....	126
3.	SARM et SASM : données épidémiologiques et cliniques.....	127
3.1.	Fréquence des SARM .....	127
3.2.	Taux de densité d'incidence des infections à SARM .....	127
3.3.	Répartition des SARM et SASM selon le sexe et les tranches d'âge des patients 128	
3.4.	Répartition des SARM et SASM selon le type de service .....	129
3.5.	Répartition des infections à <i>S. aureus</i> en fonction des souches SARM et SASM 131	
3.6.	Répartition des infections à <i>S. aureus</i> selon la résistance à la pénicilline et l'origine d'acquisition.....	133
3.7.	Répartition des infections à SARM selon le type d'infection et l'origine d'acquisition .....	133
4.	Résistance des Staphylocoques aux antibiotiques .....	136
4.1.	Résistance des SARM aux antibiotiques .....	136
4.1.1.	Fréquence de la résistance.....	136
4.1.2.	Profil de résistance des SARM.....	138
4.2.	Résistance des SASM aux antibiotiques .....	139
4.2.1.	Fréquence de la résistance.....	139
5.	Caractéristiques moléculaire des SARM .....	142
5.1.	Typage du gène <i>spa</i> .....	142
5.1.1.	Séquences du gène <i>spa</i> .....	142
5.1.1.1.	<i>spa</i> t037 .....	142
5.1.1.2.	<i>spa</i> t932 .....	142
5.1.1.3.	<i>spa</i> t044 .....	142
5.1.1.4.	<i>spa</i> t376 .....	143
5.1.1.6.	<i>spa</i> t005 .....	143
5.1.2.	Répartition des souches SARM en fonction du type <i>spa</i> .....	144
5.1.3.	Répartition des SARM-H et/ou SARM-C selon le <i>spa</i> type .....	145
5.1.4.	Profil de résistance aux antibiotiques des différents <i>spa</i> types.....	146
5.2.	Typage SCC <i>mec</i> .....	148
5.2.1.	Résultats de la M-PCR 1 (complexe <i>ccr</i> ).....	148

5.2.2.	Résultats de la M-PCR 2 (complexe <i>mec</i> ) .....	148
5.2.3.	Répartition des souches SARM en fonction de la cassette chromosomique staphylococcique .....	149
5.2.4.	Répartition des SARM-H et/ou SARM-C selon le type SCC <i>mec</i> .....	150
5.3.	MLST et identification des différents clones isolés.....	151
5.4.	La toxine de Panton-Valentine .....	152
5.4.1.	Fréquence de la PVL .....	152
5.4.2.	Distribution de la PVL selon les clones isolés .....	152
5.4.3.	Caractéristiques des infections à SARM PVL+ .....	152
5.4.4.	Comparaison entre infections à SARM PVL+ et SARM PVL-.....	153
5.4.5.	Résistance aux antibiotiques des SARM PVL+ versus SARM PVL-.....	154
5.4.6.	Résistance des SARM PVL+ selon l'origine d'acquisition.....	155
<b>CHAPITRE 5 : DISCUSSION</b> .....		158
1.	La situation épidémiologique .....	159
1.1.	Incidence et fréquence de SARM en milieu hospitalier .....	160
1.2.	Contrôle du SARM .....	162
1.3.	Facteurs de risque.....	164
1.4.	Epidémiologie des infections à SARM .....	165
2.	Résistance aux autres antibiotiques .....	170
2.1.	Glycopeptides .....	170
2.2.	Aminosides .....	170
2.3.	Macrolides et lincosamides .....	171
2.4.	Fluoroquinolones .....	172
2.5.	Autres antibiotiques .....	172
3.	Epidémiologie moléculaire .....	174
<b>Conclusion</b> .....		179
<b>Bibliographie</b> .....		183
<b>ANNEXES</b> .....		208
<b>Abstract</b> .....		228

## Acronymes et abréviations

<i>ACME</i>	<i>Arginine Catabolic Mobile Element</i>
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AET	Aspiration endotrachéale
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
<i>AK</i>	<i>Adenylate Kinase</i>
<i>AP-PCR</i>	<i>Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction</i>
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
<i>A<sub>w</sub></i>	<i>Activity water</i>
<i>BORSA</i>	<i>Bordeline Staphylococcus aureus</i>
<i>bp</i>	<i>base pair</i>
CA-SFM	Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
<i>CDC</i>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<i>ccr</i>	<i>cassette chromosome recombinase</i>
CLIN	Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DPCA	Dialyse péritonéale continue ambulatoire
Eau BM	Eau de qualité biologique moléculaire
ECBU	Examen cyto-bactériologique des urines
<i>ECDC</i>	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EGM	Elément Génétique Mobile
<i>FAME</i>	<i>Fatty Acid Modifying Enzyme</i>
GISA	<i>Glycopeptide-Intermediate S. aureus</i>
GSC	Gélose au Sang Cuit
GSF	Gélose au Sang Frais
<i>HVR</i>	<i>Hypervariable region</i>
I	Intermédiaire

IAS	Infections associées aux soins
IgG	Immunoglobuline G
IRH	Infections respiratoires hautes
<i>ITS</i>	<i>Internal Transcribed Space</i>
<i>ISS</i>	<i>Injury Severity Score</i>
<i>LA-MRSA</i>	<i>Livestock Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
<i>MALDI-TOF</i>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight</i>
<i>MDR</i>	<i>Multi Drug Resistance</i>
<i>MLST</i>	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
<i>MODSA</i>	<i>Modified Staphylococcus aureus</i>
<i>M-PCR</i>	<i>Multiplex PCR</i>
<i>NCCLS</i>	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORL	Oto-rhino-laryngologie (Oreille, nez, larynx)
<i>orf</i>	<i>open reading frame</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDP	Prélèvement protégé distal
PLP	Protéine liant la pénicilline
<i>PFGE</i>	<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>
PM	Poids moléculaire
<i>PVL</i>	<i>Panton-Valentine Leukocidin</i>
<i>QRDR</i>	<i>Quinolone Resistance-Determining region</i>
qsq	quantité suffisante pour
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline
SARM-C	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline d'origine Communautaire
SARM-H	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline Hospitalier
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> Sensible à la Méricilline
Sens	Sensibilité

<i>SCC</i>	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome</i>
<i>SCCmec</i>	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SCN	Staphylocoques à Coagulase Négative
<i>Spa</i>	<i>Staphylococcus aureus protein A gene</i>
Spec	Spécificité
<i>SSTIs</i>	<i>Skin and Soft Tissue Infections</i>
SSSS	<i>Staphylococcal scalded skin syndrome</i>
UI	Unité internationale
USI	Unité de soins intensifs
R	Résistant
<i>RAPD</i>	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
<i>Rep-PCR</i>	<i>Repetitive Palindromic Extragenic Elements PCR</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Real time PCR</i>
VISA	<i>Vancomycine-Intermediate S. aureus</i>
Ti	Taux de densité d'incidence
<i>TSA</i>	<i>Tryptocase Soja Agar</i>
<i>TSS</i>	<i>Toxic shock syndrome</i>
<i>Triplex RT-PCR</i>	<i>Triplex Real Time PCR</i>
<i>UDG</i>	<i>Uracil-DNA Glycosylase</i>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie électronique (X 20000).....	20
<b>Figure 2</b> : La structure de la cassette <i>SCCmec</i> . .....	30
<b>Figure 3</b> : Les différents types de <i>SCCmec</i> [66]. .....	33
<b>Figure 4</b> : Schéma du protocole de confirmation des colonies de <i>S. aureus</i> . .....	81
<b>Figure 5</b> : Test de la recherche de la résistance à l'oxacilline chez <i>S. aureus</i> .....	84
<b>Figure 6</b> : Principe de la spectrométrie de masse [224]. .....	86
<b>Figure 7</b> : Séquence d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne.....	88
<b>Figure 8</b> : Exemple de quelques fluochromes. ....	95
<b>Figure 9</b> : Graphique des produits d'une RT-PCR.....	96
<b>Figure 10</b> : Migration sur gel d'agarose des produits de PCR purifiées .....	102
<b>Figure 11</b> : M-PCR 1 <i>SCCmec</i> locus <i>ccr</i> .....	
<b>Figure 12</b> : M-PCR 2 <i>SCCmec</i> locus <i>mec</i> .....	
.....	114
<b>Figure 13</b> : Prélèvements analysés au laboratoire de microbiologie du CHU d'Annaba .....	118
<b>Figure 14</b> : Nombre de souches de <i>S. aureus</i> incluses dans notre étude.....	120
<b>Figure 15</b> : Répartition des patients selon les tranches d'âge et le sexe.....	121
<b>Figure 16</b> : Répartition des patients au sein des hôpitaux du CHU d'Annaba .....	122
<b>Figure 17</b> : Répartition des patients en fonction des services .....	123
<b>Figure 18</b> : Répartition des différentes infections à <i>S. aureus</i> isolées chez les patients.....	124
<b>Figure 19</b> : Répartition des infections à <i>S. aureus</i> en fonction des tranches d'âge. ....	125
<b>Figure 20</b> : Distribution des souches SARM et/ou SASM selon le sexe et les tranches d'âge des patients. ....	128
<b>Figure 21</b> : Distribution des souches SARM et SASM selon le type de service.....	130
<b>Figure 22</b> : Pourcentage des infections causées par les SARM et/ou SASM.....	132
<b>Figure 23</b> : Distribution des infections à SARM et/ou SASM en fonction de leur origine d'acquisition.....	133
<b>Figure 24</b> : Distribution des souches SARM et/ou SASM selon le type d'infection et l'origine d'acquisition. ....	134
<b>Figure 25</b> : Comparaison de la résistance aux antibiotiques entre SASM et SARM .....	141
<b>Figure 26</b> : Distribution des SARM-H et/ou SARM-C selon le spa type .....	145
<b>Figure 27</b> : Résultats de l'amplification du locus <i>ccr</i> de la <i>SCCmec</i> de quelques souches SARM.....	148
<b>Figure 28</b> : Résultats de l'amplification du locus <i>mecA</i> de la <i>SCCmec</i> de quelques souches SARM.....	148
<b>Figure 29</b> : Répartition des SARM en selon le type <i>SCCmec</i> .....	149
<b>Figure 30</b> : Distribution des SARM-H et/ou SARM-C selon le type <i>SCCmec</i> .....	150
<b>Figure 31</b> : Pourcentage des STs isolées. ....	151
<b>Figure 32</b> : Distribution des SARM-H et/ou SARM-C selon le Sequence Type .....	152
<b>Figure 33</b> : Répartition des patients PVL+ et PVL- selon les tranches d'âge .....	153
<b>Figure 34</b> : Test d'agglutination (Staphaurex). .....	213

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> [5].	25
<b>Tableau 2</b> : Les différents types <i>SCCmec</i> identifiés à ce jour chez <i>S. aureus</i> [61].	34
<b>Tableau 3</b> : Méthodes rapides de détection de SARM.	42
<b>Tableau 4</b> : Gènes de résistance portés par des EGM non- <i>SCCmec</i> [5].	73
<b>Tableau 5</b> : Protocole d'amplification d'une triplex RT-PCR [99,225].	92
<b>Tableau 6</b> : Amorces et sondes fluorogéniques utilisées pour la première triplex RT-PCR [99].	94
<b>Tableau 7</b> : Amorces et sondes fluorogéniques utilisées pour la deuxième triplex RT-PCR [225].	97
<b>Tableau 8</b> : Protocole d'amplification d'une PCR classique pour typage du gène <i>spa</i> [226].	99
<b>Tableau 9</b> : séquences d'amorces utilisées pour MLST [227].	107
<b>Tableau 10</b> : Protocole d'amplification d'une PCR classique pour MLST [104].	108
<b>Tableau 11</b> : Séquences d'amorces utilisées pour le typage des <i>SCCmec</i> [66].	111
<b>Tableau 12</b> : Protocole d'amplification de M-PCR1 et M-PCR 2 [66].	112
<b>Tableau 13</b> : Répartition des prélèvements positifs selon leur nature.	119
<b>Tableau 14</b> : Répartition des infections à <i>S. aureus</i> selon l'origine d'acquisition et les services pédiatrie/adultes.	126
<b>Tableau 15</b> : Les infections associées aux soins et les infections d'acquisition communautaire dues au SARM et au SASM.	135
<b>Tableau 16</b> : Fréquence de la résistance des SARM aux antibiotiques.	137
<b>Tableau 17</b> : Phénotypes de résistance des souches SARM aux antibiotiques.	138
<b>Tableau 18</b> Fréquence de la résistance des SASM aux antibiotiques.	140
<b>Tableau 19</b> : Types <i>spa</i> des souches SARM	144
<b>Tableau 20</b> : Profils de résistance des différents <i>spa</i> types isolés.	146
<b>Tableau 21</b> : Comparaison de la résistance aux antibiotiques entre les Souches SARM PVL+ et SARM PVL	154
<b>Tableau 22</b> : profils de résistance des souches ST80 selon l'origine d'acquisition.	155
<b>Tableau 23</b> : Profil de résistance aux antibiotiques des 5 souches SARM PVL+ résistantes aux fluoroquinolones (FQR) et des 12 souches SARM PVL- sensibles aux fluoroquinolones (FQR).	156
<b>Tableau 24</b> : Caractéristiques moléculaires et phénotypiques des isolats de SARM.	157
<b>Tableau 25</b> : Les différents prélèvements en vue de diagnostic bactériologique reçus au sein du laboratoire central de microbiologie de l'hôpital Dorban.	209
<b>Tableau 26</b> : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>S. aureus</i>	216

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

---

Les staphylocoques, membres de notre écosystème cutané, ensemble avec les streptocoques et les pneumocoques font partie d'un groupe d'agents pathogènes à Gram positif opportunistes et envahissants, connus sous le nom de cocci pyogènes, responsables d'une variété d'infections humaines [1]. *Staphylococcus aureus*, l'espèce la plus virulente du genre *Staphylococcus*, a émergé comme l'un des agents pathogènes humains les plus importants, et a été au cours des dernières décennies, une des principales causes des infections hospitalières et communautaires [2]. *S. aureus* provoque un large éventail d'infections cliniques, allant des infections courantes telles que les infections de la peau et des tissus mous à des infections meurtrières comme la septicémie, la pneumonie et les toxinoses, telles que le syndrome du choc toxique [3]. L'une des raisons qui expliquent le succès de ce pathogène humain est son 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. [4].

Les isolats de *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) sont résistants à toutes les pénicillines disponibles et autres  $\beta$ -lactamines. Leur résistance est liée à leur grande plasticité génomique qui peut être acquise ou apportée par un plasmide ou d'autres éléments mobiles (cassette chromosomique staphylococcique, transposons, bactériophages, Séquences d'insertion) [5]. Les infections liées aux SARM hospitaliers (SARM-H) ont visiblement imposé un lourd fardeau sur les ressources en soins de santé [6]. En particulier, dans certains pays africains où elles ont atteint des taux très élevés, notamment en Algérie (à Tlemcen) avec un taux de l'ordre de 52% [7].

Autrefois confinés principalement aux hôpitaux, aux autres milieux spécialisés dans les soins de santé et aux patients fréquentant ces établissements. Cependant, depuis le milieu des années 1990, il y a eu une explosion dans le nombre d'infections à SARM observé chez des populations n'ayant pas étaient exposées aux facteurs de risque d'acquisition de SARM-H [8]. Cette augmentation a été associée à l'identification de nouvelles souches de SARM, appelées SARM

d'origine communautaire (SARM-C), qui ont été responsables d'une grande proportion de la charge de morbidité accrue observée durant la dernière décennie.

Après une première étape d'émergence communautaire et de propagation mondiale, le SARM-C envahi maintenant le milieu hospitalier et est de plus en plus impliqué dans des infections associées aux soins (IAS) [9]. Les clones de SARM-C ont un potentiel épidémique élevé et produisent d'importants facteurs de virulence tels que la leucocidine de Pantone-Valentine (PVL) [10], ce qui soulève des préoccupations importantes dans le contexte de diffusion hospitalière. Aux Etats-Unis, le clone pandémique de SARM-C USA300 est actuellement en train de supplanter les lignées historiques de SARM-H au sein des hôpitaux [9,11]. En Europe, le bien connu clone européen SARM-C ST80 SCCmecIV est actuellement le plus prévalent mais sa prédominance est très variable d'un pays à un autre [12]. Par exemple, 25% des infections à SARM-H sont causées par le ST80-IVc en Grèce [13] alors qu'en France, elles ne représentent que 3,6% des souches de SARM cliniques [14].

L'épidémiologie moléculaire du SARM-H en Afrique du Nord a été à peine décrite. Toutefois, les données disponibles suggèrent que le clone ST80-SCCmec IVc est également diffusé dans les hôpitaux du Maghreb, y compris en Algérie, où il représente 75 % des isolats de SARM-H dans les hôpitaux d'Alger [15–17]. L'objectif de notre étude était d'étudier dans un premier volet la sensibilité aux antibiotiques, dans un second volet étudier le profil moléculaire du SARM-H dans le CHU d'Annaba, et dans un dernier volet évaluer la propagation du clone Européen ST-80 de SARM-C en milieu hospitalier tout en utilisant une variété de méthodes moléculaires : typage spa, MLST, SCCmec, ainsi que la détection des gènes codant la leucocidine de Pantone Valentine.

# CHAPITRE 2

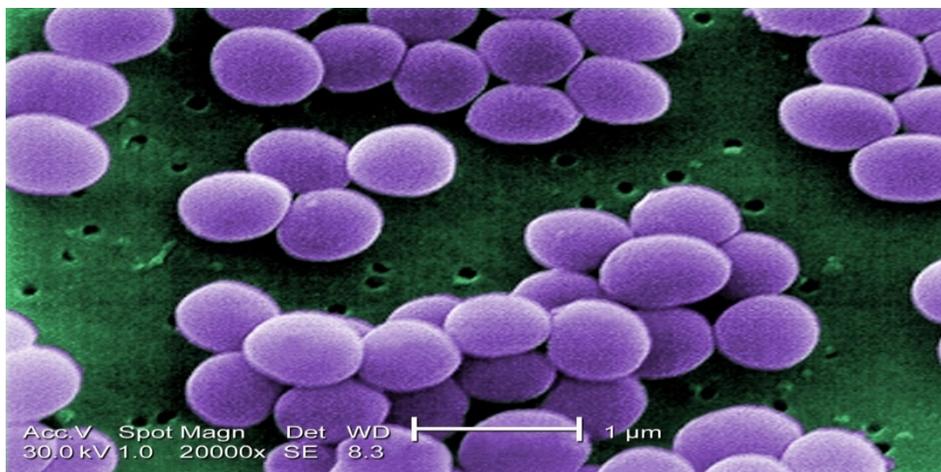
## REVUE DE LITTERATURE

---

## 1. *Staphylococcus aureus*

### 1.1. Caractéristiques générales

*Staphylococcus aureus* est un pathogène humain majeur qui a été mis en évidence en 1881 par Alexander Ogston [18]. Après une analyse microscopique d'infections purulentes, Ogston a découvert des bactéries rondes, groupées en forme de grappes de raisin d'où l'association des termes grecs *staphyle*, grappe de raisin et *kokkos*, grain. Il est maintenant établi que *S. aureus* est une bactérie Gram-positif, aéro-anaérobie facultative qui produit une catalase et une coagulase, et qui peut tolérer une activité en eau très réduite ( $A_w = 0,83$ ). Dans des conditions optimales, la division cellulaire se produit approximativement tous les 20 min avec un diamètre de cellule allant de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$ . *S. aureus* est capable de croître sur une large gamme de milieux de culture, sélectifs (p. ex. les géloses Chapman, et Baird Parker), ou non sélectifs (p. ex. un milieu gélosé enrichi en sang, une gélose nutritive, ou une gélose cœur-cerveille). Sur une gélose au sang, les souches « typiques » de *S. aureus* donnent des colonies lisses, convexes avec des diamètres de 1~3 mm, de couleur jaune dorée due aux caroténoïdes, et sont souvent hémolytiques ( $\alpha$ -hémolysine) [19].



**Figure 1 :** Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (X 20000)

<http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine/>

## 1.2. Portage de *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* est défini comme un commensal humain normal ayant le potentiel de provoquer des infections opportunistes. La niche écologique primaire de cette espèce étant les fosses nasales antérieures ou *vestibulum nasi* [20]. D'après des études, on distingue trois modèles de portage nasal de *S. aureus* chez les individus sains : porteurs persistants, porteurs intermittents et non-porteurs [21–23]. D'autres études montrent que près de 20% (de 10 à 35%) des individus sont porteurs persistants, environ 30% sont porteurs intermittents (de 20 à 75%), et environ 50% (de 16 à 69%) sont non-porteurs [22,24–26].

Les enfants ont des taux plus élevés de portage persistant que les adultes [21,27]. En effet, les taux varient considérablement avec l'âge, passant d'environ 45% durant les 8 premières semaines à 21% en six mois [28]. Plus de 70% des nouveau-nés ont au moins une culture positive nasale avec *S. aureus* [28]. Les études montrent que la transition du portage persistant au portage intermittent ou non portage se produit durant l'adolescence [21,23].

En conséquence, les prélèvements à la recherche d'un portage doivent comprendre les fosses nasales. Cependant, plusieurs travaux suggèrent que d'autres sites de portage sont possibles en absence de portage nasal :

- Selon Acton et al., 2009, l'espèce bactérienne *S. aureus*, y compris le SARM, trouve sa niche écologique dans le nez humain, mais est également capable de coloniser les intestins et la région péritonéale [29].
- Après avoir effectué un dépistage multi sites (nez et gorge) chez 2966 individus pour le portage de *S. aureus*, Mertz et al., 2007, ont trouvé un total de 1100 personnes (37,1%) qui étaient des porteurs nasaux, et 379 personnes (12,8%) qui étaient porteurs de *S. aureus* uniquement au niveau de la gorge. Le dépistage de gorge augmente significativement la sensibilité de détection des porteurs de *S. aureus* de 25,7% [30].

### 1.3. Infections à *Staphylococcus aureus*

*S aureus* est typiquement porté de façon asymptomatique par l'homme et les animaux. Cependant, il est responsable d'une large gamme d'états pathologiques nécessitant un traitement. La nature et l'étendue de la maladie dépendent des caractéristiques de la souche infectante, la susceptibilité de l'hôte et la voie d'entrée. Les infections les plus courantes sont les infections de la peau et des tissus mous (*SSTIs* pour « *Skin and soft tissue Infections* ») incluant : la folliculite, le furoncle, l'anthrax, l'abcès, la cellulite, l'impétigo, les plaies chirurgicales postopératoires [31], et les ostéomyélites [32]. Les souches portant des toxines particulières peuvent être associées à des états pathologiques spécifiques, y compris le syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée (*SSSS* pour « *Staphylococcal scalded skin syndrome* ») [33], le syndrome du choc toxique (*TSS* pour « *Toxic shock syndrome* ») [34], la toxi-infection alimentaire [35], et la pneumonie nécrosante [36]. *S. aureus* peut aussi provoquer une septicémie ou *sepsis*, lorsque le flux sanguin est infecté. Entre 1995 et 2002, 20% de septicémie nosocomiales aux États-Unis ont été causés par *S. aureus* [37]. De plus, les infections à *S. aureus* aux États-Unis causées par le SARM (64% en 2003) [38], ont été associées statistiquement à une mortalité plus élevée [39], de longs séjours à l'hôpital (7 vs 9 jours  $p = 0,045$ ), et des coûts de traitement plus élevés par rapport au SASM (\$19,212 vs \$26,424,  $p=0.008$ ) [40].

## **1.4. Facteurs de virulence et physiopathologie**

*S. aureus* exprime de nombreux facteurs de virulence : protéines de surface qui initialisent la colonisation des tissus de l'hôte, facteurs inhibant la phagocytose, toxines qui lèsent les cellules et provoquent les syndromes pathologiques (**Tableau 1**) [41].

### **1.4.1. Facteurs intervenant dans la colonisation, l'adhésion, l'invasion, la diffusion**

#### **1.4.1.1. La protéine A**

Elle se lie au fragment Fc des immunoglobulines et inhibe l'opsonophagocytose. Elle peut jouer le rôle d'une adhésine au début de l'infection intravasculaire [19].

#### **1.4.1.2. La protéine de liaison au collagène**

L'attachement au collagène est nécessaire et suffisant pour l'adhésion de *S. aureus* au cartilage in vitro. Ce récepteur du collagène pourrait constituer un facteur de virulence important dans les infections osseuses et articulaires à *S. aureus* [41].

#### **1.4.1.3. La protéine de liaison à la fibronectine**

Les récepteurs pour la fibronectine contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques et aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang. Ils ont ainsi un rôle important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers [19].

#### **1.4.1.4. La protéine de liaison au fibrinogène (*clumping factor*)**

C'est une protéine de surface qui provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Elle constitue un facteur de virulence pour les plaies et les infections sur corps étrangers [42].

#### **1.4.1.5. Les sidérophores**

Le fer est indispensable à la croissance des staphylocoques et l'une des méthodes de défense de l'hôte est la diminution de la fraction disponible du fer (fixation à la lactoferrine et à la transferrine). *S. aureus* s'adapte en sécrétant des sidérophores capables de capter et de transporter le fer dans la bactérie. La quantité produite dépend de l'origine pathologique des souches. Le niveau de la production de sidérophores a été corrélé avec la forte expression de certaines protéines. Certaines souches virulentes de

*S. aureus* pourraient produire 2 types de sidérophores : un premier dont la production serait limitée par des gènes chromosomiques et un second synthétisé par des plasmides à des quantités beaucoup plus élevées [43].

#### **1.4.1.6. La coagulase**

La coagulase est une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte. La thrombine ainsi activée transforme le fibrinogène en fibrine. C'est un marqueur de l'identification de *S. aureus* (test de la coagulase en tube). Il n'existe pas d'argument évident indiquant un rôle de la coagulase dans la virulence des souches [44].

#### **1.4.1.7. La staphylokinase**

La staphylokinase, activateur du plasminogène en plasmine conduit à la dislocation du thrombus riche en bactéries, et ainsi à la formation de localisations septiques secondaires. Elle possède également la propriété de cliver les IgG, et le fragment C3b du complément qui vont se fixer à la paroi bactérienne, afin d'empêcher la phagocytose [45]. Elle est aussi impliquée dans la résistance à la réponse innée de l'hôte. Lors d'une infection, les neutrophiles sécrètent des peptides bactéricides appelés  $\alpha$ -défensines. La liaison de la staphylokinase à ces peptides abolit leurs propriétés anti-microbiennes [46].

#### **1.4.1.8. La FAME**

Une enzyme modifiant les acides gras (*fatty acid modifying enzyme*) est exprimée par 80% des souches de *S. aureus*. Elle semble constituer un facteur de virulence important dans les abcès par modification des lipides antibactériens de l'hôte [47].

**Tableau 1:** Facteurs de virulence de *S. aureus* [5].

Toxine/facteur de virulence (gène)	Pouvoir pathogène/mécanisme d'action
Protéine A ( <i>spa</i> )	Invasion des défenses de l'hôte.
Collagène lié à la protéine ( <i>cna</i> )	Adhésion au collagène.
Fibronectine liée à la protéine A, B ( <i>fnbA, B</i> )	Attachement à la fibronectine.
Clumping factor A, B ( <i>clf A, B</i> )	Adhésion au fibrinogène.
Staphyloferrin A, B ( <i>SA, SB</i> )	Fixation à la lactoferrine et à la transferrine.
Coagulase ( <i>coa</i> )	Liaison au fibrinogène.
Staphylokinase ( <i>sak</i> )	Invasion des défenses de l'hôte.
FAME	Modification des lipides antibactériens de l'hôte.
Toxine exfoliative A, B, D ( <i>eta, etb, etd</i> )	Cause le syndrome de la peau ébouillantée (SSSS), impétigo bulbeux, syndrome de Ritter chez le nouveau-né.
Entérotoxine A-E, H ( <i>sea-e, h</i> )	Super antigène (SAg), toxi-infection alimentaire.
$\alpha$ -hémolysine ( <i>hla</i> )	Forme des pores à travers la membrane des cellules contaminées.
Hyaluronidase ( <i>hysA</i> )	Invasion des tissus.
Leucocidine de Panton-Valentine ( <i>lukF-PV, lukS-PV</i> )	Invasion de l'hôte, lyse des phagocytes de l'hôte.
Staphylococcal superantigen-like SSL	Visent les éléments de la réponse immunitaire innée.
TSSST-1( <i>tst</i> )	Invasion des défenses de l'hôte avec des superantigènes responsables de TSS.

## **1.4.2. La résistance à la phagocytose**

### **1.4.2.1. Les exopolysaccharides capsulaires**

La production locale par *S. aureus* d'exopolysaccharides provoque la formation d'un biofilm, engluant les bactéries et constituant ainsi une forme de résistance au site de colonisation. Des polysaccharides capsulaires sont retrouvés chez 90% des souches cliniques de *S. aureus* [46].

### **1.4.2.2. L'apoptose des cellules épithéliales**

Après avoir adhéré aux protéines de surface d'une cellule épithéliale, *S. aureus* est ingéré. Dès la première heure suivant l'ingestion, *S. aureus* est soit logé dans un endosome, soit libre dans le cytoplasme. Après avoir proliféré, *S. aureus* peut induire l'apoptose des cellules qu'il envahit, mais peut également persister dans les cellules sous forme de variants qui se caractérisent par une faible activité métabolique et une moindre virulence [48].

## **1.4.3. Entérotoxines, TSST-1, et exfoliatines**

Ces différentes toxines sont impliquées dans les toxémies staphylococciques : *TSST-1* et le *SSSS* pour les exfoliatines, et les toxi-infections alimentaires pour les entérotoxines [19].

## **1.4.4. Activité superantigénique**

Les superantigènes sont des molécules qui se fixent de manière non spécifique au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, induisant ainsi l'activation polyclonale non spécifique d'un grand nombre de lymphocytes T, provoquant ainsi une réaction immunitaire très importante et disproportionnée qui peut mener à un choc septique. La *TSST-1* et plusieurs types d'entérotoxines ont une activité superantigénique [20].

#### **1.4.5. Rôle du système *agr* dans la régulation des facteurs de virulence**

L'expression coordonnée des facteurs de virulence en fonction des signaux extracellulaires est contrôlée par un régulateur, le système *agr* (pour « *accessory gene regulator* »). A faible densité bactérienne, le système n'est pas activé, permettant l'expression des facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion. La multiplication bactérienne s'accompagne de l'activation du système *agr*, avec une diminution de l'expression des facteurs d'adhésion et une stimulation de l'expression des facteurs d'invasion et de dissémination de l'infection. Ainsi, le système *agr* fonctionnerait comme un *quorum sensor*, informant la bactérie sur la densité des staphylocoques dans son environnement [49].

## **2. *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline**

### **2.1. Emergence du SARM**

Le *S. aureus* résistant à la méricilline, plus communément appelé SARM, a été une préoccupation des professionnels de la santé depuis sa découverte initiale au début des années 1960 [50]. L'histoire de SARM a commencé avec le développement des antibiotiques, au début des années 1940, la pénicilline G était très active sur les staphylocoques. Cependant, dès les années 1950 des souches résistantes sont apparues : elles étaient en effet capables d'hydrolyser l'antibiotique en synthétisant une enzyme appelée pénicillinase capable de rompre le cycle  $\beta$  lactame. Aujourd'hui, la fréquence des souches productrices de pénicillinase atteint 90% au sein des staphylocoques [19].

Pour déjouer ce mécanisme de résistance, les laboratoires pharmaceutiques ont synthétisé dans les années 1960 de nouvelles pénicillines, capables de résister à l'action hydrolytique de la pénicillinase des staphylocoques par l'adjonction d'un radical volumineux sur le cycle  $\beta$ -lactame. Ce sont les pénicillines semi synthétiques du groupe M (méricilline, qui n'est plus commercialisable, oxacilline, cloxacilline et dicloxacilline) [51].

En 1961, un hôpital en Angleterre a signalé la découverte d'une souche de *S. aureus* résistante à la méticilline. Depuis cette date, les SARM se sont diffusés de façon épidémique dans les hôpitaux, pour devenir vers 1980 multi-résistants aux antibiotiques et pandémiques [52]. La prévalence du SARM a été déterminée dans huit pays africains entre 1996 et 1997, elle était en dessous de 10% en Algérie et en Tunisie [53].

En 1997, les SARM n'ont plus été limités au secteur hospitalier, mais de nouveaux clones ont été décrits comme responsables d'infections communautaires, les premières acquisitions de SARM communautaires ont été observées chez des enfants de zones rurales du Minnesota et du Nord Dakota aux États-Unis [54]. Ces nouvelles souches sont hautement épidémiques et constituent un problème de santé public émergeant au niveau mondial.

## **2.2. Caractéristiques moléculaires du SARM**

### **2.2.1. Gène *mecA* et cassette chromosomique staphylococcique**

La résistance à la méticilline chez les staphylocoques est causée par l'expression de la protéine liant la pénicilline PLP2a codée par le gène *mecA* localisé dans un élément génétique mobile dit : cassette staphylococcique chromosomique (*SCC* pour « *Staphylococcal Cassette Chromosome* ») [55]. *SCCmec* peut être considéré comme un îlot de résistance aux antibiotiques qui transporte le complexe du gène *mecA*, codant pour la résistance aux  $\beta$ -lactamines et contient aussi des transposons et des copies de plasmides qui portent divers gènes de résistance à l'encontre d'autres antibiotiques autres que les  $\beta$ -lactamines [56].

### 2.2.2. Composition de la SCCmec

Cette cassette est formée (i) de complexe du gène *ccr*, (ii) de complexe du gène *mecA*, (iii) d'une région J dont la variation permet de définir des sous-types de cassettes, (iv) d'une séquence d'insertion IS permettant l'inclusion dans le chromosome (**Figure 2**) [57]. La composition de presque tous les éléments SCCmec de *S. aureus* identifiés jusqu'à ce jour peut être présentée comme suit : (orfX) J3-mec-J2-*ccr*-J1 [58]. L'exception constitue la SCCmecVII et la nouvellement décrite SCCmecIX, avec le complexe du gène *ccr* positionné entre les régions J3 et J2 et le complexe du gène *mec* entre les régions J2 et J1 [59,60]. Etant donné que les composants structurels mentionnés ci-dessus jouent un rôle crucial dans la classification des éléments SCCmec ils seront présentés ci-dessous plus en détails :

#### 2.2.2.1. Complexe *ccr*

Il est composé du gène(s) *ccr* entouré par les *orfs*. Les gènes *ccr* codent des *recombinases* site spécifique qui catalysent l'excision et l'intégration de version circulaire des cassettes [47]. Basé sur la composition des gènes *ccr*, deux complexes *ccr* distincts ont été signalés à ce jour, l'un portant deux gènes *ccr* adjacents, *ccrA* et *ccrB*, et le second porte le *ccrC*.

Les gènes *ccrA* et *ccrB* identifiés à ce jour chez les souches de *S. aureus* ont été classés respectivement en quatre et cinq allotypes, donnant six types de complexes *ccr* désignés comme suit : type 1 (*ccrA1B1*), de type 2 (*ccrA2B2*), le type 3 (*ccrA3B3*), type 4 (*ccrA4B4*), type 7 (*ccrA1B6*) et le type 8 (*ccrA1B3*) (**Tableau 2** et **Figure 2**). Toutes les variantes *ccrC* identifiées jusqu'ici ont montré une haute similitude nucléotidique et sont affectées à un seul allotype, *ccrC1*, constituant le type 5 du complexe *ccr* [58,61].

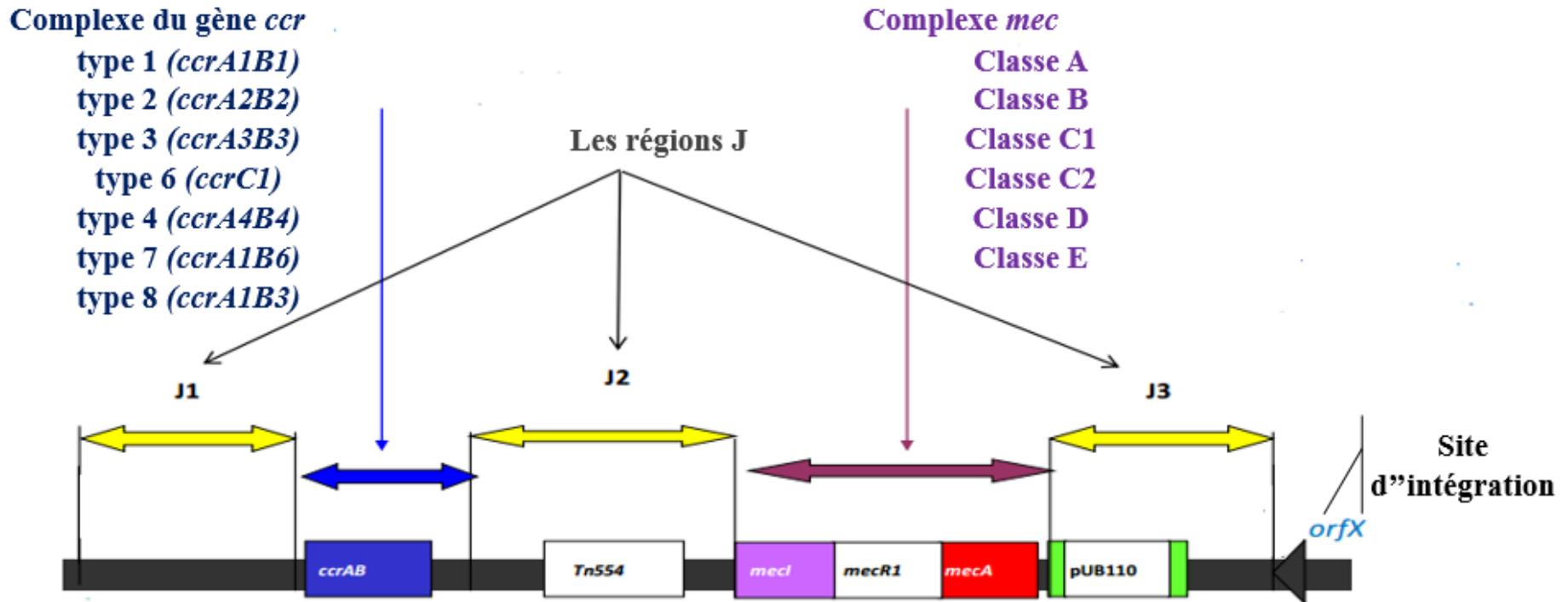


Figure 2: La structure de la cassette *SCCmec*.

### 2.2.2.2. Complexe *mec*

Deux lignées évolutives différentes de complexe *mec* ont été décrites chez *S. aureus*. La première, qui englobe la grande majorité connue et bien caractérisée du complexe *mec*, a été observée dans les isolats de SARM d'origine humaine depuis les années nonante. Le prototype de cette lignée est le complexe *mec* désigné comme la classe A, composé d'un opéron *mec* intacte, d'une région hyper-variable (*HVR* pour «*Hypervariable region*») et la séquence d'insertion *IS431* [62,63]. L'opéron *mec* comprend le gène *mecA*, et en amont de ce dernier se situe ses gènes régulateurs : *mecRI* et *mecI*, codants respectivement pour la transduction du signal et le répresseur. Les différences entre le complexe *mec* de classe A et les autres complexes *mec* de cette lignée, décrites à ce jour, résultent essentiellement en l'insertion des *IS* : *IS1272* ou *IS431*, dans la région des gènes régulateurs (*mecRI* et *mecI*), qui provoquent la suppression complète du *mecI* et, de taille différente, des délétions partielles du *mecRI*. Selon la diversité structurelle de la région *mecI-mecRI*, cinq grandes classes de complexe *mec*, de la lignée dite, ont été définies par IGW-SCC (**Tableau 2** et **Figure2**) [61].

Récemment, les données provenant du projet de séquençage du génome de la souche bovine *LGA251* de *S. aureus*, ont révélé un complexe *mec* d'une seconde lignée évolutive [64]. Ce nouveau complexe, décrit comme : *blaZ-mecA<sub>LGA251</sub>-mecRI<sub>LGA251</sub>-mecI<sub>LGA251</sub>*, constitue la sixième classe définie majeure, affecté comme classe E.

### 2.2.2.3. Les régions J

En dehors des complexes *mec* et *ccr*, essentiels pour les fonctions biologiques de la *SCCmec*, la cassette comprend également trois « *joining regions* » (J1-J3), appelées antérieurement «*junkyard regions*» (**Figure 2**) [65]. Les régions J sont disposées dans le même ordre dans les différentes *SCCmec*. La région J1 est située du côté droit de la cassette, la région J2 entre les complexes *mec* et *ccr* et la région J3 à la jonction chromosomique gauche adjacente à l'*orfX*

[61]. Bien que considérées comme moins importantes en termes de fonctions, ces régions sont épidémiologiquement importantes car elles peuvent servir de cibles pour les plasmides ou les transposons, portant des gènes de résistances aux antibiotiques et aux métaux lourds.

### **2.2.1. Nomenclature de SCCmec**

Depuis que la première *SCCmec* a été caractérisée en 1999, la découverte de nouvelles variantes est devenue de plus en plus fréquente, ce qui a compliqué la classification des principaux types et sous-types. Avec un nombre croissant de types, et de sous-types de *SCCmec* publiés dans la littérature, il est devenu plus qu'évident que, sans une nomenclature régie par des règles internationales approuvées, il serait difficile dans un proche avenir à garder en ordre l'appellation appropriée des nouveaux *SCCmec* émergents. Pour répondre au besoin urgent, « *International Working Group on Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome SCC* » (IWG-SCC) a été créé en 2009.

Ainsi, selon les lignes directrices publiées par IWG-SCC, la classification des *SCCmec* en différents types (*SCCmec typing*) devrait être basée sur la combinaison entre le type du complexe *ccr* et la classe du complexe *mec* présent dans la cassette. Tandis que la classification des variants (*SCCmec subtyping*) devrait être définie par les différences dans les régions J, comme il a été proposé plus tôt par le groupe Hiramatsu [58,61]. En conséquence, *SCCmec* de type I a été décrit comme 1B, indiquant que ce type de *SCCmec* porte un complexe *ccr* de type 1 et un complexe *mec* de classe A. À ce jour, onze types de *SCCmec* ont été définis et désignés comme suit (**Tableau 2** et **Figure 3**) [61].

SCCmec

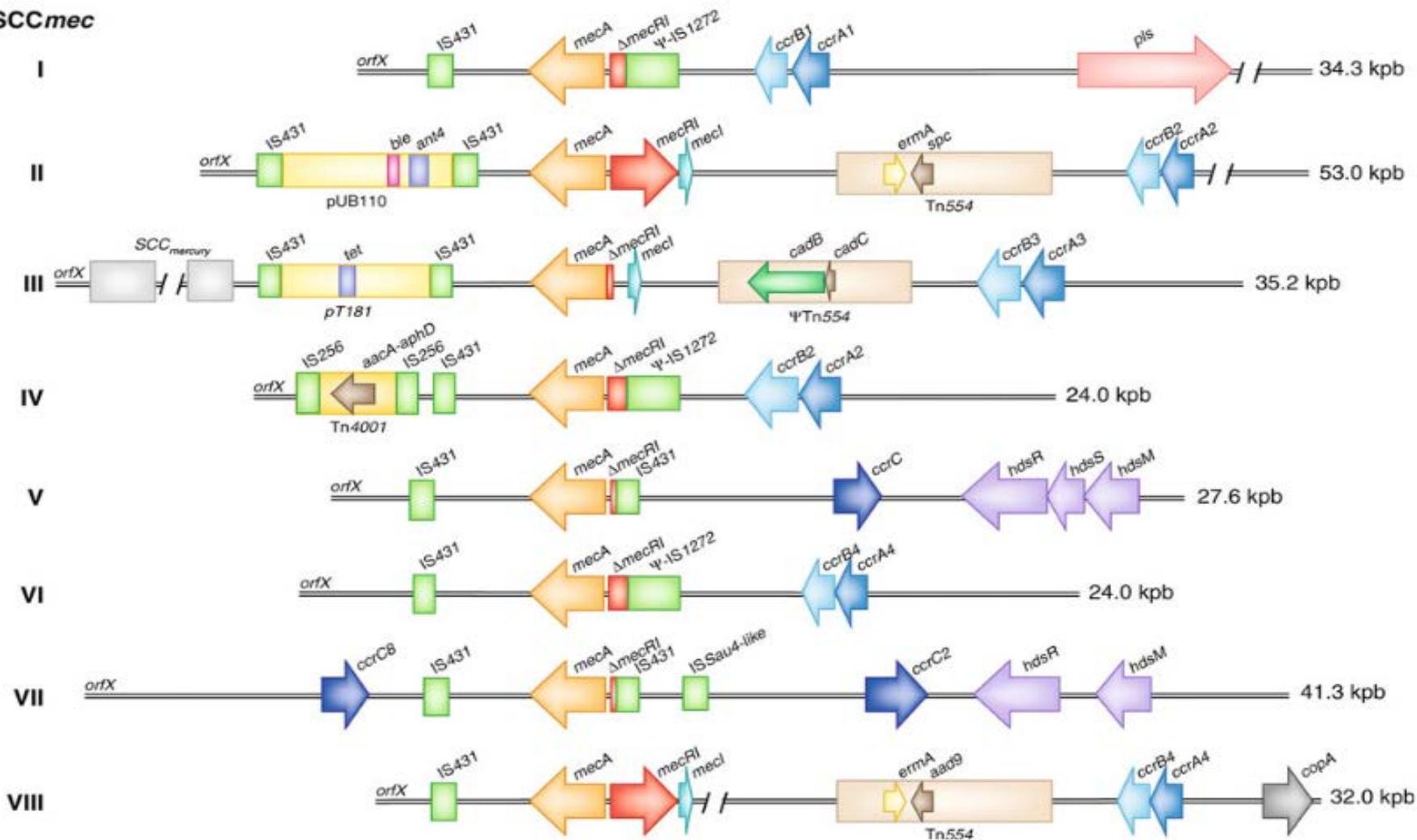


Figure 3 : Les différents types de SCCmec [66].

**Tableau 2** : Les différents types *SCCmec* identifiés à ce jour chez *S. aureus* [61].

Types de <i>SCCmec</i>	Complexes du gène <i>ccr</i>	Complexes du gène <i>mecA</i>	Souches
I	1 (A1B1)*	B (IS431- <i>mecA</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS1272)	Ia (NCTC10442, COL) Ib ( PL72)
II	2 (A2B2)	A (IS431- <i>mecA</i> - <i>mecRI</i> - <i>mecI</i> )	IIa (N315, Mu50, Mu3, MRSA252, JH1) IIb (JCSC3063) IIc (AR05/0.1345) IId (RN7170) IIe (JCSC6833)
III	3 (A3B3)	A (IS431- <i>mecA</i> - <i>mecRI</i> - <i>mecI</i> )	85/2082
IV	2 (A2B2)	B (IS431- <i>mecA</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS1272)	IVa (CA05, MW2, JCSC4744) IVb (8/6-3P, JCSC2127) IVc (81/108, 2314, cm11, JCSC4788) IVg (M03-68) IVh (E-MRSA-15) IVi (JCSC6668) IVj (JCSC6670), IVk
V	5 (C1)	C2 (IS431- <i>mecA</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS431)	V (WIS[WBG8318]) V (5C2&5)b (TSGH17, PM1, JCSC5952) V(5C2&5)c (JCSC6944)
VI	4 (A4B4)	B (IS431- <i>mecA</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS1272)	HDE288
VII	5 (C1)	C1 (IS431- <i>mecA</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS431)	JCSC6082
VIII	4 (A4B4)	A (IS431- <i>mecA</i> - <i>mecRI</i> - <i>mecI</i> )	C10682, BK20781
IX	1(A1B1)	C2 (IS431- <i>mecA</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS431)	JCSC6943
X	7(A1B6)	C1 (IS431- <i>mecA</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS431)	JCSC6945
XI	8(A1B3)	E ( <i>blaZ</i> - <i>mecALGA251</i> - <i>mecRLGA251</i> - <i>mecILGA251</i> )	LGA251

\*Le gène(s) *ccr* composant le complexe du gène *ccr* est entre parenthèse

### **2.2.2. La leucocidine de Panton-Valentine**

Les SARM-C peuvent porter une leucocidine très toxique décrite en 1932 par Panton et Valentine [67]. La PVL est une toxine synergohyménotrope composée de deux protéines distinctes, le composé S (*LukS-PV*) pour « *slow* » et le composé F (*LukF-PV*) pour « *fast* », nommés ainsi en fonction de la vitesse de l'élution en chromatographie, et codés respectivement par les gènes *LukS-PV* et *LukF-PV*. Les deux composants sont sécrétés séparément, mais agissent en synergie sur les membranes cellulaires. La *PVL* est connue pour causer la formation de pores dans plusieurs types cellulaires participant aux défenses de l'hôte comme les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, et les macrophages, en produisant des cytotoxines capables de provoquer une nécrose tissulaire sévère et la destruction des globules blancs [20].

Pratiquement toutes les souches isolées de lésions dermonécrotique primitives et sévères expriment la *PVL*. Cela suggère que la *PVL* est un facteur de virulence important des infections nécrosantes comme le montrent les 16 cas français communautaires de pneumonie staphylococcique nécrosante [68].

Elle a été associée aussi aux *SSTIs* tels que la cellulite, les abcès cutanés, et les furoncles. Cependant, le rôle que joue la *PVL* dans les infections à SARM-C est controversé. Bien qu'elle puisse être associée à la virulence potentiellement élevée des SARM-C à provoquer les *SSTIs*, il est également possible que la leucotoxine agit comme un marqueur épidémiologique plutôt qu'un facteur de virulence [19].

### **2.3.Méthodes de détection de la résistance à la méticilline**

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. D'autres méthodes impliquent l'utilisation de milieux sélectifs développés pour l'identification présomptive des colonies SARM. Il existe également des méthodes telles que la réaction en chaîne de la polymérase (PCR pour « *Polymerase Chain Reaction* ») où l'échantillon peut être testé directement pour le SARM.

#### **2.3.1. Identification de l'espèce *S. aureus***

La présence de *S. aureus* dans un prélèvement pathologique pourrait d'abord être suspectée après un examen direct à la coloration de Gram et/ou bleu de méthylène [69].

Le micro-organisme est isolé en ensemençant le prélèvement pathologique sur un milieu de culture solide tel que la gélose au sang frais (GSF) ou cuit (GSC), gélose Trypticase soja (TSA) ou la gélose nutritive. Les échantillons susceptibles d'être contaminés par d'autres micro-organismes peuvent êtreensemencés sur la gélose Chapman, ce qui permet aux staphylocoques qui sont halotolérantes de pousser. Idéalement, une coloration de Gram d'une colonie doit être effectuée, ainsi que les tests catalase et coagulase [19].

Le test catalase consiste à utiliser le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) pour différencier les staphylocoques des streptocoques qui sont catalase négative. La présence de catalase se caractérise par la formation immédiate de bulles d'oxygènes [19]. Le test coagulase qui met en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma est le principal test caractérisant *S. aureus* en médecine humaine. En médecine vétérinaire, d'autres espèces du genre *Staphylococcus* peuvent avoir une réaction positive telles que *S. intermedius* [19].

Un autre test utile pour identifier *S. aureus* est la production de la désoxyribonucléase thermostable ayant des propriétés endo- et exonucléasiques. *S. aureus* peut être aussi confirmé par des techniques immunologiques en utilisant des particules de latex sensibilisées avec des IgG et du fibrinogène qui lient la protéine A et le facteur agglutinant, respectivement, sur la surface de la cellule bactérienne. Ceux-là sont disponibles dans des kits commerciaux tels que *Staphaurex* ou *Pastaurex* [69].

L'identification de *S. aureus* peut aussi être réalisée à l'aide de galeries biochimiques d'identification miniaturisées, les galeries API (API STAPH et ID 32 STAPH). Ces systèmes utilisent des tests d'acidification ou d'assimilation des sucres et des tests enzymatiques [19].

Outre les 2 galeries API, il existe autres systèmes automatisés.

### **2.3.2. Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF**

L'identification des micro-organismes cliniquement importants est l'une des tâches-clés du laboratoire de microbiologie. Jusqu'à présent, la technique standard restait encore toujours basée sur les galeries 'multicolores' développées par Pasteur et Koch. L'introduction récente de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans les laboratoires de bactériologie médicale a profondément bouleversé la manière d'identifier les micro-organismes isolés d'échantillons biologiques et environnementaux.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF repose sur une technique d'ionisation, mise au point dans les années 80 par [70], et conduisant à l'identification des bactéries par l'analyse de leurs protéines totales (protéines ribosomales et protéines associées aux membranes), il s'agit d'une désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) [71,72].

Le principal avantage de cette technique est le gain de temps significatif pour l'identification des bactéries puisqu'il suffit de quelques minutes à partir du prélèvement d'une colonie isolée sur un milieu de culture solide pour obtenir une identification sécurisée au niveau de l'espèce, là où vingt-quatre heures supplémentaires sont nécessaires avec les techniques d'identification

phénotypiques. De plus, le spectromètre permet un diagnostic d'urgence, notamment en période de garde et l'analyse rapide des flores polymicrobiennes avec mise en route des antibiogrammes adaptés. Autre avantage de taille en faveur de l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des micro-organismes : le coût. C'est une technique ne nécessitant presque pas de matériel de consommation, ce qui est important après un investissement initial important [73].

Parallèlement à son utilisation en routine pour l'identification des microorganismes, la détection de mécanismes de résistance aux antibiotiques représente un intérêt particulier. Quelques études ont montré la capacité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à distinguer les SARM des SASM [74,75].

L'identification des bactéries par spectrométrie de masse dépend étroitement de la richesse et de la qualité de la base de données constituée des spectres de référence. Quelques autres limitations diagnostiques demeurent : la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF ne permet pas de distinguer *Shigella* de *Escherichia coli* et ne semble pas, comme d'ailleurs l'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16S [76], être un outil adapté à l'identification de ces bactéries de grande importance médicale. De même l'identification des mycobactéries, notamment à croissance lente, reste inconstante [73].

Une fois qu'une souche a été identifiée comme étant *S. aureus*, d'autres tests peuvent être effectués pour déterminer si la bactérie est résistante à la méticilline et devrait être classée comme un SARM. Le diagnostic de certitude de la méticillino-résistance repose sur la détection du gène *mecA*. Malheureusement, ce test ne peut être effectué pour l'instant facilement en routine.

### **2.3.3. Test céfoxitine**

Selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) [77], la détection de la résistance des staphylocoques aux pénicillines M (oxacilline, cloxacilline) est recherchée à l'aide d'un disque de céfoxitine (30 µg) et de moxalactam (30 µg) dans les conditions standards de l'antibiogramme des staphylocoques (en milieu de Mueller- Hinton avec un inoculum ~ 10<sup>6</sup> UFC/ml et incubation 18-24 h). En pratique, la simplicité et la meilleure sensibilité du test de la céfoxitine le font recommander. Les souches présentant un diamètre supérieur ou égal à 27 mm (céfoxitine) ou 24 mm (moxalactam) sont sensibles aux isoxazolyl-pénicillines. Les souches présentant un diamètre inférieur à 25 mm (céfoxitine) ou 23 mm (moxalactam) sont résistantes. Pour les souches présentant un diamètre compris entre ces bornes, il est nécessaire de rechercher la PLP2a par un test au latex (dans les conditions indiquées par le fournisseur) après induction (autour du disque de céfoxitine ou de moxalactam) ou le gène *mecA* par PCR.

### **2.3.4. Screening test à l'oxacilline**

Devant tout problème d'interprétation du diamètre d'inhibition de la céfoxitine on effectue un *Screening test* à l'oxacilline. Cette technique est réalisée selon les recommandations du NCCLS à l'aide d'un enseigneur avec un inoculum de 0,5 Mc Farland sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 4 % de NaCl et de 6 µg/ml d'oxacilline. Après une incubation allant de 24 à 48h, la culture de plus d'une colonie de la souche test suffit pour une résistance à l'oxacilline impliquant une résistance à toutes les β-lactamines [78].

### **2.3.5. Détection du gène *mecA* par PCR**

Développée par Mullis et al., 1986, la technique PCR permet l'amplification de l'ADN dont l'objectif est d'avoir une quantité suffisamment importante de l'ADN cible afin de permettre son analyse. Elle repose sur l'hybridation de deux amorces oligonucléotidiques situées aux deux extrémités du fragment de l'ADN chromosomique, parfaitement complémentaires des régions cibles. Ces amorces oligonucléotidiques comportent de façon idéale 20 bases nucléotidiques, il s'agit de réactifs de laboratoire achetés auprès de différents fournisseurs. La séquence de ces amorces est déterminée à partir de la séquence ADN cible déposée dans les banques informatiques de données [79].

L'utilisation des amorces spécifiques permet l'identification de séquences de gènes spécifiques à certaines espèces bactériennes, ainsi la PCR peut être utilisée pour différencier les souches d'une même espèce. Par exemple, tous les SARM ont le gène *mecA*, ainsi l'utilisation d'amorces spécifiques à ce gène permet la différenciation entre les SARM et les SASM. La PCR classique peut donner des résultats en 2-3 heures, en moins d'une heure pour d'autres PCR et peuvent être réalisées directement à partir de prélèvements cliniques, ce qui est utile lorsque le dépistage rapide de SARM est nécessaire [80].

### **2.3.6. Détection rapide des SARM**

Le dépistage conventionnel des SARM repose généralement sur des techniques à base de culture en milieu solide ou liquide permettant de mettre en évidence la résistance à la méticilline à partir de l'antibiogramme. Dans ce cas, avec un prélèvement réalisé à J0, les résultats de l'antibiogramme ne seront disponibles qu'à J2, parfois J3. L'idéal serait de pouvoir disposer de techniques de biologie moléculaire ou autres techniques permettant la détection de la méticillino-résistance à partir des isollements primaires ou directement sur le prélèvement.

Pour la détection rapide des SARM dans les cultures primaires, plusieurs nouvelles méthodes ont été développées au cours des dernières années, en tout premier lieu les milieux chromogènes, le test d'agglutination au latex de la PLP2a, et la PCR *mecA* qui utilise des colonies prélevées sur la première culture. Généralement, ces méthodes peuvent accélérer l'identification de SARM, mais elles ne peuvent pas raccourcir l'étape d'incubation (24-48h) nécessaire après l'arrivée de l'échantillon au laboratoire.

Ainsi, les procédés mentionnés ci-dessus sont utiles en ce qui concerne l'accélération du diagnostic, mais l'économie maximale dans le temps ne dépasse pas 1 jour et par conséquent l'ensemble des avantages de ces méthodes demeure limité. En conséquence, d'autres méthodes de détection rapide ont été développées où la culture primaire n'est plus nécessaire (PCR à partir du prélèvement) et où le temps d'incubation est beaucoup plus court (environ 5 h). Les principales méthodes utilisées pour la détection rapide des SARM sont montrées dans le **tableau 3**.

### **2.3.7. La résistance à la pénicilline due au variant *mecA*<sub>LGA251</sub>**

La récente découverte du variant *mecA*<sub>LGA251</sub>, avec seulement 70% d'homologie nucléotidique du gène conventionnel *mecA* a remis les tests de routine pour la détection du *mecA* et donc la confirmation d'un SARM en question [81]. En effet, la détection de cet homologue *mecA*<sub>LGA251</sub> présente un intérêt clinique certain car il représente environ 6% des SARM [82]. Les nouvelles recommandations pour la détection des SARM devraient prendre en compte la détection de l'homologue *mecA*<sub>LGA251</sub> afin d'augmenter la fiabilité du diagnostic pour la détection des *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline.

**Tableau 3** : Méthodes rapides de détection de SARM.

Test	Distributeur	Concept	Temps d'exécution	Coût/écouvillon	Écouvillon de	[ref]	Données de performance
<b>I- Méthodes non-moléculaires</b>							
<i>MRSASelect</i>	Bio-Rad	Clivage d'un substrat chromogène	18-24h	5.81€	Narines, plaies	[83]	Sens : 93% ; Spec : 97%
<i>Spectra MRSA</i>	Remel		18-24h	5.62€	Narines, hémocultures positives	[84]	Sens : 95.4% ; Spec : 99.7%
<i>ChromID MRSA</i>	bioMérieux		18-24h	/	Narines	[85]	Sens : 94% ; Spec : 96%
<i>BBL CHROMagar MRSAII</i>	Becton Dickinson		20-26h	4.87€	Narines	[86]	Sens : 87% ; Spec : 98,6%
Test rapide <i>3M™ BacLite™</i>	3M compagny	Mesure de l'activité de l'adenylate kinase (AK)	5h	10€(96 échantillons/jour)	Narines, veine	[87]	Sens : 94.6% ; Spec : 96,9%
Clearview Exact PBP2a	Alere	Immuno-chromatographie	5min	8€	Isolements primaires	[88]	Sens : 96,1% ; Spec : 100%
<b>II- Méthodes moléculaires</b>							
<i>Xpert MRSA kit avec plateforme GeneXpert</i>	Cepheid	<i>Smartcycler</i> -Cartouches contenant des billes lyophilisées avec tous les réactifs nécessaires à la PCR en temps réel ayant pour cible la <i>SCCmec</i>	58min	25-35€	Narines	[89]	Sens : 90% ; Spec : 97%
<i>BD GeneOhm MRSA</i>	Becton Dickinson	<i>Smartcycler</i> - PCR en temps réel ayant pour cible la <i>SCCmec</i>	<2h	20€	Narines	[90]	Sens : 98,7% ; Spec : 95,4%
<i>Lightcycler Staphylococcus/MRSA kit</i>	Roche Diagnostics	PCR multi-locus ayant pour cible <i>mecA</i> et la région <i>ITS</i> entre 16S et 23S	<2h	15-20€	Écouvillons (non-spécifié)	[91]	Sens : 92% ; Spec : 98%

## **2.4. Typage moléculaire de SARM**

Le typage bactérien est devenu un outil clinique important pour établir avec certitude la source d'une épidémie, la présence éventuelle d'une chaîne de transmission et son mécanisme. De nombreuses techniques sont disponibles pour différencier les isolats de *S. aureus*, et spécifiquement les SARM. Historiquement, les souches étaient distinguées par des méthodes phénotypiques telles que l'antibiogramme et la lysotypie. Cependant, ces deux méthodes ont leurs limites, comme par exemple les isolats non liés génétiquement ont souvent le même antibiogramme, et de nombreuses souches de *S. aureus* sont non-typables par la lysotypie [92].

Avec le progrès de la biologie moléculaire, de nouvelles méthodes basées sur l'analyse de l'ADN se sont très vite imposées du fait de leur supériorité en reproductibilité et en pouvoir discriminant, on parle alors de méthodes de typage moléculaire, et lorsqu'on utilise une telle méthode pour étudier l'épidémiologie de maladies infectieuses, on parle d'épidémiologie moléculaire [20].

Une panoplie de méthodes a été développée pour le typage moléculaire de SARM et la liste ne cesse de s'allonger. D'une façon générale, on distingue des méthodes de typage basées sur la restriction de l'ADN sur l'amplification d'ADN par PCR ou sur l'analyse de séquence(s) d'ADN [20].

### **2.4.1. Profil de macro restriction génomique par électrophorèse en champs pulsé (pulsotype ou analyse PFGE)**

Parmi les méthodes basées sur la restriction de l'ADN, la *PFGE* est probablement la plus répandue. Cette technique est fondée sur la restriction de l'ADN génomique extrait avec précaution dans une matrice d'agarose par une enzyme dont la fréquence de coupure est rare. L'enzyme *SmaI*, qui reconnaît la séquence CCCGGG, est généralement utilisée pour *S. aureus*.

Ainsi, on obtient un nombre restreint (entre 5 et 20) de taille variant de 10 et 800 kbs qui ne peuvent être séparés que par une électrophorèse en champs pulsés [93].

La PFGE s'est révélée être la méthode la plus discriminante lorsqu'elle était comparée à d'autres méthodes de typage génotypiques ou phénotypiques [94,95]. C'est pourquoi elle est considérée actuellement comme la référence pour le typage de l'espèce *S. aureus* et a été utilisée dans des centaines d'études. Malgré le fait que la méthode est très reproductible dans un même laboratoire, la comparaison de données provenant de différents laboratoires n'est pas toujours aisée. Toutefois, cet inconvénient est de moins en moins important avec l'augmentation de l'utilisation du logiciel *BioNumerics* (Applied Maths, Kortrijk, Belgique). Ce dernier mesure le niveau de concordance entre les pulsotypes des différents échantillons. Cela signifie que les pulsotypes peuvent être rapidement comparés à l'aide d'un ordinateur, ce qui élimine la subjectivité qui était inhérente à la méthode [96].

#### **2.4.2. Techniques basées sur la PCR**

Parmi les méthodes de typage utilisant la PCR on trouve :

##### **2.4.2.1. La PCR multiplex**

La PCR multiplex est l'amplification simultanée de plusieurs séquences cibles dans un même tube réactionnel. Elle a l'avantage de permettre un gain de temps par rapport à une PCR qui utilise un seul couple d'amorces. Néanmoins, la difficulté réside dans l'obtention d'une bonne combinaison d'amorces et d'un mélange réactionnel adapté, afin d'obtenir les produits d'amplification voulus. Du fait de phénomènes de compétition, cette technique est limitée par le nombre de couples d'amorces et on peut actuellement, utiliser cinq voir six couples maximum dans une même réaction. A titre d'exemple, Yao et al., 2010, ont utilisé cette méthode pour la détection des gènes codant pour la PVL et la détermination des génotypes de la *SCC<sub>mec</sub>* [97].

#### **2.4.2.2. La PCR en temps réel (Real time PCR ou RT-PCR)**

La PCR, qu'elle soit appliquée en simplex (utilisation d'un seul couple d'amorces) ou en multiplex (de deux à six couples) est une technique fiable et sensible, mais elle reste globalement qualitative. La PCR quantitative permet d'allier la simplicité et la rapidité de la PCR qualitative avec possibilité de quantifier des produits d'amplification obtenus non pas au final mais tout au long de la réaction donc en temps réel d'où le nom de «PCR en temps réel». A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification d'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale [98].

La PCR en temps réel a été utilisé pour différenciation entre *S. aureus* et les staphylocoques à coagulase négative (SCN), et la détection de la résistance à la méticilline dans les hémocultures en 90min [99].

#### **2.4.2.3. La Rep PCR (Repetitive Palindromic Extragenic Elements PCR)**

Cette technique utilise des amorces spécifiques d'éléments répétés tout au long du génome. Les différences entre les tailles des bandes reflètent le polymorphisme des distances entre les différents éléments répétés le long du génome. Différents éléments répétés ont été utilisés pour le typage de *S. aureus* : *RepMP3*, *interIS256*, *Tn916*. C'est une technique simple peu coûteuse mais qui a un pouvoir discriminant inférieur à celui du PFGE et un manque de reproductibilité entre laboratoire [100].

#### **2.4.2.4. La RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)**

La technique RAPD, également appelée *AP-PCR* est basée sur l'amplification aléatoire de séquences d'ADN bactérien soit en utilisant de petites amorces pour le RAPD (10-12 nucléotides) soit en utilisant une température non-stringente (basse température, forte concentration de sel) d'hybridation de l'amorce pour l'*AP-PCR*. Les avantages de ces deux méthodes sont la rapidité et un coût relativement modique. Cependant, des problèmes de reproductibilité ont souvent été rencontrés : notamment le changement du thermocycler du lot Taq polymérase, la qualité de l'ADN extrait peuvent influencer l'amplification des segments d'ADN et donner des résultats différents [101,102].

#### **2.4.3. Techniques basés sur le séquençage**

##### **2.4.3.1. *Multilocus sequence typing (MLST)***

Cette méthode combine la séquence de plusieurs gènes structuraux (*housekeeping*) dans une approche similaire à l'analyse des iso-enzymes [103]. L'amplification et le séquençage de 450-500 bps des sept gènes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL*, ont été retenus pour *S. aureus* [104]. Chaque isolat peut ainsi être défini par le profil allélique de ces sept loci. Ce profil allélique est appelé *sequence type (ST)*. Par exemple, les isolats ayant le profil allélique 1-4-1-4-12-1-10 appartiennent au ST8.

Cette technique a un pouvoir discriminant très élevé et une très bonne reproductibilité. Une banque de donnée contenant les types de séquence de plus d'un millier de souches est accessible sur Internet permettant des comparaisons rapides entre les souches (<http://www.mlst.net>). De nos jours, elle est considérée comme la méthode de référence pour le typage de nombreux pathogènes bactériens. L'inconvénient de MLST, est bien sûr, son coût élevé [19].

#### 2.4.3.2. Typage du gène *spa*

La méthode, développée par Frénay et al., 1996, détermine la variation de la séquence de la région polymorphe X de la protéine A de *S. aureus* (*spa*) [105]. La diversité du gène *spa*, composé principalement d'un nombre de répétitions de 24 bp de longueur, est attribuée à des mutations ponctuelles ainsi qu'à des délétions et duplications de ces répétitions [106]. L'existence de régions conservées de part et d'autre de la région variable du gène *spa* permet l'utilisation d'amorces d'amplification et de séquençage pour l'analyse de cette région. Ainsi, une valeur est donnée à chaque unité répétitive différente ; un type, ou un profil *spa*, est identifié par une succession de valeurs identifiant chaque répétition composant la région X. L'analyse n'étant pas aisée, un programme informatique ainsi qu'une base de données internationale ont été élaborés pour une identification standardisée de ces profils (<http://www.ridom.de/staphtype/>). Le pouvoir discriminant de cette méthode reste cependant inférieur à celui de la PFGE [20].

#### 2.4.4. Puce à ADN

La technologie des sondes, associée à celle de la PCR ont permis l'émergence d'une nouvelle méthode : Les puces à ADN (*DNA microarray*). La puce à ADN est constituée d'un réseau dense et régulier de micro-surfaces gravées sur un support plan (substance chimiquement inerte comme le polypropylène, le nylon, le verre ou le silicium) d'une dimension de 1 cm<sup>2</sup> à 3 cm<sup>2</sup>. Chacune de ces micro-surfaces a une localisation déterminée et sur chacune d'elle est greffée des dizaines de milliers de sondes oligonucléotidiques dont les séquences sont quelconques ou correspondent au gène recherché [107].

L'introduction de ce type de technologie à haute densité est très intéressante pour scanner rapidement la diversité génétique d'un pathogène car elle détecte simultanément plusieurs centaines de gènes. Par exemple, une puce à ADN adaptée au typage par MLST de *S. aureus*

montre des résultats reproductibles, échangeables entre laboratoires et complètement concordants avec l'analyse MLST conventionnelle [108].

Une autre puce à ADN a été développée pour identifier et typer les souches de *S. aureus* et contient 465 sondes codant pour différentes protéines i) spécifiques de l'espèce *S. aureus*, ii) impliquées dans la résistance aux antibiotiques et aux facteurs régulant leur expression, iii) de virulence potentielle et des facteurs contrôlant leur expression, et iv) produites par des éléments mobiles. Cette puce plus discriminante que l'analyse combinée de différents marqueurs offre l'avantage de procurer des informations sur des gènes impliqués dans la virulence et dans le potentiel pathogène de *S. aureus* [109]. Ces puces à ADN offrent l'avantage de fournir un typage définitif mais présentent un prix élevé. En effet la fabrication et l'analyse de ces puces ADN nécessitent l'utilisation de matériel et de lecteur robotisé très coûteux.

### **3. Epidémiologie du SARM**

#### **3.1. Epidémiologie du SARM-H**

Deux ans après l'introduction de la pénicilline dans la pratique clinique, et l'apparition du premier SARM en Angleterre [50], ce dernier s'est 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 [110].

Bien que les données épidémiologiques provenant des différentes études sont souvent pas comparables en raison des différences dans la conception et les populations échantillonnées, les taux les plus élevés (> 50%) sont reportés en Amérique du Nord et du Sud [111,112], en Asie (en particulier, Sri Lanka (86,5%), la Corée du Sud (77,6%), le Vietnam (74,1%), Taiwan (65%), Thaïlande (57%), et Hong Kong (56,8%)) [6]. Des taux intermédiaires (25-50%) sont signalés en Chine, en Australie, en Afrique et dans certains pays européens (par exemple, Portugal (49%), Grèce (40%), Italie (37%) et Roumanie (34%)). Dans les autres pays européens, et plus particulièrement la Scandinavie, la prévalence des SARM-H ne dépasse pas 1% [111,113]. En ce qui concerne l'Algérie, le taux de SARM-H a atteint des taux alarmants, 47,4% (65/137 souches) à Alger, 52% (165/220 souches) à Tlemcen, et 71,4% (85/119 souches) à Annaba [15,7,114].

#### **3.2. Principaux clones mondiaux de SARM-H**

Les études en génétique des populations basées sur le MLST ont montré que les clones majeurs de SARM-H ont émergé de cinq complexes clonaux (CC) : CC5, CC8, CC22, CC30, et CC45 ; un complexe clonal est un groupe de souches avec des ST différentes mais qui sont suffisamment proches (identiques au moins en 5 gènes) pour qu'une origine commune (*ST Founder*) leur soit attribuée [62,115,116]. Tandis que

l'électrophorèse en champ pulsé a identifié cinq clones pandémiques majeurs de SARM-H, qui sont : le clone ibérique (ST247-SCCmecIA), le clone brésilien (ST239-SCCmecIIIA), le clone hongrois (ST239-SCCmecIII), le clone New York / Japon (ST5-SCCmecII), et le clone pédiatrique (ST5-SCCmecIV). Trois autres clones doivent être ajoutés à cette liste restreinte pour couvrir les pays de l'Europe du nord : EMRSA-15 (ST22-SCCmecIV), EMRSA-16 (ST36-SCCmecII) et Berlin (ST45-SCCmecIV) [55].

### **3.3. Epidémiologie du SARM communautaires**

#### **3.3.1. Origine du SARM-C**

Le SARM fut pendant longtemps la bactérie hospitalière qui ne cessait de roder dans les services et que l'on n'arrivait pas à éradiquer, jusqu'à ce qu'il n'a plus été limité au secteur hospitalier. En 1993, l'attention fut brutalement attirée lorsqu'une épidémie de SARM a été signalée au sein de la population aborigène d'Australie sans lien retrouvé avec des souches hospitalières : les patients touchés n'avaient pas eu de contact récent avec le système de soins et la souche présentait des caractéristiques génétiques non décrites auparavant chez les SARM. Il faudra cependant attendre la survenue de 4 décès entre 1997 et 1999 chez des enfants aux États-Unis dans les zones rurales du Minnesota et du Nord Dakota, à la suite d'infections à SARM d'évolution foudroyante, en l'absence de tout facteur de risque classique d'infection à SARM, pour que les premiers vrais cas d'infections communautaires à SARM soient décrites [54].

Les origines du SARM-C sont toujours mal comprises. Initialement, on pensait que c'était des souches de SARM-H qui se sont propagées au sein de la communauté. Cependant, la sensibilité paradoxale du SARM-C aux antimicrobiens non- $\beta$ -lactamines et les syndromes cliniques associés plus typiques du SASM ont fortement suggérer que les souches de SARM-C sont distinctes de celles du secteur hospitalier. La découverte des différences génotypiques qui

distinguent les SARM-C des SARM-H a conduit à l'acceptation générale de l'idée que le SARM-C a évolué à partir des souches de SASM endémique dans la communauté [10].

### **3.3.2. Définition du SARM-C**

Selon les *CDC* américains, le SARM est considéré comme étant communautaire lorsqu'il répond à tous les critères suivants :

- diagnostic d'une infection à SARM chez un patient en soins ambulatoires ou culture positive pour le SARM dans les premières 48 heures de l'admission du patient dans un centre hospitalier ;
- absence d'antécédents d'infection ou de colonisation au SARM ;
- absence de chacune de ces particularités dans l'année précédant l'infection : hospitalisation ; admission dans une unité de soin de longue durée ; dialyse ; chirurgie ; cathéters permanents ou d'autres appareils médicaux traversant la peau.

### **3.3.3. La prévalence du SARM-C**

#### **3.3.3.1. La situation aux États-Unis : la souche USA300**

Depuis le début des années 2000, un groupe clonal appelé USA300 d'après la nomenclature proposée par les *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, basée sur le profil des souches sur l'électrophorèse en champ pulsé, a connu un essor spectaculaire en Amérique du Nord [117]. Inconnu jusqu'en 2000, ce clone est devenu, en 2008, endémique dans 38 états aux États-Unis, au Canada et a été signalé dans 10 pays européens [118]. Une étude effectuée pendant l'été 2004 dans les services d'urgences hospitalières de 11 grandes villes réparties sur l'ensemble du territoire des Etats-Unis, a révélé que du SARM était isolé dans 57% des infections à *S. aureus* de la peau et des tissus mous et que USA300 représentait 97% de ces SARM [119]. Les raisons du succès de la dissémination de ce groupe clonal ne sont pas

parfaitement élucidées, mais il présente la particularité d'héberger à la fois les gènes codant la PVL, comme la quasi-totalité des SARM-C, mais aussi l'élément génétique mobile intitulé ACME très rare dans les autres groupes clonaux de SARM Communautaires [120].

### **3.3.3.2. Les SARM communautaires en Europe**

La situation épidémiologique des infections à SARM en Europe est nettement différente : même si les SARM-C y ont été décrits très précocement, dès la fin des années 1990, la situation n'a pas évolué vers l'état d'endémie documenté dans la majeure partie de l'Amérique du Nord. Bien que l'isolement du clone USA300 a été signalé dans un certain nombre de pays européens, tels que le Danemark [121], l'Allemagne [122], l'Italie [123], le Portugal [124], et le Royaume-Uni [125], les preuves disponibles indiquent que l'ampleur du problème de ce SARM-C est inférieur à celui observé aux États-Unis. D'autres clones internationaux communs tels que ST1-IV (USA400), ST30-IV (sud-ouest du Pacifique), et ST59-V ont également été signalés en Europe [126].

Le SARM-C européen le plus couramment isolé est le ST80-IV (PVL positif) le clone dit : Européen [12]. Ce clone pourrait avoir émergé à l'origine de la Méditerranée, Moyen-Orient, ou l'Afrique du Nord parce que beaucoup des premiers patients infectés par ce clone en Europe avaient fait des voyages vers ces régions-là dans leurs antécédents [127]. Plusieurs autres clones semblent avoir émergé en Europe tels que ST398-V, ST152-V, ST150, ST45, ST1, et ST377-V [12]. Plusieurs de ces clones, comme le clone européen et, de plus en plus, le ST398-V (le clone associé au porc), se sont répandues dans le monde entier, alors que d'autres restent localisées au sein de l'Europe [128].

### **3.3.3.3. La situation en Algérie**

En Algérie, le taux de SARM-C est de 40.5% à Alger, avec le clone Européen ST80-IV comme clone prédominant [15].

### **3.3.4. Infections à SARM-C**

Si la prédominance des infections de la peau et des tissus mous parmi les tableaux cliniques causés par les SARM Communautaires a été confirmée à de nombreuses reprises [129,130], des infections invasives sévères ont également été rapportées avec des tableaux bien individualisés. Parmi ces derniers, on peut citer : les fasciites nécrosantes [131], les pneumopathies nécrosantes [132], le syndrome de Waterhouse-Friderichsen [133], les empyèmes [134], les thrombophlébites septiques [135], les pyomyosites [136], les infections ostéo-articulaires [137], y compris sur prothèse [138], les bactériémies [139], et les endocardites [140]. Le lourd tribut payé à l'émergence de ces SARM-C aux USA, venus s'ajouter aux souches de SARM-H, restées endémiques dans la plupart des hôpitaux américains, a été évalué par une étude multicentrique réalisée en 2005. Selon cette dernière, les infections invasives à SARM provoqueraient près de 20 000 décès par an aux USA, soit plus que le cumul du nombre de décès attribué au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), aux hépatites virales et à la tuberculose dans ce même pays [141].

### **3.3.5. Emergence du SARM-C comme cause d'infections associées aux soins**

Avec l'évolution de l'épidémie mondiale, des types de souches de SARM-C ont commencé à émerger comme cause d'épidémies nosocomiales aux Etats-Unis en particulier, mais aussi dans d'autres [9]. Pire que ça, des rapports récents suggèrent que les clones de SARM-C commencent à supplanter les clones de SARM-H comme cause d'infections nosocomiales endémiques [142].

Aux Etats-Unis, le clone USA300 a été rapporté comme cause d'épidémies chez les nouveau-nés et d'infections sur prothèses articulaires dans un premier temps [143,144]. Par la suite, il a été rapporté comme cause d'une proportion significative de bactériémies nosocomiales [145,146]. Une étude menée à Chicago, Illinois, a montré que le taux des bactériémies causées par des SARM de génotype

communautaire a augmenté de 24 à 49% entre 2000 et 2006, contrairement à celui du génotype hospitalier qui a diminué [142].

Bien que l'émergence du SARM-C comme cause d'infections associées aux soins a été beaucoup plus documentée aux Etats-Unis, les autres continents non pas été épargné non plus. En Grèce, le SARM-C représentait 45% des infections liées aux soins dans plusieurs hôpitaux entre 2001 et 2003 [13]. En Uruguay, c'est le clone ST30-IV (sud-ouest du Pacifique) qui est entrain de remplacer le SARM-H au sien de l'hôpital [147]. En Corée, 24% des bactériémies nosocomiales en 2007 étaient causées par le clone prédominant ST72-IV [148]. Bien que les rapports de l'Afrique soient rares, le clone européen (ST80-IV) semble représenter la majorité des SARM-H en Tunisie et en Algérie [15,17].

### **3.3.6. Implications de l'émergence du SARM-C comme pathogène hospitalier**

Les raisons de l'émergence des souches de SARM-C comme une cause des IAS sont toujours inconnus. Les études de modélisation suggèrent que la croissante du réservoir communautaire a atteint un point où suffisamment de souches de SARM-C sont introduites dans les hôpitaux pour commencer une transmission [149].

L'afflux de SARM-C porté sur les patients, les visiteurs et les travailleurs de la santé dans les hôpitaux présente plusieurs défis. Tout d'abord, le SARM-C a la capacité de provoquer des infections chez des individus préalablement sains. Cela met un groupe plus large de patients hospitalisés, travailleurs de la santé et de leurs contacts dans la communauté potentiellement à risque, démontré par des infections à SARM-C chez les patients pédiatriques et obstétriques, formation d'abcès et occasionnellement des infections sévères chez les travailleurs de la santé, ainsi que des infections de la peau et des tissus mous chez les contacts familiaux [150–152].

Deuxièmement, une prévalence accrue de souches de SARM-C productrices de *PVL* dans les hôpitaux peut augmenter la virulence des infections nosocomiales à SARM. Néanmoins, les nouvelles données indiquent que les souches de SARM-C au sein des hôpitaux se comportent d'avantage comme des souches de SARM-H [153].

Enfin, l'exposition des SARM-C à la pression de sélection nosocomiale des antibiotiques encouragera l'émergence d'une résistance multiple. Tout comme les souches de SARM-C dans les environnements de soins de santé se comportent beaucoup plus comme des SARM-H, elles peuvent aussi venir à ressembler aux souches SARM-H en termes de leurs phénotypes de multi-résistance aux antibiotiques, rendant les définitions de SARM-H et SARM-C de plus en plus confus [154].

### **3.4. Facteurs de risques d'acquisition de SARM**

Les facteurs de risque d'acquisition des SARM sont multifactoriels. En plus des facteurs de risque liés aux soins cités précédemment (voir **3.3.2. Définition du SARM-C**), le manu-portage par le personnel médical et paramédical est le vecteur essentiel de dissémination du SARM [155]. La colonisation par SARM peut persister plusieurs mois, voire plusieurs années [156]. L'acquisition communautaire de SARM, en dehors de ces facteurs de risque liés aux soins, bien que décrite, semble rare. Mais la dissémination à partir de personnes colonisées peut survenir de la même façon qu'à l'hôpital, par manu-portage ou par contact direct au sein d'un groupe [156].

### **3.5. Un nouveau clone de SARM émergent : ST398**

L'émergence dans cette dernière décennie du *LA-MRSA* (*LA* pour « *Livestock-Associated* ») qui peuvent causer des maladies zoonotiques chez l'homme a été une préoccupation majeure de la santé [157]. Les premières souches de ce type de SARM ont été isolées aux Pays-Bas chez les porcs dès février 2003 et aussi en France à la même période chez l'homme [158,159]. La prévalence de ces souches aux Pays-Bas originellement dénommées NT (non-typable), puis identifiées comme appartenant au nouveau complexe clonal ST398 a crû de 0% en 2002 à plus de 21% en juillet 2006 [160]. Depuis, le SARM ST398 a été isolé dans de nombreux pays européens (Allemagne, Autriche, Belgique, Danemark, Espagne, France, Italie, Pays-Bas,

suisse, suède) ou encore au Canada, aux USA, en Chine, voire à Singapour, chez le porc, et d'autres réservoirs d'animaux tels que les bovins et les ovins [161]. Plus important encore, les infections à SARM ST398, incluant des infections sévères chez les éleveurs de porcs et les membres de leurs familles, sont en nette augmentation [162]. Sachant que des études ont montré que le ST398 a un faible niveau d'épidémicité pour l'homme [163], de façon inquiétante, plusieurs publications récentes ont rapporté l'apparition d'infections à ST398 sensibles à la méticilline chez l'homme sans exposition récente à des élevages de porcs, ce qui implique qu'il existe des sous-types de ST398 qui circulent dans les populations humaines [64].

## **4. Antibiotiques anti-staphylococciques**

### **4.1. Introduction**

Déjà en 1928, le staphylocoque a joué un rôle dans la découverte des antibiotiques. En effet, l'observation fortuite d'Alexander Fleming sur des colonies de *Penicillium* a conduit à l'amélioration de la santé mondiale. Il a remarqué que le champignon *Penicillium* (qui avait contaminé les boîtes de cultures accidentellement) avait inhibé la croissance d'une culture bactérienne qui se trouve être une souche de staphylocoque. De cette observation découle la purification et la production du premier antibiotique utilisé en thérapeutique : la pénicilline G [164].

Les antibiotiques ont principalement deux actions possibles sur les bactéries : bactériostatiques ou bactéricides. Un antibiotique bactériostatique est une molécule qui à dose thérapeutique est capable d'inhiber seulement la croissance bactérienne sans perte de viabilité. Le pouvoir bactériostatique est mesuré en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI), la CMI étant la concentration la plus faible d'antibiotique qui est capable d'inhiber la croissance visible des bactéries. L'autre possibilité étant que l'antibiotique soit bactéricide, c'est-à-dire une molécule qui à dose thérapeutique est capable de provoquer la mort de la cellule bactérienne. Elle est mesurée en déterminant la concentration minimale bactéricide (CMB) qui est la plus faible concentration d'antibiotique entraînant la destruction de 99,99 % d'un inoculum bactérien. Il faut préciser qu'un antibiotique bactériostatique peut être bactéricide, mais à des concentrations trop élevées pour être administrées à l'être humain.

Chaque famille d'antibiotiques possède un mécanisme d'action qui lui est propre mais on peut résumer leurs actions en trois grandes catégories spécifiques qui sont : action sur la paroi bactérienne, action sur les processus de synthèse d'acides nucléiques et de protéines, action sur les voies métaboliques [19].

Face à l'arsenal thérapeutique, les bactéries ont su opposer des stratégies de défense et sont donc devenues résistantes aux antibiotiques. L'OMS définit une souche résistante aux antibiotiques comme « une souche qui supporte une concentration d'antibiotiques notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des souches de la même espèce » ou « une souche qui supporte une concentration notablement plus élevée que la concentration qu'il est possible d'atteindre in vivo » [165].

*S. aureus* est une espèce bactérienne qui présente une grande capacité d'adaptation vis-à-vis de la contrainte antibiotique. Les mécanismes de résistance de *S. aureus* sont différents selon la classe des antibiotiques [65]. Il est naturellement résistant aux monobactames (aztréonam), aux quinolones de 1<sup>ère</sup> génération (acide nalidixique) et aux peptides cycliques (polymixine B). Les autres antibiotiques ont tous une action potentielle sur le *S. aureus* (sauf en cas de développement de résistances acquises) [166].

Dans ce titre, les molécules de chaque classe d'antibiotiques seront présentées ainsi que leur mécanisme d'action puis les mécanismes de résistance de *S. aureus* seront détaillés (**Tableau 4**).

## **4.2. Acide pseudomonique**

La mupirocine est la représentante des acides pseudomoniques, elle est issue du *Pseudomonas fluorescens*. La particularité de cette molécule est qu'on ne peut pas l'utiliser par voie orale puisqu'elle serait très vite dégradée par l'organisme, elle est donc utilisée en thérapeutique par voie locale (nasale) avec le but de décoloniser les patients porteurs de SARM ou plus globalement de *S. aureus* avant certaines interventions chirurgicales [167].

### **4.2.1. Mécanisme d'action de la mupirocine**

La mupirocine inhibe la synthèse protéique en se liant de façon réversible et spécifique à l'isoleucyl-ARNt synthétase des bactéries, ce qui entraîne une compétition sélective entre la mupirocine et l'isoleucine, cette dernière constituant le substrat de l'isoleucyl-ARNt synthétase. Cette fixation stoppe l'élongation peptidique. La molécule a un effet bactéricide lent [168].

### **4.2.2. Mécanisme de résistance**

Selon les souches de *S. aureus*, deux types de résistances à la mupirocine sont recensés. Une est dite de bas niveau et l'autre de haut niveau. La résistance de bas niveau (CMI allant de 8 à 256 mg/L) est liée à une mutation du gène *ileS* qui code l'isoleucyl-ARNt synthétase. La mutation du gène implique que l'antibiotique ne peut plus se fixer sur l'enzyme. La résistance de haut niveau (CMI = 512 mg/L) nécessite l'acquisition d'un plasmide ayant le gène *mupA* (**Tableau 4**). Ce déterminant modifie également l'isoleucyl-ARNt synthétase [168].

### **4.3. Aminoglycosides ou Aminosides**

Les premiers aminosides découverts l'ont été en tant que molécules naturelles, produites par des souches de *Streptomyces* (molécules se terminant par –mycine : streptomycine, néomycine, kanamycine, tobramycine) ou d'*Actinomyces* (molécules se terminant par –micine : gentamicine). Il faut préciser que quelques aminosides, découverts dans les années 70, sont hémi-synthétiques (amikacine et netilmicine), ces composés se sont avérés moins toxiques que les composés de base [167].

Ils possèdent un spectre d'activité antibactérien large justifiant que certaines molécules soient réservées à l'hôpital pour combattre les infections bactériennes sévères. Les principaux inconvénients de cette classe d'antibiotiques sont leur ototoxicité et leur néphrotoxicité [166].

#### **4.3.1. Mécanisme d'action des aminosides**

Les aminoglycosides sont des antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique, suite à leur fixation sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides rapides et puissants et présentent un effet post-antibiotique (c'est-à-dire que la durée d'activité est beaucoup plus importante que le temps d'exposition) [169].

#### **4.3.2. Mécanisme de résistance**

La résistance acquise des staphylocoques aux aminosides est surtout due à la production d'enzymes inactivatrices. La synthèse des enzymes est gouvernée par des gènes plasmidiques ou transposables. Il existe trois classes d'enzymes en fonction de la réaction catalysée (**Tableau 4**) :

- aminoside N-acetyltransferase (AAC) : acétylation d'un groupement -NH<sub>2</sub> ;
- aminoside O-phosphotransferase (APH) : phosphorylation d'un groupement -OH ;
- aminoside nucleotidyltransferase (ANT) : nucleotidylation d'un groupement -OH.

Chaque enzyme va modifier un certain nombre d'aminosides différents, ce qui va se traduire par un phénotype de résistance spécifique de l'enzyme [166].

#### **4.4. Antibiotiques phosphoniques**

C'est dans les années 60, que la fosfomycine a été découverte et isolée. Cette molécule naturelle est issue de certaines espèces de *Streptomyces* mais aussi par *Pseudomonas syringae* [167].

##### **4.4.1. Mécanisme d'action des antibiotiques phosphoniques**

La fosfomycine est un antibiotique agissant sur la paroi bactérienne. Après avoir pénétré dans la cellule cible par des voies de transports transmembranaires, elle va inhiber précocement la synthèse du peptidoglycane en rendant inapte l'enzyme énolpyruvyl-transférase. Les antibiotiques phosphoniques sont bactéricides envers *S. aureus* [170].

##### **4.4.2. Mécanisme de résistance**

La résistance est consécutive à la production d'une protéine *FosB* qui hydrolyse la fosfomycine en ouvrant le noyau époxyde. La résistance est apportée par des plasmides ayant le gène de *FosB* (**Tableau 4**) [170]. En monothérapie, la sélection de mutants résistants est rapide. Ces antibiotiques doivent donc être utilisés en association, sauf exception (dose unique dans le traitement des infections urinaires basses) [166].

#### **4.5. $\beta$ -Lactamines**

Les  $\beta$ -lactamines ont été les premiers antibiotiques découverts. Elles ont été isolées à partir d'un *Penicillium*. Les  $\beta$ -lactamines regroupent plusieurs familles d'antibiotiques car leurs structures moléculaires sont proches : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes ainsi que les monobactames, ces derniers ne seront pas évoqués car ils ne sont pas actifs puisque *S. aureus* est naturellement résistant [19].

#### **4.5.1. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines**

Les  $\beta$ -lactamines agissent sur la paroi bactérienne, plus précisément sur les protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP sont des protéines à activité enzymatique (essentiellement des transpeptidases) impliquées dans la synthèse de la paroi. Elles sont situées sur la face externe de la membrane cytoplasmique. Cette fixation covalente entre les PLP et les  $\beta$ -lactamines induit un blocage des réactions de transglycosylation et transpeptidation consécutif à l'acylation des PLP par la  $\beta$ -lactamines, ainsi qu'une stimulation de l'activité des auto-lysines (enzymes impliquées dans le renouvellement de la paroi) [166]. Les souches de *S. aureus* possèdent 4 PLP : PLP1, PLP2, PLP3 (essentielles à la survie) et PLP4 (accessoires) [171].

#### **4.5.2. Mécanisme de résistance**

##### **4.5.2.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines par production de $\beta$ -lactamases**

La pénicillinase plasmidique est une protéine enzymatique capable d'hydrolyser le cycle  $\beta$ -lactame et donc de rendre inapte l'antibiotique. Ces enzymes ne sont pas capables d'inactiver les pénicillines M et les céphalosporines. De plus, il existe des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) qui restaurent l'activité des antibiotiques qui leur sont associés. La pénicillinase staphylococcique est le produit d'expression du gène *blaZ* qui est porté par un plasmide ou un transposon (**Tableau 4**) [166].

##### **4.5.2.2. Résistance à la méticilline**

Il s'agit d'une résistance acquise par modification de la cible principale de nombreuses  $\beta$ -lactamines, la PLP2. La nouvelle PLP2a produite a une faible affinité vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines. Cette résistance est à considérer comme croisée pour l'ensemble des  $\beta$ -lactamines mais son expression peut être hétérogène au sein d'une même souche. Ils existent quatre classes d'expression (classes I, II, III et IV). La PLP2a possède la capacité de catalyser seule l'assemblage du peptidoglycane lorsque les autres PLP sont inactivées par les  $\beta$ -lactamines [172].

D'un point de vue génétique, la PLP2a est codée par le gène *mecA* se trouvant sur un fragment d'ADN additionnel présent chez les SARM et absent chez les SASM (**Tableau 4**) [20].

#### **4.5.2.3. Autres mécanisme de résistance à la méticilline**

Ces résistances sont de bas niveau et sont nommés *BORSA* (*bordeline Staphylococcus aureus*) et *MODSA* (*modified Staphylococcus aureus*). Les souches *BORSA* et *MODSA* ne possèdent pas le gène *mecA*. Pour les souches *BORSA*, le mécanisme impliqué est une hyperproduction de la pénicillinase staphylococcique. Tandis que pour les souches *MODSA*, une modification des PLP endogènes (PLP1, 2 ou 4) entraîne une résistance sans production de pénicillinase [172].

#### **4.6. Fluoroquinolones**

Les fluoroquinolones constituent la 2eme génération de quinolones et ont la particularité de posséder un fluor dans leur structure moléculaire. La 1ère quinolone, découverte en 1962, est l'acide nalidixique. Ces premières quinolones présentaient peu d'intérêt car elles avaient quelques défauts d'un point de vue pharmacocinétique et antibactérien (spectre étroit). L'apparition des quinolones de 2eme génération, en 1985, a totalement comblé les lacunes des premières quinolones [173].

##### **4.6.1. Mécanisme d'action des fluoroquinolones**

Ces antibiotiques ont comme cible la synthèse des acides nucléiques. Ils agissent sur une enzyme qui permet de déplier l'ADN qui est « surenroulé », ces enzymes sont appelées topoisomérases ou ADN gyrases. Les fluoroquinolones vont interagir avec les complexes ADN/topoisomérases et inhibent cette activité indispensable à la réplication et à la survie de la bactérie [173].

#### **4.6.2. Mécanisme de résistance**

Il existe deux mécanismes de résistance de type chromosomique exclusivement. La résistance aux fluoroquinolones est liée, soit à des mutations ponctuelles dans l'une et/ou l'autre des deux cibles qui sont la gyrase et la topoisomérase IV, soit à un efflux actif. Chez *S. aureus*, la première étape vers la résistance consiste en la modification d'une seule cible, la cible préférentielle, qui confère une résistance de bas niveau et affecte plus ou moins l'activité de diverses fluoroquinolones. L'étape suivante, qui consiste en la modification de la seconde cible confère une résistance de plus haut niveau. Les mutations siègent en général dans une région restreinte appelée *QRDR* (pour « *Quinolone Resistance-Determining region* ») [174].

#### **4.7. Fusidanes**

L'acide fusidique est le seul représentant des antibiotiques stéroïdiques ou fusidanes. La molécule est d'origine naturelle car elle est produite par un micromycète, le *Fusidium coccineum* [167].

##### **4.7.1. Mécanisme d'action des fusidanes**

Les fusidanes vont former un complexe stable avec le facteur d'élongation EF-G qui est une GTPase. Ce complexe empêche la synthèse protéique puisque l'élongation de la chaîne peptidique est bloquée. L'antibiotique a une activité bactéricide rapide envers *S. aureus* [175].

##### **4.7.2. Mécanisme de résistance**

La résistance à cet antibiotique est la conséquence d'une diminution de l'affinité entre le facteur d'élongation et l'antibiotique (résistance de type chromosomique, mutation du gène *fusA* codant le facteur EF-G) ou un défaut de pénétration dans la bactérie (résistance de type plasmidique, gène *fusB* ou *fusC*) (**Tableau 4**) [175].

#### **4.8. Glycopéptides**

Les deux antibiotiques présents dans la famille des glycopeptides sont la vancomycine et la teicoplanine. La première molécule commercialisée est la vancomycine en 1956 et elle est d'origine naturelle car elle est produite par un champignon, *Amycolatopsis orientalis*. La teicoplanine a été commercialisée à l'époque des 1ères souches de SARM, elle est isolée d'*Actinoplanes teichomyceticus*. Il faut préciser que la préparation antibiotique de teicoplanine est un mélange de 6 composés glycopeptidiques qui est différent au niveau de la chaîne latérale d'acides gras [166].

##### **4.8.1. Mécanisme d'action des glycopeptides**

Ces deux molécules agissent sur le peptidoglycane des bactéries. En effet, elles se lient avec le dimère D-alanyl-D-alanine qui est en position terminale de la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane. Cette fixation masque les sites d'action des transpeptidases et empêche la réaction de transglycolisation lors de la synthèse du peptidoglycane. La bactérie ne peut donc plus renouveler son peptidoglycane, se diviser et elle finit par mourir. Ces antibiotiques sont bactéricides temps-dépendants vis-a-vis de *S. aureus* et d'action lente (environ 1 à 2 jours) [176].

##### **4.8.2. Mécanisme de résistance**

La résistance du *S. aureus* est liée à une diminution de la pénétration des glycopeptides dans la bactérie. Le D-alanyl-D-alanine se retrouve en abondance dans la paroi du staphylocoque et est capable de piéger et d'immobiliser les molécules d'antibiotiques lors de la phase de pénétration. Cette résistance est due à une anomalie de la biosynthèse du peptidoglycane et est connue chez les souches *glycopeptide-intermediate S. aureus* (GISA) ou *vancomycine-intermediate S. aureus* (VISA). En 2002, la première souche pleinement résistante à la vancomycine a été décrite, caractérisée par une CMI élevée (> 32mg/L) et associée au gène *vanA*, résultant probablement d'un transfert horizontal d'*Enterococcus spp* (**Tableau 4**) [177]. Ce type de

résistance reste exceptionnel, et n'a été détecté que sur une dizaine d'isolats cliniques dans le monde, pour la plupart aux Etats-Unis [176].

#### **4.9. Lipopeptides**

La daptomycine est l'unique représentante de la famille des lipopeptides cycliques. Elle a été isolée à partir de *Streptomyces roseosporus* dans les années 1980. Des myopathies peuvent se développer quelques semaines ou quelques mois après l'instauration d'un traitement combiné ou après une augmentation de la posologie ainsi qu'après un effort musculaire intense. [178] .

##### **4.9.1. Mécanisme d'action des lipopeptides**

La molécule agit sur la paroi bactérienne. Elle s'insère dans la membrane cytoplasmique en présence de cation  $Ca^{2+}$ , puis elle entraîne par polymérisation la formation de pores transmembranaires et la mort cellulaire par fuite ionique (principalement le  $K^{+}$  intracellulaire). L'antibiotique a une action bactéricide concentration-dépendante sur les *S. aureus* [178] .

##### **4.9.2. Mécanisme de résistance**

Des souches de *S. aureus* résistants à la daptomycine, ont été décrites dans la littérature. Mais leur mécanisme d'action est encore peu connu à ce jour. La fixation de l'antibiotique sur la membrane cytoplasmique serait réduite à cause de la perte d'une protéine membranaire [179].

#### **4.10. Macrolides, Lincosamides et Synergystines (MLS)**

Cette famille d'antibiotiques regroupe les macrolides et les macrolides apparentés (lincosamides et synergystines) sous le terme MLS. D'un point de vue moléculaire, les MLS sont différents et hétéroclites structurellement parlant mais ils sont regroupés dans la même famille, car leurs mécanismes d'action ainsi que leurs spectres antibactériens sont similaires [172].

##### **➤ Macrolides**

Le chef de file des macrolides a été découvert en 1952 et isolé d'une souche de *Streptomyces erythreus* qui a donné le nom à la molécule érythromycine. Mais la 1<sup>ère</sup> molécule découverte

a été la pikromycine en 1942 par Gardner. Les effets secondaires des macrolides sont généralement peu nombreux mais on peut retrouver des effets digestifs, des céphalées et des vertiges [180].

➤ **Lincosamides**

Les lincosamides ont été isolées à partir de *Streptomyces lincolnensis*. Leur structure moléculaire est différente des macrolides mais leurs actions sont similaires. On les regroupe dans les MLS ou les macrolides apparentés avec les streptogramines. Elles peuvent provoquer des colites pseudomembraneuses comme effet secondaire (comme beaucoup d'autres antibiotiques). Enfin, il n'y a pas d'intérêt à les associer avec les macrolides puisque leurs effets sont équivalents [166,180].

➤ **Synergystines ou strptogramines**

Ils ont été isolés en 1955 par une bactérie *Streptomyces pristinaespiralis*. Actuellement, il n'existe que la pristinamycine dans cette famille. Cette famille est plutôt bien tolérée si on respecte les conseils de prises, c'est-à-dire de les prendre pendant les repas [167].

**4.10.1. Mécanisme d'action des macrolides, lincosamides et synergystines**

Ces antibiotiques se fixent sur la sous-unité 50S des ribosomes et inhibent ainsi la synthèse protéique. Cette interaction induit un blocage du complexe aminoacyl-ARNt et les acides aminés apportés par l'ARN de transfert ne s'incorporent plus aux chaînes polypeptidiques. La synthèse protéique ne pouvant plus se réaliser, la survie de la bactérie est compromise.

Les MLS sont des antibiotiques bactériostatiques, sauf les synergystines qui sont bactéricides vis-à-vis des *S. aureus* [172].

**4.10.2. Mécanisme de résistance**

Le mécanisme de résistance le plus connu est une modification de la cible ribosomale. La partie ribosomale est modifiée par une attaque enzymatique, l'adénine en position 2058 de l'ARNr 23S se retrouve alors méthylée. Les enzymes en cause sont des méthylases codées par des gènes

de la famille *erm* (erythromycin resistance methylase) (**Tableau 4**). La méthylation empêche la fixation du MLS et son action. Cette résistance peut être inductible (induite en présence de macrolides) ou constitutive (exprimée en permanence). Cependant, cette méthylation touche pas les streptogramines A, c'est pourquoi la pristinamycine reste active, même en cas de résistance constitutive [181].

#### **4.11. Oxazolidinones**

L'unique représentante de la classe des oxazolidinones est la molécule linézolide. Elle a été synthétisée en 1984. Les manifestations hématologiques sont les effets indésirables les plus préoccupants (thrombopénie, anémie ou leucopénie par exemple). La durée d'utilisation est limitée à 4 semaines [182].

##### **4.11.1. Mécanisme d'action des oxazolidinones**

En amont de la synthèse peptidique, la molécule va interagir avec la sous-unité 50S du ribosome et plus précisément avec le fragment 23S [166]. Cette interaction va induire un blocage puisque la sous-unité 30S du ribosome ne va pas réussir à se fixer avec la sous-unité 50S. Il se produit donc une mauvaise élongation et les protéines sont altérées. La linézolide agit précocement par rapport aux autres antibiotiques agissant sur la traduction des ARNm et la synthèse des protéines comme les macrolides, les aminoglycosides, les cyclines. Vis-à-vis du *S. aureus*, l'antibiotique présente une action bactériostatique temps-dépendant et possède un effet post-antibiotique compris entre 1 à 2 heures [182].

##### **4.11.2. Mécanisme de résistance**

La résistance du *S. aureus* aux oxazolidinones est due à une modification de la cible ribosomale. La mutation survient sur les gènes codant la partie protéique de l'ARN 23S et plus particulièrement la zone d'action de l'antibiotique. Cette résistance est rare car la bactérie présente plusieurs copies des gènes codant la partie protéique de l'ARN 23S et il faudrait que

la mutation touche plusieurs de ces copies. En pratique, la résistance a été retrouvée uniquement chez des patients recevant un traitement prolongé [182].

#### **4.12. Phénicolés**

La tête de liste des phénicolés est le chloramphénicol, il a été isolé à partir de *Streptomyces venezuelae*. Depuis 1996, le chloramphénicol n'est plus commercialisé en France mais on peut le retrouver dans d'autres pays émergents. Son retrait du marché est consécutif à des effets secondaires importants dont l'aplasie médullaire touchant 1 cas sur 20000 traitements. Maintenant, il ne reste que le thiamphénicol qui est mieux toléré que le chloramphénicol, car il n'est pas inhibiteur enzymatique et ne provoque pas d'aplasie médullaire [183].

##### **4.12.1. Mécanismes d'action des phénicolés**

Comme les macrolides et les lincosamides, les phénicolés se fixent à la sous-unité 50 S des ribosomes bactériens. Ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation, et donc la réaction de transpeptidation. Le thiamphénicol est une molécule bactériostatique sur les souches de *S. aureus* [183].

##### **4.12.2. Mécanisme de résistance**

Les phénicolés sont sujets aux mécanismes d'efflux multiple avec le gène *norA* qui augmente la CMI. Une autre résistance a été décrite, elle est due au gène *cat* codé sur un plasmide. Ce gène code pour une chloramphénicol acétyltransferase qui neutralise l'antibiotique [183].

#### **4.13. Rifamycines**

Les antibiotiques de la famille de rifamycine font partie de la famille des ansamycines et ils ont été isolés de *Streptomyces mediterranei* (actuellement renommé *Amycolatopsis rifamycinica*) en 1957 [167]. Cet antibiotique est un fort inducteur enzymatique : il accélère la dégradation des autres médicaments. De ce fait, les associations médicamenteuses sont contre-indiquées, déconseillées ou à utiliser avec précaution. De plus, pour éviter d'inquiéter les patients, il est

recommandé de préciser que la prise de ces antibiotiques entraîne systématiquement la coloration en orange des urines, des selles et des larmes [184].

#### **4.13.1. Mécanisme d'action des rifampycines**

La rifampicine inhibe l'ARN polymérase bactérienne, enzyme responsable de la transcription. Les antibiotiques sont des agents bactéricides sur les souches sensibles de *S. aureus* [172].

#### **4.13.2. Mécanisme de résistance**

Des mutations sur le gène *rpoB* qui code la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase-ADN dépendante entraînent le mécanisme de résistance. Ces mutations altèrent la structure de l'ARN polymérase sur laquelle l'antibiotique ne pourra plus agir (**Tableau 4**) [172].

#### **4.14. Sulfamides et Triméthoprime**

L'association sulfamides triméthoprime ou cotrimoxazole utilisée près de cinquante ans a été l'antibiotique le plus prescrit dans le monde, jusqu'à l'avènement des fluoroquinolones. Ce succès planétaire est lié à un spectre très étendu comportant non seulement la quasi-totalité des bactéries pathogènes mais aussi quelques champignons, et des parasites des plus petits aux plus gros (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, et...les poux), à d'excellents résultats cliniques et aussi à un coût très bas [166].

##### **4.14.1. Mécanisme d'action des sulfamides en association ou non avec le triméthoprime**

Ces différentes molécules sont impliquées directement dans la synthèse des folates (processus important dans le métabolisme bactérien). Les sulfamides sont des analogues structuraux de l'acide para-aminobenzoïque (PAB) : ils entrent en compétition avec le PAB dans la synthèse de l'acide dihydroptéroïque qui représente la première étape de la synthèse de l'acide dihydrofolique (DHF). Les sulfamides remplacent le PAB en se fixant sur la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui catalyse cette réaction à partir de PAB et de ptéridine. Cette compétition va enrayer l'action de la dihydroptéroate synthétase (DHPS) et ainsi la synthèse est bloquée. Le

triméthoprimine exécute son intervention en aval des sulfamides, il neutralise la dihydrofolate réductase (DHFR) et stoppe la synthèse des folates. Les sulfamides sont des antibiotiques bactériostatiques mais leur association avec le triméthoprimine rend leur activité bactéricide, les deux molécules agissant en synergie [166].

#### **4.14.2. Mécanisme de résistance**

La résistance à cette classe antibiotique peut trouver sa cause dans divers mécanismes. Une imperméabilité aux antibiotiques d'origine chromosomique ou plasmidique, une augmentation significative de DHPS ou de DHFR par hyperproduction, enfin la présence de DHPS ou de DHFR distincts (acquis par un gène plasmidique ou par suite de mutation génique) ne subissant pas l'action des antibiotiques [166].

#### **4.15. Tétracyclines et Glycylcyclines**

Ces molécules font partie d'un groupe homogène structurellement. Elles ont comme point commun d'avoir quatre cycles (tétracyclines) dans leurs structures moléculaires formant un noyau naphtacène. En 1948, M. Duggar isole d'un *Streptomyces aureofaciens* la 1<sup>ère</sup> tétracycline : la chlorotétracycline. Seule la tigécycline fait partie de la famille des glycylcyclines, elle dérive de la minocycline et est hémi-synthétique. Les effets secondaires retrouvés sont la photosensibilisation et une coloration en jaune de l'émail dentaire. De plus, les tétracyclines ont une contre-indication absolue avec les rétinoïdes qui peut être mortelle car cela entraîne des hypertensions intracrâniennes [166].

##### **4.15.1. Mécanisme d'action des tétracyclines et des glycylcyclines**

Ces antibiotiques agissent au niveau de la sous-unité 30S du ribosome en inhibant l'élongation peptidique. Ils ont une action bactériostatique envers le *S. aureus* [166].

##### **4.15.2. Mécanisme de résistance**

Il existe deux types de résistance aux tétracyclines. La première est liée à un plasmide (le plus connu est pT181), elle entraîne un efflux actif des tétracyclines grâce à des protéines *Tet* situées

dans la membrane interne. La seconde résistance entraîne une protection des sites actifs du ribosome par d'autres protéines *Tet*. La protéine *Tet(K)* est une des protéines qui entraîne l'expulsion des tétracyclines et les protéines *Tet(O)* ou *Tet(M)* vont elles, protéger les sites actifs ribosomiaux (**Tableau 4**) [166].

**Tableau 4** : Gènes de résistance portés par des EGM non-*SCCmec* [5].

EGM	Gène de résistance	Antibiotique/ métal lourd	Mécanisme de résistance	Référence
<b>Plasmide</b>	<i>aadD</i>	Néomycine, kanamycine, et tobramycine	Aminoglycoside adényltransferase	[185]
	<i>ant4'</i>	Tobramycine	Aminoglycoside nucleotidyltransferase	[186]
	<i>blaZ, bla1, blaR1</i>	Penicilline (β-lactame)	Hydrolyse du cycle β-lactame	[187]
	<i>ble</i>	Bléomycine	Protéine liant la bléomycine	[188]
	<i>cat</i>	Chloramphenicol	Chloramphénicol acetyltransferase	[189]
	<i>cfr</i>	Chloramphenicol, florfenicol, et clindamycine	Méthylation de la sous-unité 23S	[190]
	<i>dfrA, dfrK</i>	Triméthoprime	Dihydrofolate reductase	[191]
	<i>ermB,C</i>	MLS <sub>B</sub> (macrolides : erythromycin, lincosamides : clindamycine, streptogramine B)	Méthylation de l'ARN 23S de la sous unité 50S	[192]
	<i>fusB</i>	Acide fusidique	Mécanisme de protection ribosomale	[193]
	<i>ileS-2</i>	Résistance de haut niveau à la mupirocine	Isoleucyl RNA synthetase	[194]
	<i>mphBM</i>	Macrolides	Phosphorylase putative	[195]
	<i>msrA</i>	Macrolides	Efflux actif	[195]
	<i>mupA</i>	Résistance de haut niveau à la mupirocine	Nouvel isoleucyl RNA synthetase	[196]
	<i>str</i>	Streptomycine	Streptomycin adényltransferase	[197]
	<i>tetK, tetL</i>	Tétracyclines	Efflux actif	[198]

	<i>vat</i>	Streptogramine A	Acétylation de l'antibiotique	[199]
	<i>vga</i>	Streptogramine A, lincosamides, et pleuromutilines	Efflux	[200]
	<i>vgb</i>	Streptogramine B	Inactivation par la lyase virginiamycine B	[201]
<b>Transposon</b>	<i>aacA-aphD</i>	Gentamycine, kanamycine, et tobramycine	Aminoglycoside acetyltransferase et phosphotransferase	[202]
	<i>blaZ, bla1, blaR1</i>	$\beta$ -lactame	Hydrolyse le cycle $\beta$ -lactame	[203]
	<i>ermA,B</i>	MLSB	Méthylation de l'ARN 23S de la sous unité 50S	[204]
	<i>fexA</i>	Florfenicol, chloramphénicol	Efflux	[190]
	<i>tetM</i>	Tétracycline, minocycline	Protection du site A du ribosome	[205]
	<i>vanRSHXYZ<sup>a</sup></i>	Vancomycine	Production de précurseurs avec une faible affinité aux peptidoglycanes	[166]
<b>SCC<sub>476</sub></b>	<i>far1</i>	Acide fusidique	/	[206]

a : Le gène de résistance à la vancomycine est porté sur le transposon Tn1546 mais transféré par plasmide conjugatif

## **5. Mesures et control des infections à SARM**

### **5.1. Dépistages des patients**

Bien que les patients colonisés et infectés représentent le plus important réservoir de SARM au sein des établissements de santé [207], 35 à 84% des patients colonisés ne sont pas détectés par les cultures demandées par les médecins pour des raisons cliniques [207–209].

Aux Pays-Bas et dans certaines parties de la Scandinavie, où la prévalence du SARM-H est inférieure à 1-3%, le dépistage des patients et des travailleurs de la santé exposés est une partie intégrante de la stratégie « recherche et éradication » que la plupart des hôpitaux utilisent [210,211].

### **5.2. Dépistage du personnel**

Les travailleurs de santé qui sont porteurs nasaux peuvent servir comme source de transmission de SARM, même s'ils ne sont pas un réservoir aussi important que les patients colonisés ou infectés [212]. Parce que la colonisation nasale des travailleurs de la santé peut être transitoire, l'isolement d'une souche épidémique ou endémique d'un travailleur de la santé à un moment donné ne fournit pas de preuve convaincante qu'ils ont transmis le micro-organisme aux patients [207]. Tel mentionné précédemment, y a des pays où le personnel de santé ainsi que les patients sont systématiquement dépistés, et y a d'autres pays où le dépistage des travailleurs de la santé est souvent réservé à des situations dans lesquelles aucun indice apparent n'est identifié chez les patients et dans lesquels la transmission se poursuit en dépit de l'utilisation de l'isolement et de précautions barrière [213].

### **5.3. Isolement et précaution barrière**

Les patients colonisés ou infectés par le SARM devraient, autant que possible être placés dans une chambre privée, ou logés avec d'autres patients porteurs de SARM [214]. L'efficacité de cette politique largement acceptée n'a pas été prouvée dans des essais randomisés. Néanmoins,

dans une étude systématique, [215] a conclu que l'isolement des patients, combiné avec d'autres mesures de contrôle pourrait réduire la propagation du SARM.

#### **5.4. Hygiène des mains**

La contamination transitoire des mains des travailleurs de la santé a été documentée à maintes reprises, et est largement considérée comme la principale méthode par laquelle le SARM est transmis aux patients [207,216]. Les gens atteints de dermatites, colonisés par le SARM sont particulièrement susceptibles d'être des sources de transmission aux patients [217,218].

Plusieurs études ont montré que l'amélioration des pratiques de l'hygiène des mains, lorsqu'elle est associée aux cultures de surveillance et aux précautions de contact, a considérablement réduit la transmission du SARM [219,220]. Le niveau de conformité de l'hygiène des mains nécessaire pour arrêter la transmission du SARM est inconnu, mais une étude dans les unités de soins intensives où le niveau de conformité était de 59%, a prédit qu'une augmentation de 12% de la conformité aurait pu être suffisante pour prévenir la transmission [216].

#### **5.5. Décontamination environnementale**

Quelle est l'importance des surfaces environnementales contaminées comme réservoir de SARM ? La fréquence rapportée des surfaces environnementales contaminées a varié de quelques pourcents dans la plupart des études à plus de 64-74% dans d'autres [221,222].

Les directives d'isolement des *CDC* recommandent que les hôpitaux disposent de procédures adéquates pour les soins de routine, nettoyage, désinfection des surfaces environnementales, lits, ridelles, équipements de chevet, et autres surfaces touchées fréquemment [223]

# CHAPITRE 3

## MATERIELS ET METHODES

---

## **1. Plan de l'étude**

Nous avons effectué une étude moléculaire prospective des isolats de *S. aureus* causant des infections dans le CHU d'Annaba entre Février et Octobre 2010. Les souches étudiées ont été isolées à partir de différents échantillons pathologiques à visée diagnostic. Une première identification phénotypique des souches a été réalisée au moyen de méthodes conventionnelles, et confirmée ultérieurement par la spectrométrie de masse MALDI TOF. La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée pour 18 antibiotiques avec la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton, avec l'utilisation de l'automate SIRscan (I2a) pour la lecture numérique des antibiogrammes. Par la suite, une deuxième identification moléculaire au moyen d'une triplex PCR en temps réel, a été réalisée pour toute souche de *S. aureus* non-dupliquée susceptible d'être un SARM, c.-à-d. ayant un phénotype R (résistant) ou I (intermédiaire) à la céfoxitine. La caractérisation moléculaire des souches de SARM a été étudiée en utilisant une variété de méthodes moléculaires : typage spa, MLST, SCCmec, ainsi que la détection des gènes codant la leucocidine de Pantone Valentine.

## **2. Lieu et période de l'étude**

Cette étude a été menée au sein du centre hospitalo-universitaire d'Annaba. L'hôpital universitaire de cette quatrième plus grande région métropolitaine en Algérie est un hôpital de soins tertiaires de 1087-lits. Il est constitué d'une clinique ophtalmologique et des quatre hôpitaux suivants :

- (i) *Dorban* : maladies infectieuses, pneumologie, dermatologie, ORL, et hématologie ;
- (ii) *Ibn Sina* : médecine interne, cardiologie, réanimation médicale, grand-brûlés, endocrinologie-diabétologie, gastrologie, néphrologie dialyse, neurologie, et urgences médicales ;

- (iii) *Ibn Rochd* : gynécologie-obstétrique, néonatalogie, traumatologie, urologie, chirurgie générale, urgences chirurgicales, anesthésie réanimation, et neuro-chirurgie ;
- (iv) Ste Thérèse : pédiatrie, et réanimation pédiatrique.

L'étude s'est déroulée sur une période de 9mois : du 1er Février 2010 au 31 Octobre 2010.

### **3. Procédure de l'étude**

#### **3.2. Critères d'inclusion et de non-inclusion**

Sont inclus dans l'étude :

- Tous les patients hospitalisés ayant eu une culture positive au *S. aureus* ont été inclus dans l'étude ;
- Chez les patients qui ont eu plusieurs épisodes d'infections à *S. aureus* au cours de leur séjour à l'hôpital, seul le premier épisode a été retenu ;
- Nous avons considéré comme positifs, les prélèvements qui, après culture sur les différents milieux sélectifs, présentent des germes susceptibles de causer une infection vraie accompagnés de signes biologiques liés à l'inflammation avec l'éventuelle présence de leucocytes, notamment de polynucléaires (coloration bleu de méthylène).

Ne sont pas inclus dans l'étude :

- Les patients traités en consultaion externe ou admission en hopital de jour ;
- Les prélèvements vaginaux et spermocultures ;
- Les souches dupliquées (doublons) définies comme des souches isolées chez le même patient et appartenant à la même espèce bactérienne avec un modèle de sensibilité aux

antibiotiques identique (résistante ou intermédiaire ont été considérées comme identiques) ont été exclus ;

- Un prélèvement est déclaré contaminer si nous isolons 03 germes et plus [19].

### **3.3. Données des patients**

- Les informations recueillies sur chaque patient, y compris : le sexe, l'âge, la date d'admission, date de prélèvement, type d'échantillon et le type de service, ont été recueillis et enregistrées dans le logiciel WHONET (Brigham and Women's Hospital), puis transférées et traitées avec Excel (Microsoft 2013) ;
- Aux fins de déclaration statistique, un délai de 48 h après admission a été utilisé pour déterminer si un isolat était d'acquisition hospitalière ou communautaire.

### **3.4. Etude bactériologique**

#### **3.4.1. Prélèvement et transport**

Au total, 7620 prélèvements pathologiques à visée diagnostic (excepté la sérologie et la recherche de BK) provenant des trois hôpitaux : *Dorban, Ibn Sina, Ste Thèrèse*, ainsi que le service néonatalogie de l'hôpital *Ibn Rochd* et la clinique ophtalmologique, ont été recueilli au niveau du laboratoire central de microbiologie au sein de l'hôpital *Dorban* durant la période d'étude. Vous trouveriez dans le **tableau 25 (annexe 1)** les différents types de prélèvements reçus, ainsi que leurs conditions de transport et de conservation.

#### **3.4.2. Protocole de recherche de *S. aureus* dans les produits pathologiques**

Après réception des prélèvements au sein du laboratoire central de microbiologie – Hôpital Dorban, Annaba, Algérie (**Tableau 25**) ;

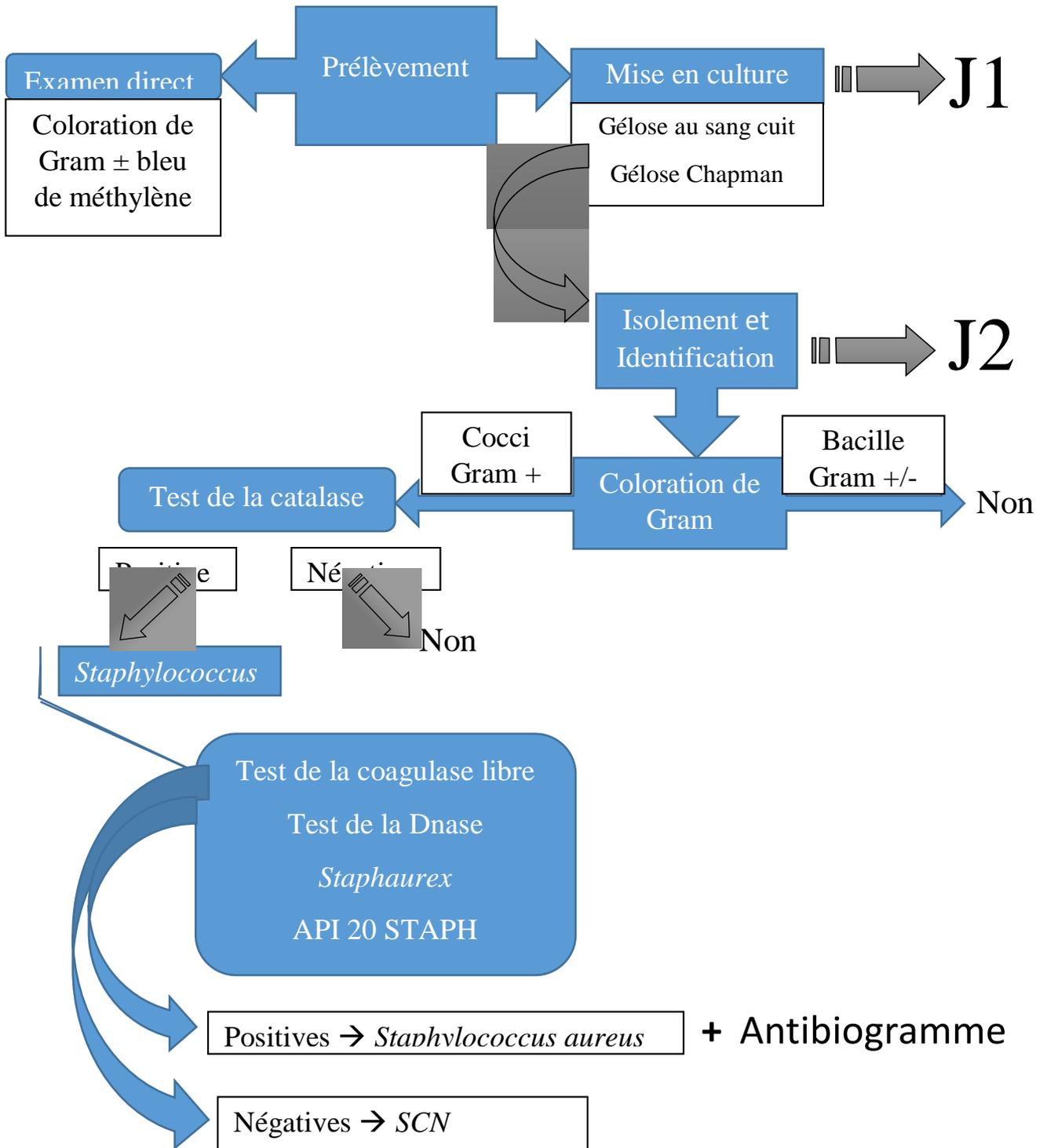


Figure 4 : Schéma du protocole de confirmation des colonies de *S. aureus*.

**J1 : A partir du prélèvement, on réalise :**

- ➔ un examen direct en faisant soit une coloration de Gram ou au bleu de méthylène (**annexe 2**) :
  - Si après la coloration de Gram, on observe des cocci ronds, Gram +, groupés en amas  
➔ **possibilité de staphylocoques.**
  - Si après la coloration au bleu de méthylène, on observe des cocci ronds isolés en bleu  
➔ **possibilité de staphylocoques.**
- ➔ une mise en culture sur milieu enrichi (GSC ou GSF) et sur milieu sélectif (Gélose de Chapman) – incubation à 37°C.

**J2 : Identification des colonies isolées :**

- ➔ refaire une coloration de Gram.
- ➔ rechercher la catalase (**annexe2**)
  - Si on observe des cocci en amas Gram (+), catalase (+) ➔ **suspicion de *staphylococcus***
  - l'observation de colonies pigmentées en jaune et mannitol + (entourées d'une auréole jaune) ➔ **forte suspicion de *S. aureus***
- ➔ effectuer alors les tests suivants : test de la coagulase libre, test de la DNase, test d'agglutination (*Staphaurex*) afin de faire la différenciation entre *S. aureus* et SCN (**annexe 2**).
- ➔ Due à des rares faux négatifs ou positifs occurrent lors des tests précédents, une confirmation des résultats a été réalisée au moyen d'API 20 STAPH (**annexe 2**).

### **3.4.3. Antibiogramme**

La sensibilité antimicrobienne a été déterminée pour 18 antibiotiques en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé de Muller-Hinton (méthode de *Kirby-Bauer*), et interprété selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie [77] pour les antibiotiques suivants. : pénicilline G (6µg), oxacilline (5µg), céfoxitine (30µg), kanamycine (30UI), tobramycine (10µg), gentamicine (15µg), érythromycine (15UI), clindamycine (2UI), vancomycine (30µg), teicoplanine (30µg), tétracycline (30UI), ofloxacine (5µg), fosfomycine (50µg), triméthoprim/sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg), chloramphénicol (30µg), rifampicine (30µg), pristinaamycine (15µg), et l'acide fusidique (10µg) (**annexe 3**).

**NB** : Un disque de nitrofurantoïne (300µg) a été déposé pour différencier le genre *Staphylococcus* (sensible >15) du genre *Micrococcus* (≤15 résistant).

### **3.4.4. Recherche de la résistance de *Staphylococcus aureus* à l'oxacilline**

#### **3.4.4.1. Test de diffusion du disque de céfoxitine**

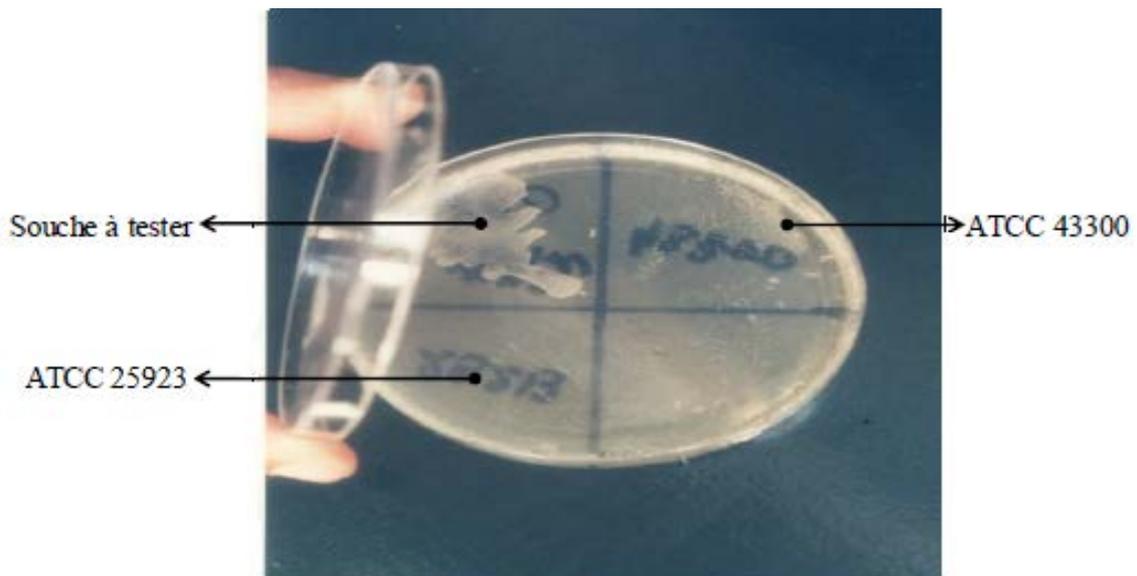
La résistance de *S. aureus* aux pénicilline M (oxacilline) est recherchée à l'aide d'un disque de céfoxitine (30 µg), en plus du disque d'oxacilline lui-même dans les conditions standard [77]. Les critères d'interprétation sont : ≥ 27 mm, sensible à l'oxacilline ; < 25 mm, résistant à l'oxacilline.

Un test de confirmation par la technique du screening à l'oxacilline est réalisé [78].

#### **3.4.4.2. Test de screening à l'oxacilline**

- Dans 10 ml d'eau distillée stérile, 6 mg d'oxacilline sont dissous, une dilution au dixième dans de l'eau distillée est réalisée ;

- La solution obtenue est répartie à raison de 2 ml par tube. Ainsi conditionnées, ces solutions peuvent être conservées à -20°C pendant une semaine, au bout de laquelle elles doivent être renouvelées ;
- Dans une boîte de Pétri stérile, 2 ml de cette dilution sont déposés, 18 ml de gélose Mueller-Hinton additionnée de 4% de NaCl y sont ajoutés, le contenu est mélangé par des mouvements rotatoires. L'inoculum est réalisé de la même manière que celui de l'antibiogramme ;
- La boîte de Pétri est divisée en quatre cadrans : l'un est ensemencé par la souche à tester, les deux autres par les souches de références : *S. aureus* ATCC 25923 souche sensible à l'oxacilline et *S. aureus* ATCC 43300 souche résistante à l'oxacilline, alors que le quatrième quadrant est non ensemencé ;
- La boîte est ensuite incubée durant 24 heures à 37°C en atmosphère normale. La culture de plus d'une colonie suffit pour indiquer une résistance à l'oxacilline, impliquant une résistance à toute les  $\beta$ -lactamines (ensemencement en masse) (**Figure 5**).



**Figure 5** : Test de la recherche de la résistance à l'oxacilline chez *S. aureus*.

### **3.4.5. Conservation des souches**

Toutes les souches avec un phénotype R ou I à la céfoxitine ont été repiquées dans des tubes gélosés de conservation (en piqûre centrale), puis conservées à température ambiante.

Afin d'effectuer une analyse moléculaire de ces dernières, un stage pratique de 5 mois a été effectué au sein du service de bactériologie de l'hôpital Bichat Claude-Bernard à Paris, France.

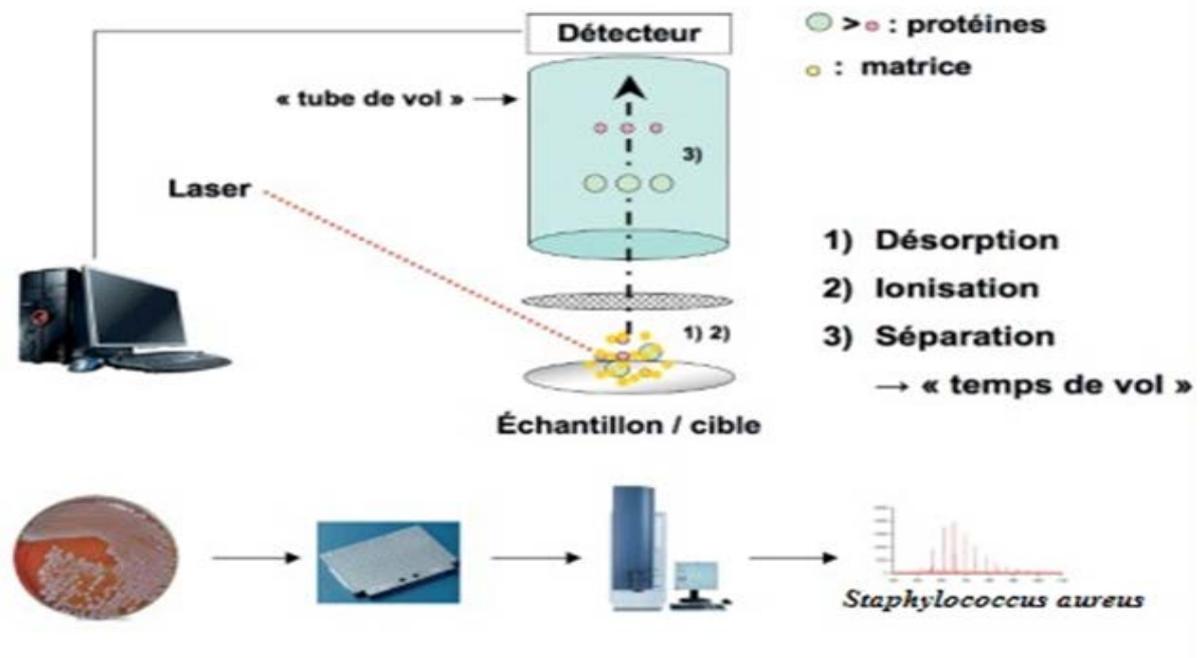
En premier lieu, deux repiquages consécutifs ont été effectués pour chaque souche : le premier consistait à inoculer les souches dans de BHIB liquide et incubées pendant 24 h à 37°C. Le deuxième repiquage est effectué sur milieu solide (gélose TSA). L'ensemble a été incubé à 37°C pendant 18 h pour avoir des cellules bactériennes à leur phase exponentielle de croissance. Ensuite, une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF ainsi qu'un deuxième antibiogramme ont été performés afin de confirmer les résultats préalablement obtenus.

### **3.4.6. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF**

#### **3.4.6.1. Principe**

Dans le processus MALDI-TOF, la bactérie à identifier est incluse dans une matrice, et immobilisée sous forme de cristaux sur une lame. Le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. La cible est par la suite bombardée par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. Les ions générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ électrique qui les dirige vers l'analyseur. Ce dernier permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol (TOF) La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les plus grandes molécules mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les plus petites molécules arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme d'une série de spectres de masse (pics) [224]. Un spectre de masse est une sorte d'empreinte digitale

spécifique et unique de la composition en protéines du microorganisme analysé, qui peut être comparé à une banque de données de spectres [71] (**Figure 6**).



**Figure 6** : Principe de la spectrométrie de masse [224].

#### 3.4.6.2. Préparation de la matrice IVD HCCA

- Ajoutez 250  $\mu$ L 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  $\alpha$ -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 utiliser.

### **3.4.6.3. Préparation des échantillons**

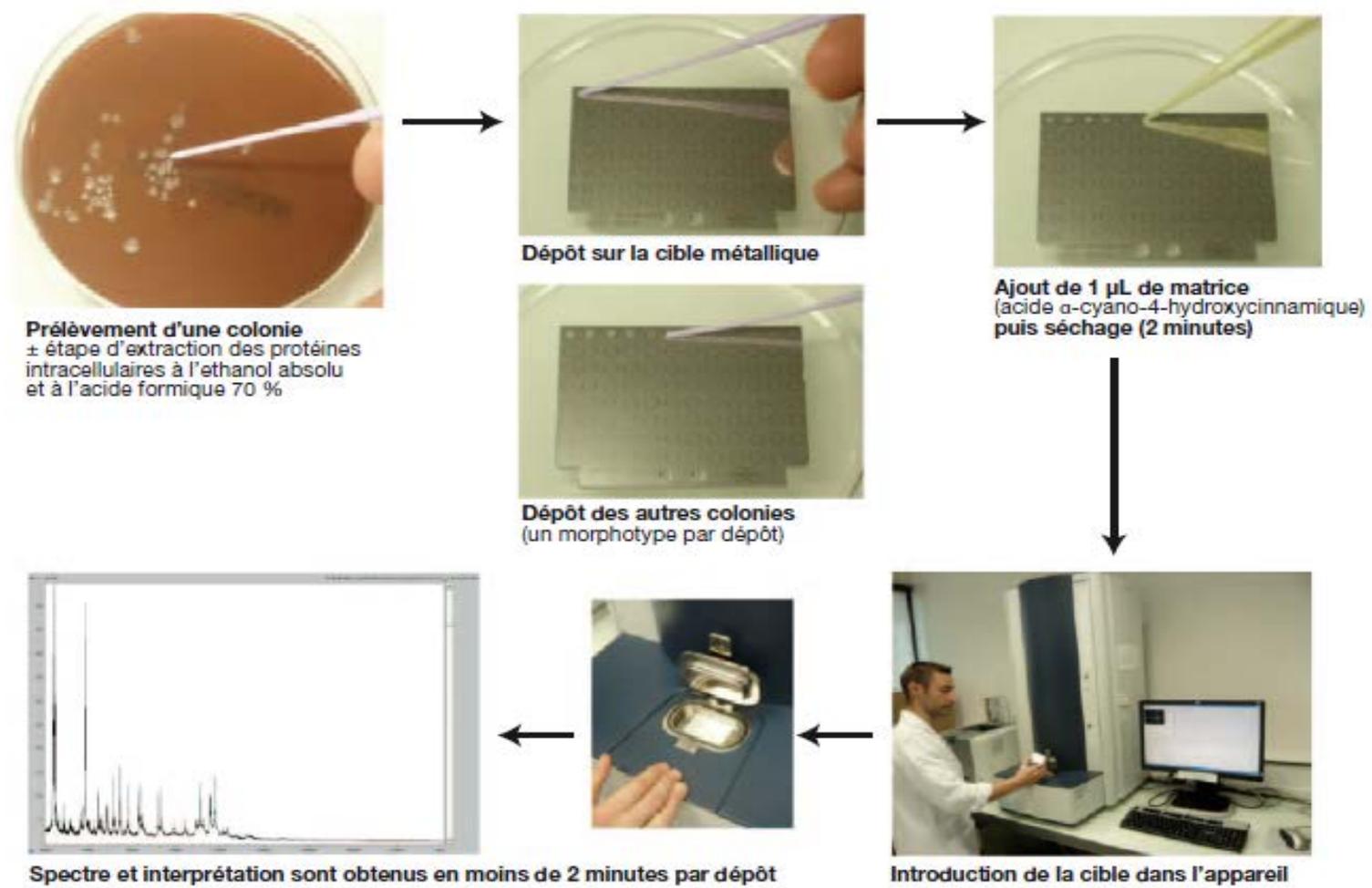
La première étape de préparation des échantillons est celle de la mise en place du plan de dépôt qui se fait à partir du *Sirweb*. C'est un logiciel servant à introduire les différentes données des échantillons (renseignements cliniques du patient, isolats, résultats d'antibiogramme, ainsi que la constitution du plan de dépôt pour MALDI-TOF) (**Figure 7**).

- Transférez une seule colonie sous forme de fine pellicule à l'aide d'un embout (0.1-10 µl), directement sur une cible MALD (1 spot sur la lame) ;
- Recouvrez l'échantillon avec 1µl IVD HCCA de solution ;
- Laissez sécher l'échantillon recouvert de matrice à température ambiante pendant 5 min ;
- Introduisez la lame dans le MALDI-TOF et lancez l'analyse.

### **3.4.6.4. Validation des résultats**

- Les résultats d'identification sont donnés par le germe associé à un score de 0 à 3 ;
- On valide l'identification lorsqu'un score est supérieur à 1,9 ;
- Si le score est inférieur à 1.9 → on ne note pas d'Id.

**NB** : Un deuxième antibiogramme selon les recommandations de CA-SFM a été réalisé pour les souches *S. aureus* confirmées par MALDI TOF [77]. L'automate SIRscan (I2a) a été utilisé pour la lecture numérique des antibiogrammes.



**Figure 7** : Séquence d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne.

### **3.5. Etude moléculaire**

#### **3.5.1. Préparation du tampon de lyse**

**Pour 10 mL ;**

Dans un tube conique de 15 mL, on ajoute :

- 10mM TRIS-HCL (1M) pH=8 100µL

(GibcoBRL ; Life technologie)

- 1mM EDTA (0,5M) pH=8 20µL

(Gibco ; Invitrogen Corporation)

- TRITON X-100 100µL

(Sigma; molecular biology)

- 100mM NaCl 1M 1mL

(Coopération pharmaceutique française)

(Préparation 50mL=pesé 2,422g, qsp 50mL avec eau distillée)

- Eau distillée qsp 10mL 8.78mL

#### **3.5.2. Extraction de l'ADN**

L'ADN a été extrait directement de cultures jeunes de 18 à 24h. Brièvement, quatre colonies uniques de chaque souche ont été ajoutées dans des tubes Eppendorf contenant 50 µl de billes de verre et de 150 µl du tampon de lyse. Les suspensions ont été agitées vigoureusement au vortex pendant 5 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. **NB** : Une dilution au 1/10<sup>ème</sup> est nécessaire pour la PCR en temps réel.

### **3.5.3. Identification moléculaire des souches de *S. aureus* et détection du gène *mecA***

L'identification moléculaire des souches de *S. aureus*, ainsi que détection de la résistance à la méticilline ont été réalisées en utilisant une triplex RT-PCR sur toutes les souches *S. aureus* non-dupliquée ayant un phénotype R (diamètre d'inhibition < 25mm) ou I (entre 25-26mm) à la céfoxitine. Cette technique permet de détecter 3 gènes dans une seule et même PCR en une durée de 90min. Les 3 gènes ciblés sont : (i) le gène *mecA* codant la résistance à la méticilline, (ii) le gène *rrs*, signature du genre *Staphylococcus*, et (iii) le gène *femA*, spécifique à l'espèce *S. aureus*.

#### **3.5.3.1. Principe**

Comme pour la PCR, on utilise deux amorces (une amorce sens qui se fixe sur le brin négatif et une amorce antisens qui se fixe sur le brin positif) nécessaires à l'amplification du produit. Pour la PCR en temps réel, on ajoute un oligonucléotide en même temps que les amorces. 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). A 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". Toutefois, le Taqman ne permet pas "vraiment" de suivre

l'amplification à chaque cycle : il faut attendre que la réaction de PCR soit totalement réalisée pour obtenir les résultats.

### **3.5.3.2. Produits de biologie moléculaire**

- 3 couples d'Amorces nucléotidiques (**Tableau 6**) ;
- 3 sondes d'hybridation (*probs*, **tableau 6**) ;
- *RNase / DNase free water* (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France);
- PCR Master Mix prés à l'emploi [(Taq polymérase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, *reaction buffers*) (Promega)].

### **3.5.3.3. 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.

### **3.5.3.4. Mode opératoire**

- Réserver l'appareil de PCR en temps réel [ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied, Courtaboeuf, France)] et un créneau ;
- 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, 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 :

**Tableau 5** : Protocole d'amplification d'une triplex RT-PCR [99,225].

Température	Durée	Phase	Nombre de cycles
50°C	2min	-	1x
95°C	10 min	Dénaturation	1x
95°C	15s	Dénaturation	<b>40x</b>
60°C	60s	Hybridation	
60 --> 95°C	-	Dissociation (courbe)	1x

Etape 1: 2 minutes à 50°C en présence de l'UDG pour empêcher l'amplification des produits PCR contaminants. L'UDG sera inactivée lors de l'étape de dénaturation à 95°C.

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

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

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

Etape 5 : La courbe de dissociation permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié. Elle est réalisée en soumettant les amplicons à une température progressant de 60°C à 95°C par palier de 0,5°C et en mesurant l'intensité de fluorescence en continu.

- Sauvegarder le fichier puis éteindre le programme ;
- Dans la pièce pré-PCR, préparer le mix PCR :

<b>Mix pour 1</b>	<b>1 tube en <math>\mu</math>l</b>
Amorces + sondes	9 (1 $\mu$ l de chaque amorce/sonde de 0.2 $\mu$ M de concentration)
PCR Master Mix	2.5
H2O qsp 23	11.5

- Dans la pièce d'extraction, sous une hotte, procéder aux manipulations suivantes :

Déposer 23 $\mu$ L du mix PCR dans chacun des puits (plaque 96 puits) utilisés ;

Déposer 2 $\mu$ 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.

**Tableau 6** : Amorces et sondes fluorogéniques utilisées pour la première triplex RT-PCR [99].

Gène cible / Sonde	Séquence (5' → 3')	Reporter (5')	Concentrations (μM)
<i>mecA</i>			
<i>mecA For</i>	5'-GAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAA-3'		0.2
<i>mecA Rev</i>	5'-GATGCCTATCTCATATGCTGTTC-3'		0.2
<i>mecA probe</i>	5'-GACCGAAACAATGTGGAATTGGCCA-3'	<i>Yakima yellow</i>	0.2
<i>femA</i>			
<i>femA For</i>	5'-TGCTGGTGGTACATCAAA-3'		0.2
<i>femA Rev</i>	5'-ACGGTCAATGCCATGATTTAA-3'		0.2
<i>femA probe</i>	5'-ATTTTGCCGGAAGTTATGCAGTGCAATG-3'	<i>Fluorescein FAM</i>	0.2
Signature des staphylocoques dans le gène <i>rrs</i>			
<i>rrs For</i>	5'-ACTGCTGCCTCCCGTAGG-3'		0.2
<i>rrs Rev</i>	5'-AGCCGACCTGAGAGGGTGA-3'		0.2
<i>rrs probe</i>	5'-CCACACTGGAAGTACTGAGACACGGTCC-3'	<i>Dragonfly orange</i>	0.2

*For* : brin sens, *Rev* : brin anti-sens

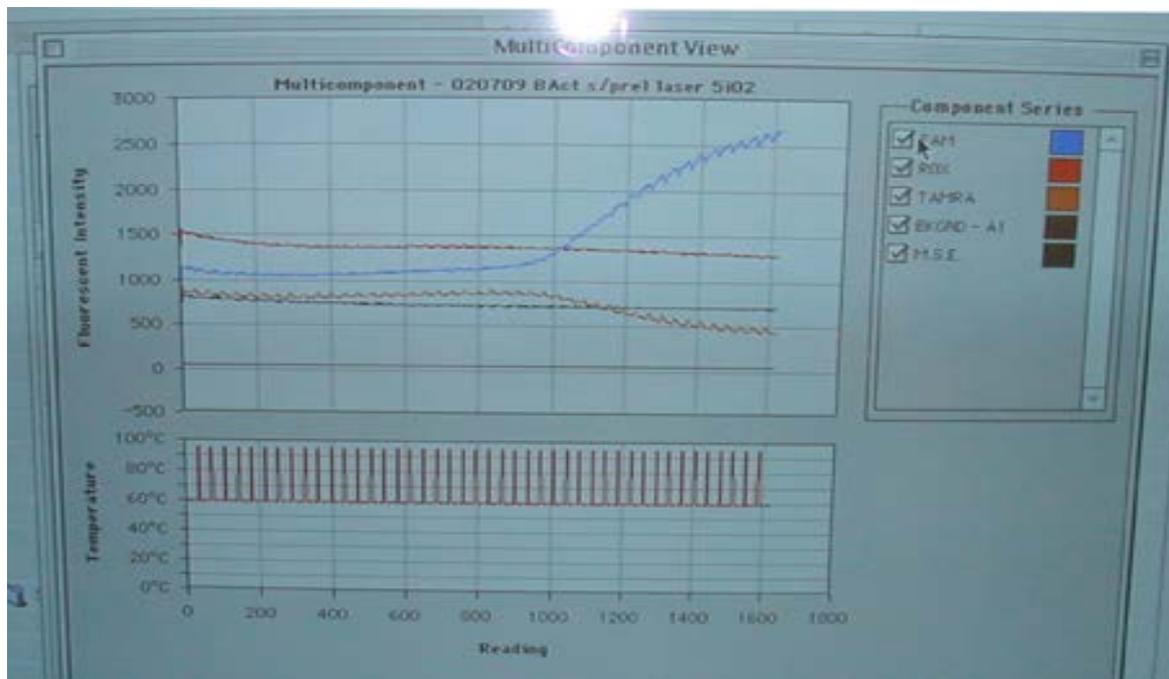
### 3.5.3.5. Mesure de la fluorescence

Il existe plusieurs types de fluorochromes (**Figure 8**), par exemple :

- FAM : fixé en 5' de la sonde, a son pic d'absorption vers 530 nm (courbe bleue).

Grâce à 96 fibres optiques situées sous chaque puits, on peut 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.

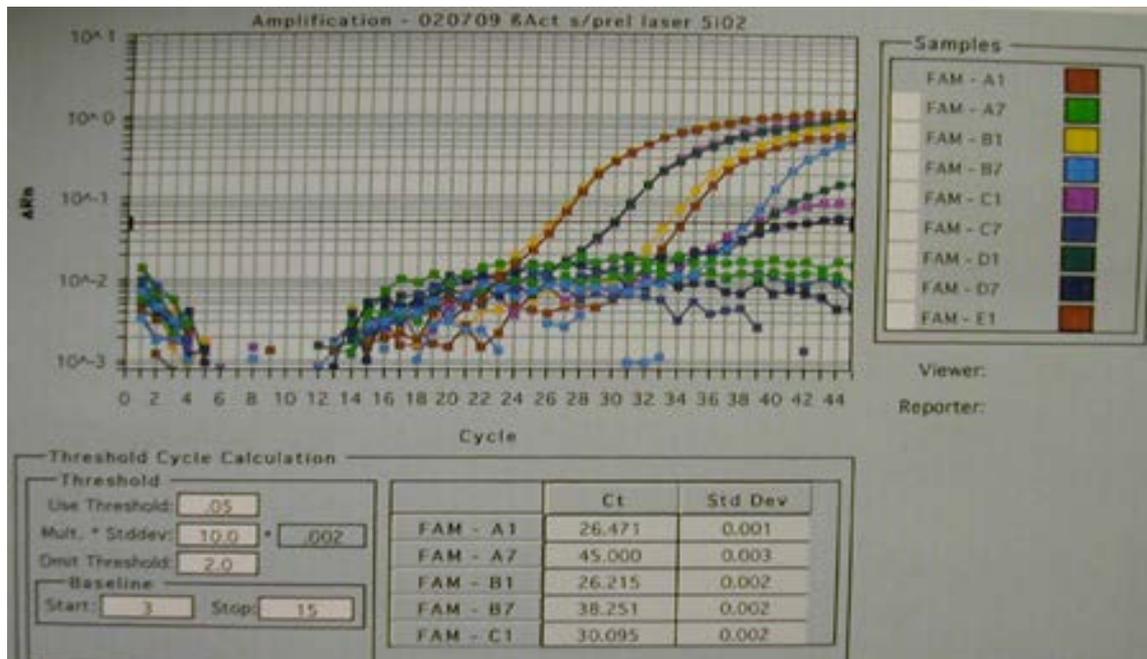


**Figure 8** : Exemple de quelques fluochromes.

### 3.5.3.6. Résultats

Voici le type de graphique que l'on obtient lorsque la réaction de PCR est terminée (**Figure 9**).

Ce graphique représente en abscisse le nombre de cycle et en ordonnée la quantité d'ADN amplifié.



**Figure 9** : Graphique des produits d'une RT-PCR.

### 3.5.4. Détection de la leucocidine de Panton-valentine (PVL)

La détection de la PVL a été réalisée sur toutes les souches identifiées comme SARM, en utilisant une deuxième tiple RT-PCR qui permet de détecter les 3 gènes suivants : (i) *mecA*, (ii) *nuc* spécifique à l'espèce *S. aureus*, et (iii) PVL codant la toxine de Panton-Valentine.

Pour les souches contrôle, on a utilisé :

- SARM ATCC 49775 comme contrôle positif pour les gènes *mecA*, *nuc* et *PVL* ;
- SARM ATCC 43300 comme contrôle négatif pour le gène *PVL* ;
- Témoin eau comme control négatif pour tous les gènes.

**Tableau 7** : Amorces et sondes fluorogéniques utilisées pour la deuxième triplex RT-PCR [225].

Gène cible / Sonde	Séquence (5' → 3')	Reporter (5')	Concentrations ( $\mu M$ )
<i>mecA</i>			
<i>mecA For</i>	5'-GGCAATATTACCGCACCTCA-3'		0.3
<i>mecA Rev</i>	5'-GTCTGCCACTTTCTCCTTGT-3'		0.3
<i>mecA probe</i>	5'-AGATCTTATGCAAACCTTAATTGGCAAATCC -3'	FAM	0.1
<i>Nuc</i>			
<i>nuc For</i>	5'-CAAAGCATCAAAAAGGTGTAGAGA-3'		0.05
<i>nuc Rev</i>	5'-TTCAATTTTCTTTGCATTTTCTACCA-3'		0.05
<i>nuc probe</i>	5'-TTTTCGTAAATGCACTTGCTTCAGGACCA-3'	VIC	0.05
PVL			
<i>PVL For</i>	5'-ACACACTATGGCAATAGTTATTT-3'		0.3
<i>PVL Rev</i>	5'-AAAGCAATGCAATTGATGTA-3'		0.3
<i>PVL probe</i>	5'-ATTTGTAAACAGAAATTACACAGTTAAATATGA-3'	Cy5	0.1

*For* : brin sens, *Rev* : brin anti-sens

### **3.5.5. Typage du gène spa**

Le protocole opératoire de cette technique de typage moléculaire spécifique à l'espèce *S. aureus* se résume à faire une PCR classique, et à purifier le produits de PCR de tout composé résiduel. Pour contrôler la qualité de la PCR, les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. On réalise ensuite une réaction de séquence ainsi que sa purification sur gel *sepahdex* et enfin on la fait passer à un séquenceur d'ADN afin de déterminer la séquence de la région polymorphe X du gène *spa*.

#### **3.5.5.1. La PCR**

##### **a- Produits de biologie moléculaire**

- Préparation des dNTP à 4 mM (**annexe 4**) ;
- Préparation des amorces :  
1095 F (sens) : 5'AGACGATCCTTCGGTGAGC3'  
1517 R (anti-sens) : 5'GCTTTTGCAATGTCATTTACTG-3'  
à 20 pmol/μl (voir annexe n°4 pour dilution des amorces) ;
- Tampon Taq DNA pol 10x contenant du MgCl<sub>2</sub> (25mM) ;
- Taq DNA polymerase (5U/μl).

##### **b- Préparation du mix**

<b>Mix pour 1</b>	<b>1 tube en μl</b>
Amorce spa 1095F (20pmol/μl)	4
Amorce spa 1517R (20pmol/μl)	4
dNTP (4mM)	3
Tp Taq 10x	5
TaqDNApol (5U/μl)	0,5
H <sub>2</sub> O qsp 50	28,5

- On ajoute 5μl d'ADN à 10ng/μl.

**c- Protocole d'amplification**

**Tableau 8:** Protocole d'amplification d'une PCR classique pour typage du gène *spa* [226].

Température	Durée	Phase	Nombre de cycles
94°C	5min	Dénaturation Initiale	1x
94°C	30sec	Dénaturation	
60°C	30sec	Hybridation	<b>30x</b>
72°C	45sec	Elongation	
72°C	10min		1x
15°C	∞		

Durée de PCR environ 2 heures.

Etape 1 : 94°C pendant 5min est une étape de chauffage qui permet d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, de déshybrider les ADN double brin, d'activer les polymérasés de type « *Hot Start* », et de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution.

Etape 2 : 94°C pendant 30sec permet de dénaturer l'ADN, de décrocher les polymérasés qui seraient encore liées à une matrice.

Etape 3 : 60°C pendant 30sec permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice.

Etape 4 : 72°C pendant 45sec permet aux polymérasés de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice.

Etape 5 : 72°C pendant 10 min pour permettre aux élongations de se terminer, puis le thermocycler retombe à 15°C ce qui va permettre de stopper la réaction puisque plus aucune enzyme n'est activée à cette température.

**d- Purification des produits de PCR**

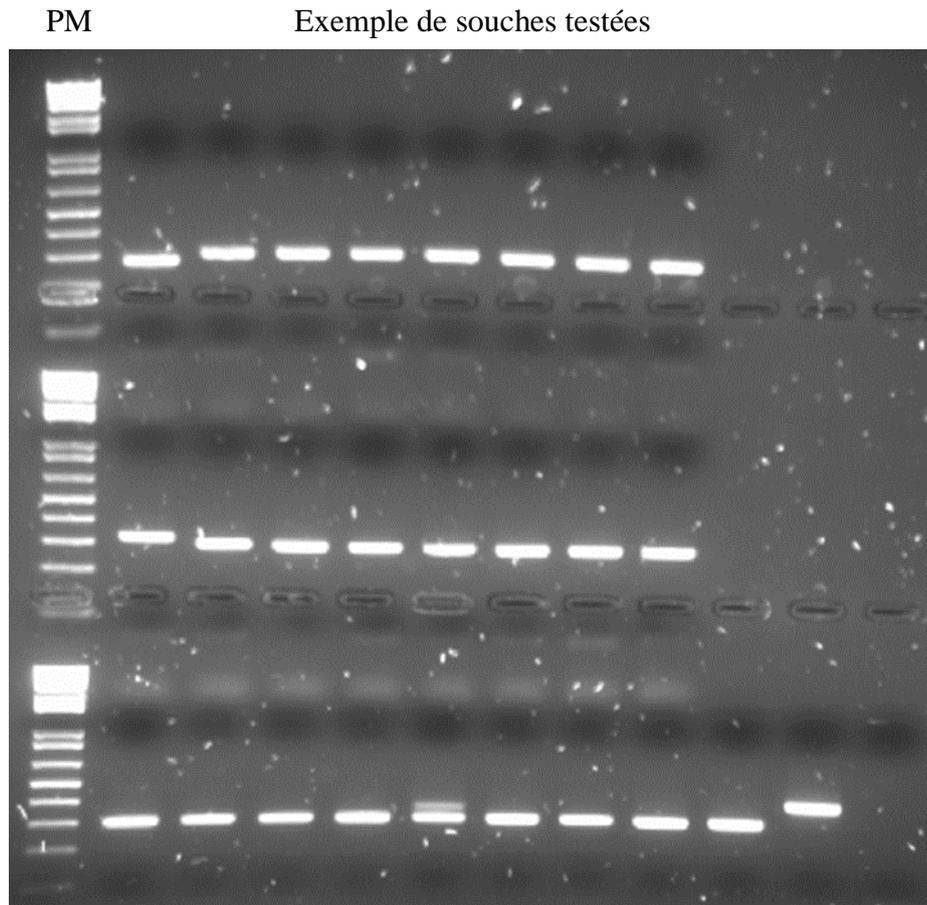
- Déposer les produits PCR dans chacun des 96 puits de la *MultiScreen MANU 03050* PCR non utilisé ;
- Disposer la plaque *MultiScreen MANU 03050* PCR (en cours) sur le système d'aspiration ;
- Déclencher la pompe d'aspiration ;
- Appuyer sur la plaque pour faire le vide ;
- Régler le manomètre (à 15 bars maximum) ;
- Attendre 5min ;
- Eteindre la pompe et retirer la plaque de son support. Essuyer le fond avec une feuille de papier ;
- Déposer 50 µl *RNase / DNase free water* dans chacun des puits,
- Disposer la plaque sur le support de plaque approprié pour le *vortex* ;
- Agiter pendant 10 minutes à la plus faible vitesse pour resuspendre le produit PCR ;
- Récupérer la totalité de produits de PCR dans une nouvelle plaque de 96 puits ;
- Marquer une croix sur le puits utilisé de la plaque *MultiScreen Manu 03050* PCR.

**e- Quantification de produits de PCR purifiés (Migration de produits PCR sur gel d'agarose)**

La préparation du gel d'agarose 1.7% se fait comme suit :

- 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 au micro-onde pour dissoudre complètement et obtenir une solution limpide ;
- Ajouter 10  $\mu$ l de SYBR Safe dans le gel qui est revenu à une température de 40°C ;
- Couler le gel dans une grande cuve ou 2 moyennes cuves (cuves préalablement nettoyées au savon puis rincées à l'eau distillée et sécher) ;
- La cuve est placée dans son support, y joindre le peigne (préalablement nettoyé comme la cuve) ;
- Placer ce montage sur une table en vérifiant le niveau ;
- 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 ;
- Attention : Le gel doit être bien recouvert avec la solution TAE 0,5x pour que l'électricité puisse passer ;
- Déposer 5  $\mu$ l PM (PM = *DNA Ladder, Low range*), 1  $\mu$ l de bleu de bromophénol et 5  $\mu$ l d'ADN purifié ;
- Migration : 100 volts pendant 30 min ;
- Faire l'électrophorèse à l'abri de la lumière ;
- Déposer le gel sous une lumière UV. Attention : Porter lunettes et masque ;
- Prendre la photo (Utilisation appareil Photo) et l'enregistrée dans une carte mémoire ;
- Placer la carte mémoire dans un ordinateur et l'analyser avec le programme *Nikon* (**Figure 10**).



**Figure 10** : Migration sur gel d'agarose des produits de PCR purifiées

**3.5.5.2. Réaction de séquence**

**a- Produits de biologie moléculaire**

- Coffret Big Dye (5 x sequencing Buffer);
- Amorces à 3,2 pmol : 1095F et 1517R (**annexe 1**) ;
- *Dnase/Rnase free water* (eau BM) ;

**b- Préparation du mix**

<b>Mix pour 1</b>	<b>1tube en µl</b>
Mix Big Dye Terminator	1
Tampon 5 x Buffer	1,5
Amorces 3,2 (pmol/µl)	1,5

- On ajoute 2  $\mu\text{l}$  d'ADN purifié à 10ng/ $\mu\text{l}$
- On ajoute de l'eau tel que :

4  $\mu\text{l}$  du mix + 2  $\mu\text{l}$  d'ADN + Y  $\mu\text{l}$  d'eau = **20  $\mu\text{l}$  au total.**

c- Protocole amplification (thermocycler : « programme séquence »)

96°C	10 sec.	} 25 cycles
50°C	05 sec.	
60°C	04 min.	
04°C	$\infty$	

Durée environ 2 heures.

### **3.5.5.3. Purification par Sephadex**

#### **a- But**

Purification des produits de séquençage à travers une membrane en SEPHADEX G50

SUPERFINE afin d'éliminer les ddNTP, et dNTP résiduels.

#### **b- Mode opératoire pour gel sephadex**

- Poser une plaque *Multiscreen* 96 puits (N.MAHVN 4510 Millipore) pour *sephadex* [Poudre 100 g sephadex <sup>TM</sup> G.50 Superfire (Amersham Pharmacia)] sur un papier propre ;
- Recouvrir la plaque noire 96 puits [Plaque *Multiscreen column Loader* 45  $\mu\text{l}$  (MACL 09645 Millipore)] de poudre SEPHADEX (pour les puits à utiliser) ;
- A l'aide d'une raclette en verre, boucher les trous de poudre. Le trop plein est éliminé et récupéré dans la boîte d'origine ;
- La plaque MAHVN 4510 est adaptée à l'envers sur la plaque noire contenant la poudre ;
- Après retournement, tapoter pour faire descendre l'intégralité de la poudre dans chaque puits ;

- Déposer 300  $\mu$ l de *Dnase Free water* dans chaque puits avec une pipette multicanaux avec cônes à filtres 100  $\mu$ l-300 $\mu$ l ;
- Attendre 3 heures avant l'utilisation à température ambiante ;
- On peut garder la plaque + le gel de sephadex 3 à 4 jours au réfrigérateur, bien enveloppés dans du parafilm ;

**c- Mode opératoire pour purification sur gel sephadex**

- Après 3h d'attente, récupérer la plaque contenant le *sephadex* ;
- Enlever l'excès d'eau par centrifugation (ne pas oublier de mettre une plaque dessous pour récupérer l'eau) ;
- Centrifuger à 2700T pendant 5 min ;
- Jeter l'excès d'eau ;
- Déposer la totalité des produits de séquence (20  $\mu$ l) sur la plaque *sephadex* sans oublier la nouvelle plaque de recueil ;
- Centrifuger à 2700T pendant 5 min ;
- Récupérer la plaque de recueil des produits de séquence purifiés, ajouter 10  $\mu$ l d'eau BM ;
- Couvrir avec une feuille autocollante (choisir les feuilles ABgene) ;
- Noter le nom de la plaque sur le côté, BAC + Date du Jour, ex. : Bac 070306.

**d- Enregistrement informatique**

- Préparer un plan de plaque avec le logiciel Excel, puis l'enregistré sous format .text dans le serveur de biochimie ;
- Remplir la feuille de route (nome de plaque, nom de fichier, plan de plaque) ;
- Déposer la plaque accompagnée de son plan ainsi que de la feuille de route au laboratoire de biochimie là ou y a un séquenceur pour effectuer le séquençage.

**3.5.5.4. Détermination du Spa type : Alignement des séquences avec**

**Bioedit**

- Récupérer les résultats de séquençage sous forme de 4 fichiers pour chaque souche (2 chromatogrammes et 2 séquences brutes) ;
- Ouvrir le fichier séparation en répétition Spa (fichier word) (**annexe 5**) ;
- Ouvrir le fichier séquences type Spa (fichier Excel) (**annexe 5**) ;
- Ouvrir *Bioedit* ;
- Importer les 2 séquences 1095F (brin sens) et 1517R (brin antisens) : file→open→format .abi ;
- Reverser et compléter la séquence 1517R ;
- Aligner les 2 séquences ;
- Prendre 1 séquence au choix : la copier et la coller dans le fichier word (répétition SPA) en bas de la feuille ;
- Repérer la séquence AAAGAA puis faire *entrée* avant chaque séquence AAAGAA ;
- Copier la séquence coupée et la coller dans le tableau excel ;
- Numéroté tous les fragments du numéro 1 à ... ;
- Après traitement des différents fragments avec le tableau Excel (fichier séquences type Spa), on les réécrit sous forme de suite horizontalement (exemple 07-23-12-21-17-34-34-34) ;
- Copier la suite et rechercher la dans la feuille Excel Spa type ;
- Le spa type sera sous forme t + numéro (exemple : t004).

### **3.5.6. Multilocus sequence typing (MLST)**

*Multilocus sequence typing* est une autre technique de typage moléculaire ayant un protocole opératoire semblable au typage du gène *spa*, sauf que pour le MLST, chacun des 7 gènes structuraux spécifiques à *S. aureus* à savoir : *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL* sont amplifiés et séquencés.

#### **3.5.6.1. La PCR**

##### **a- Produits de biologie moléculaire**

- Préparation des dNTP à 4 mM (**annexe 4**) ;
- Préparation des amorces à 20 pmol/μl (**Tableau 9**, et **annexe 4** pour dilution des amorces) ;
- Tampon Taq DNA pol 10x contenant du MgCl<sub>2</sub> (25mM) ;
- Taq DNA polymerase (5U/μl).

##### **b- Préparation du mix**

<b>Mix pour 1</b>	<b>1 tube en μl</b>
Amorce 1 up (20 pmol/μl)	2
Amorce 1 down (20 pmol/μl)	2
DNTP (4mM)	3
Tp TaqDNApol 10X	5
TaqDNA pol (5U/μl)	0,5
H2O qsp50 μl	30,5

- Répartir 45 μl de mix par tube ;
- Ajouter 5 μl d'ADN à 10ng/μl.

**Tableau 9** : séquences d'amorces utilisées pour MLST [227].

Amorces	Séquences
arcC-Up	5'-TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC-3'
arcC-Dn	5'-AGGTATCTGCTTCAATCAGCG-3'
aroE-Up	5'-ATCGGAAATCCTATTTACATTC-3'
aroE-Dn	5'-GGTGTGTATTAATAACGATATC-3'
glpF-Up	5'-CTAGGAACTGCAATCTTAATCC-3'
glpF-Dn	5'-TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC-3'
gmk-Up	5'-ATCGTTTTATCGGGACCATC-3'
gmk-Dn	5'-TCATTA ACTACAACGTAATCGTA-3'
pta-Up	5'-GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG-3'
pta-Dn	5'-GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA-3'
tpi-Up	5'-GCATTAGCAGATTTAGGCGTTA-3'
tpi-Dn	5'-TGCACCTTCTAACAATTGTACGA-3'
yqiL-Up	5'-CAGCATA CAGGACACCTATTGGC-3'
yqiL-Dn	5'-CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC-3'

Up : brin sens, Dn : brin anti-sens

**c- Protocole d'amplification**

**Tableau 10** : Protocole d'amplification d'une PCR classique pour MLST [104].

Température	Durée	Phase	Nombre de cycles
94°C	4.30min	Dénaturation Initiale	1x
94°C	30sec	Dénaturation	
50°C	1min	Hybridation	<b>30x</b>
72°C	30sec	Elongation	
72°C	10min	Elongation finale	1x
15°C	∞		

Durée de PCR 2 heures.

**d- Purification de produits de PCR**

Même méthode utilisée pour le typage du gène spa.

**e- Quantification de produits de PCR purifiés (migration sur gel d'agarose)**

Même méthode utilisée pour le typage du gène spa.

**3.5.6.2. Réaction de séquence**

**a- Préparation du mix**

Même réactifs et matériels que le typage du gène spa, à l'exception des amorces (**Tableau 9**).

**b- Protocole amplification (thermocycler : « programme séquence »**

96°C	30s	}	30 cycles
50°C	15s		
60°C	4 min		
0°C	∞		

Durée environ 2 heures.

**3.5.6.3. Purification par *sephadex***

La purification des produits de la réaction de séquence, ainsi que l'enregistrement informatique sont identiques à ceux du typage du gène *spa*.

**3.5.6.4. Détermination du *Sequence Type (ST)***

La séquence nucléotidique obtenue pour un gène d'une souche donnée est appelée un allèle. Un chiffre arbitraire est ensuite attribué à chacun des différents allèles identifiés. Cependant, les souches partageant la même séquence nucléotidique se voient attribuer le même numéro d'allèle. Les allèles de chaque gène sont ensuite regroupés pour former la séquence type (ST) correspondante [228]. Les ST obtenues permettent une étude phylogénétique de la population de *S. aureus* étudiée et peuvent aussi être comparées à d'autres dans une banque de données web, contenant plus d'un millier de souches (<http://saureus.mlst.net>).

### 3.5.7. Typage SCCmec

Cette technique consiste à réaliser 2 *multiplex* PCRs (M-PCRs) : M-PCR avec un premier set d'amorces (M-PCR1) pour l'identification des cinq types du complexe *ccr*, et une M-PCR2 pour identifier les classes A à C du complexe *mec*.

#### 3.5.7.1. M-PCR 1 (complexe *ccr*)

##### a- Produits de biologie moléculaire

- Préparation des dNTP à 0,2 mM ;
- Préparation des amorces à 0,1 $\mu$ M (Tableau 11, et annexe 4 pour dilution des amorces) ;
- Tampon Taq DNA pol 10x à 1mM ;
- MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM ;
- Taq DNA polymerase à 0,1 U/ $\mu$ l.

##### b- Préparation du mix

Mix amorces : 10  $\mu$ L de chaque amorce soit une dilution au 1/10<sup>ème</sup> (Vf : 100 $\mu$ l).

Mix pour 1	1tube en $\mu$ l
Amorces	0,5
dNTP	2,5
TaqDNApol	0,5
Tp Taq 10x	5
MgCl <sub>2</sub>	2
H <sub>2</sub> O qsp50	37,5

- On ajoute 2 $\mu$ l d'ADN à 10ng/ $\mu$ l

**Tableau 11** : Séquences d'amorces utilisées pour le typage des SCCmec [66].

Amorces pour PCR	Séquence 5'-->3'	Gène cible	SCCmec de référence	Gène(s) ou allèle(s) détectés (pair d'amorces)	taille attendue (pb)
M-PCR 1 (amplification des types du complexe <i>ccr</i> avec <i>mecA</i> )					
mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	<i>mecA</i>		Contrôle <i>mecA</i> (mA1-mA2)	286
mA2	AACGTTGTAACCACCCCAAGA	<i>mecA</i>			
$\alpha$ 1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	<i>ccrA1</i>	Type I	<i>ccrA1-ccr B1</i> ( <i>ccrAB1</i> ) ( $\alpha$ 1, $\beta$ c)	695
$\alpha$ 2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	<i>ccrA2</i>	Type II	<i>ccrA1-ccr B2</i> ( <i>ccrAB2</i> ) ( $\alpha$ 2, $\beta$ c)	937
$\alpha$ 3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	<i>ccrA3</i>	Type III	<i>ccrA1-ccr B3</i> ( <i>ccrAB3</i> ) ( $\alpha$ 3, $\beta$ c)	1791
$\beta$ c	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	<i>ccrB1</i> , <i>B2</i> , <i>B3</i>			
$\alpha$ 4U	GCGACGAATCAAATGTCCTTACTG	<i>ccrA4</i>	Type IV	<i>ccrA4-ccrB4</i> ( <i>ccrAB4</i> ) ( $\beta$ 4U, $\alpha$ 4U)	1287
$\beta$ 4U	ATCGCTCCAGTGTCTATACTTCGC	<i>ccrB4</i>			
<i>ccrCU1</i>	TTACCTTTGACCAATATCACATC	<i>ccrC</i>	Type V	<i>ccrC1</i> ( <i>ccrCU1</i> , $\gamma$ F)	518
$\gamma$ F	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT	<i>ccrC</i>			
M-PCR 2 (amplification des classes du complexe <i>mec</i> )					
mI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>mecI</i>	Type II, III	mA7-mI6 ( <i>mec</i> classe A)	1963
IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	<i>IS1272</i>	Type I, IV	mA7-IS7 ( <i>mec</i> classe B)	2827
IS2	TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT	<i>IS431</i>	Type V	mA7-IS2 ( <i>mec</i> classe C)	804
mA7	ATATACCAAACCCGACAACACTACA	<i>mecA</i>			

**c- Protocole d'amplification**

**Tableau 12** : Protocole d'amplification de M-PCR1 et M-PCR 2 [66].

Température	Durée	Phase	Nombre de cycles
94°C	4min	Dénaturation Initiale	1x
94°C	30sec	Dénaturation	
60°C	1min	Hybridation	<b>30x</b>
72°C	2min	Elongation	
72°C	4min	Elongation finale	1x
15°C	∞		

Durée environ : 2 heures.

**d- Migration sur gel d'agarose (voir typage *spa*)**

Même méthode utilisée pour le typage du gène *spa*.

**3.5.7.2. M-PCR 2 (complex *mec*)**

La M-PCR 2 est identique à la M-PCR 1 à l'exception des amorces (**Tableau 11**), et le mix d'amorces.

Mix amorces : 100 µL de mix amorces = 10 µL de chacune des 5 amorces (10µM) + 50 µL d'eau BM.

### **3.5.7.3. Interprétation SCCmec**

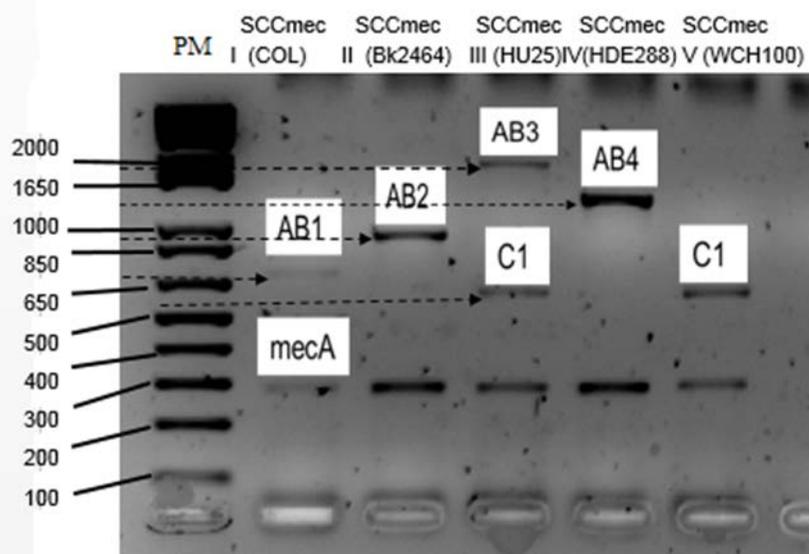
#### **a- Souches SARM utilisées comme référence pour les M-PCRs**

Les souches SARM de référence utilisées comme témoins étaient :

COL (SCC*mec* I), BK2464 (SCC*mec* II), HU25 (SCC*mec* III), WCH100 (SCC*mec* V), and HDE288 (SCC*mec* VI) (Hôpital Bichat Claude-Bernard).

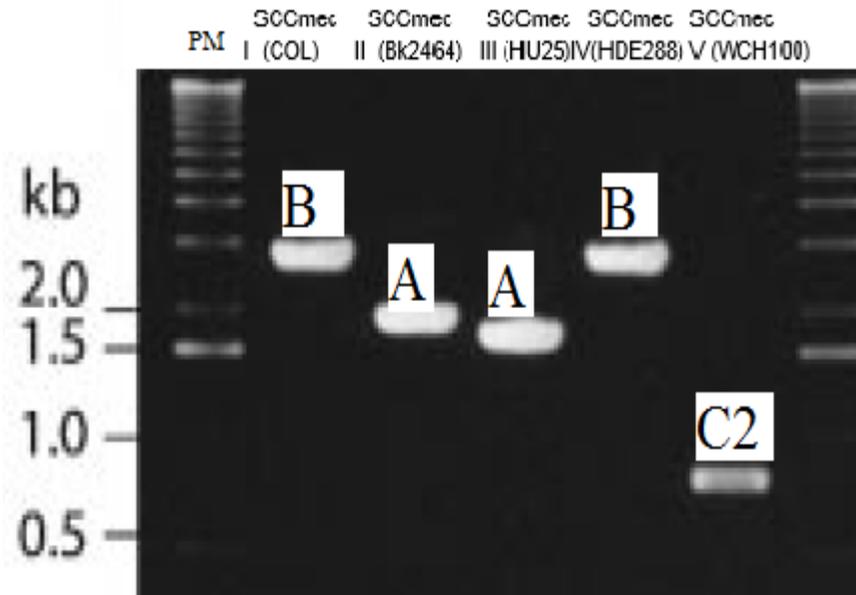
#### **b- Détermination du type SCCmec**

Une fois que la migration sur gel d'agarose des produits de PCR des deux M-PCRs soit finie, on compare la taille des bandes d'ADN des complexes *ccr* et *mec* obtenues avec celles mentionnées dans le **tableau 11** et avec celles des souches de contrôle (**Figures 11 & 12**). Une fois identifiées, la combinaison entre le type du complexe *ccr* et la classe du complexe *mec* permet de déterminer le type de SCC*mec* (**Tableau 2**).



AB3 : SCCmec type II                    1791bp  
 AB4 : SCCmec type V                    1287bp  
 AB2 : SCCmec type II et IV            937bp  
 AB1 : SCCmec type I                    695bp  
 C1 : SCCmec type V et III              518bp

Figure 11 : M-PCR 1 SCCmec locus *ccr*



Mec classe A : SCCmec II, III            1963bp  
 Mec class B : SCCmec I,VI et IV    2827bp  
 Mec classe C: SCCmecV                804bp

Figure 12 : M-PCR 2 SCCmec locus *mec*

### 3.2. Analyse statistique

Les données ont été saisies sur une base de données Microsoft access et analysées avec Microsoft Excel (Microsoft 2013).

#### 3.2.1. Statistiques descriptives

Dans notre étude :

- Prévalence = le nombre de personnes atteintes de la maladie à un moment donné / le nombre de personnes à risque :
  - On parle de prévalence sur un temps donné (mois, année,...) lorsqu'on mesure cette prévalence sur toute la période et non plus à un moment précis de la période.
  - On parle de prévalence instantanée si la mesure est effectuée à un temps donné.
- Incidence = nombre de nouveaux cas pendant une période donnée / le nombre de personnes à risque.
- Calcul du taux de densité d'incidence des infections à *S. aureus* :

$$\text{Ti des infections à } S. aureus = \frac{\text{Nombre de patients infecté par } S. aureus \text{ durant la période}}{\text{Nombre de jours-patients}} \times 1000 \text{ patients-jours}$$

Ou bien :

$$\text{Ti des infections à } S. aureus = \frac{\text{Nombre de patients infecté par } S. aureus \text{ durant la période}}{\text{Nombre d'admissions}} \times 100 \text{ admissions}$$

### **3.2.2. Statistiques analytiques**

Etude de la liaison entre les différentes variables :

- **Le test Chi2** d'indépendance a pour but de contrôler l'indépendance statistique de deux ou plusieurs critères de classification quantitatifs. Le test exact de Fisher a été utilisé pour des faibles effectifs  $< 5$ .

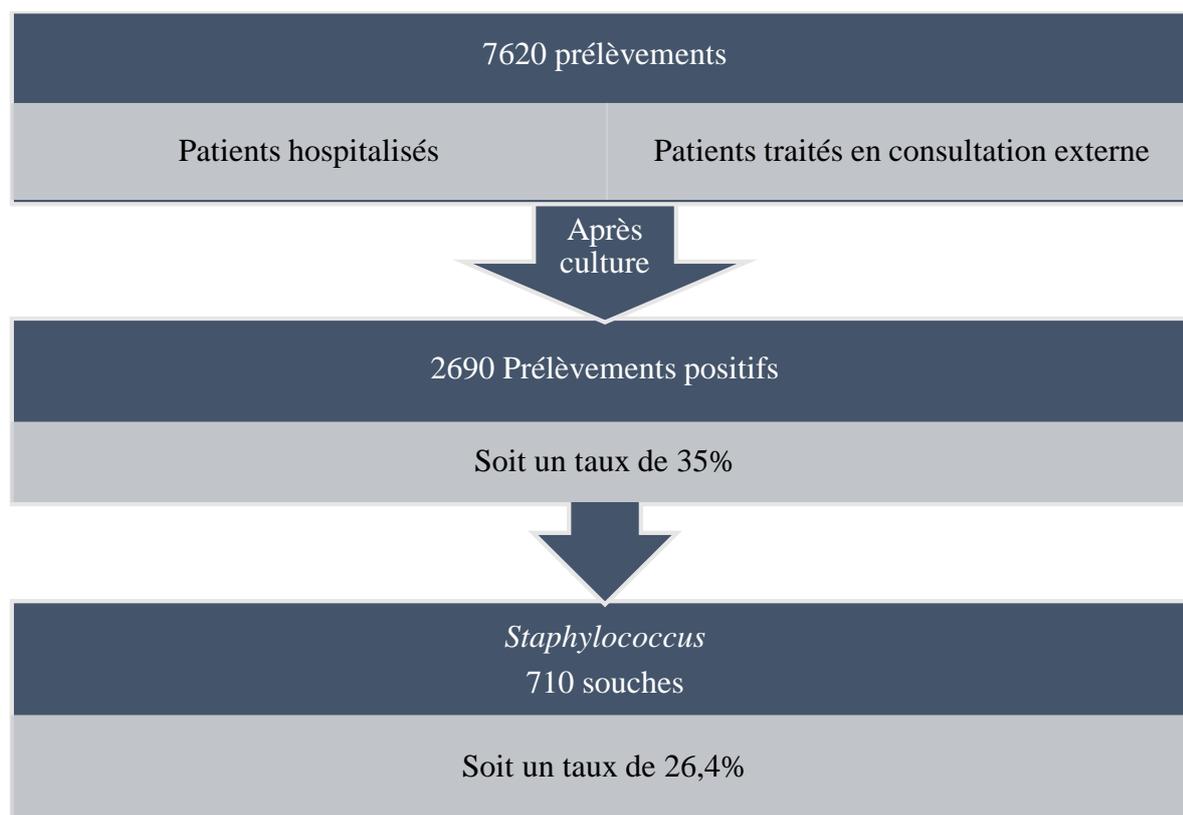
Nous avons employé, comme test statistique, le chi-2 à 1 degré de liberté avec un seuil de significativité reconnu pour  $p < 0,05$

# CHAPITRE 4

# RESULTATS

---

## 1. Présentation des prélèvements



**Figure 13** : Prélèvements analysés au laboratoire de microbiologie du CHU d'Annaba

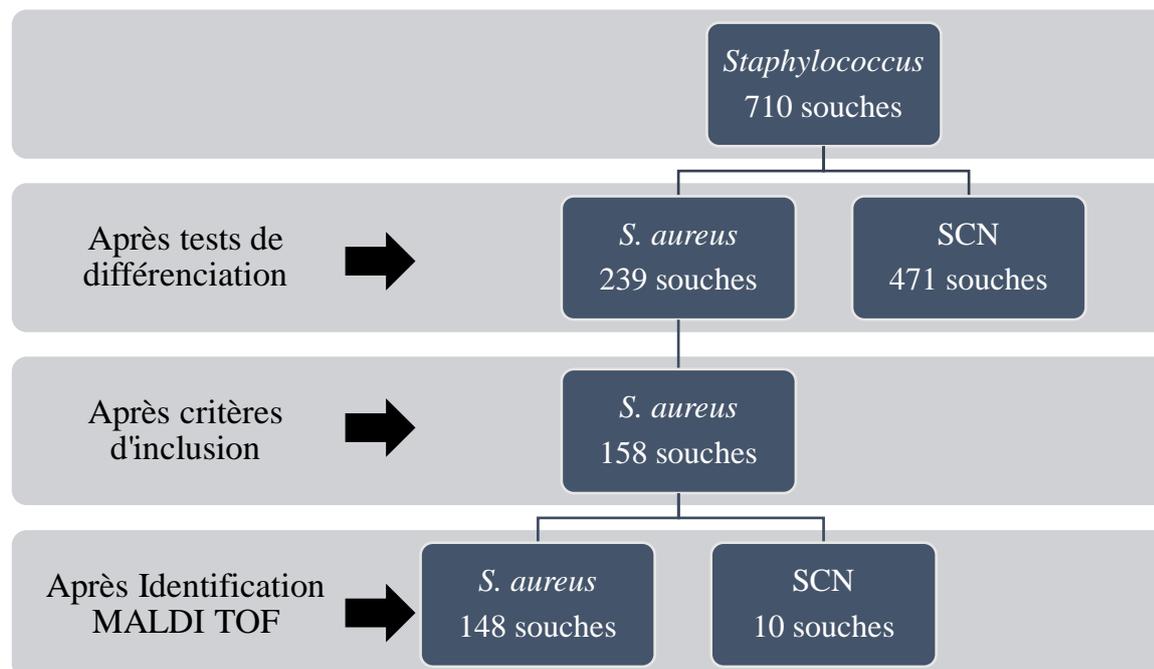
Les prélèvements positifs sont principalement de type pus (n= 1214, 45,1%), ECBU (n= 702, 26,1%), hémocultures (n= 360, 13,4%), et respiratoire (n= 198, 7,4%) (**Tableau 13**).

**Tableau 13** : Répartition des prélèvements positifs selon leur nature.

Types de prélèvements	N	%
Pus	1214	45,1
ECBU	702	26,1
Hémocultures	360	13,4
Voies respiratoires	198	7,4
Ponctions	67	2,5
Catétères intravasculaires	25	0,9
Voies génitales	22	0,8
ORL	42	1,6
DPCA	22	0,8
Autres	38	1,4
<b>Total</b>	<b>2690</b>	<b>100</b>

## 2. *S. aureus* : données épidémiologiques et cliniques

### 2.1. Identification de l'espèce *S. aureus*



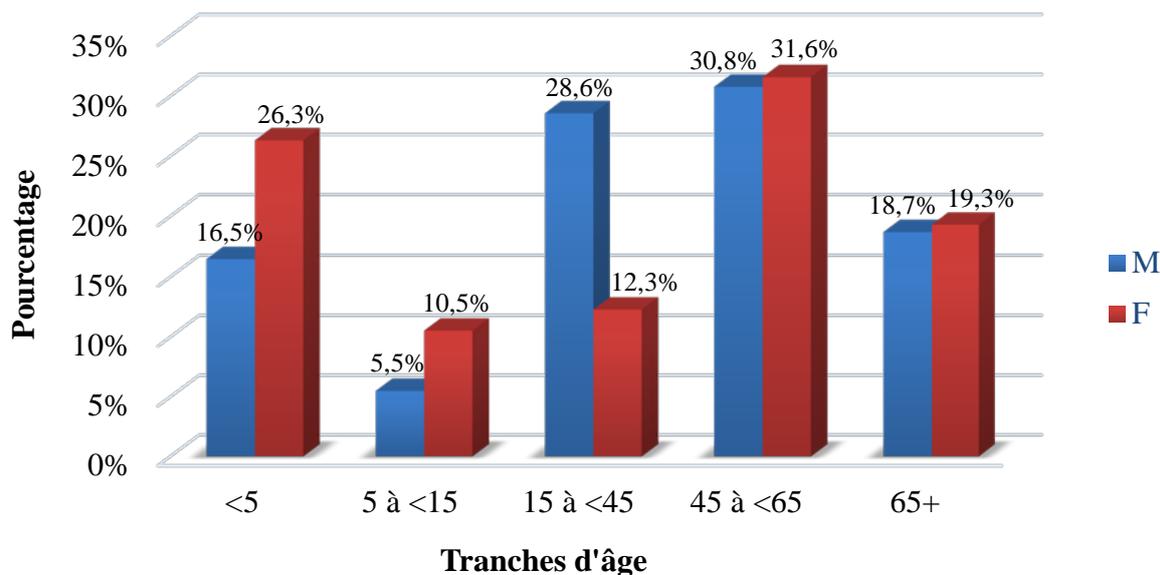
**Figure 14** : Nombre de souches de *S. aureus* incluses dans notre étude.

Au final, 148 souches de *S. aureus* ont été incluses durant la période d'étude

### 2.2. Taux de densité d'incidence des infections à *S. aureus*

Une infection à *S. aureus* a été documentée chez 148 patients hospitalisés sur une période d'étude de 9 mois, ce qui représente un Taux de densité d'incidence (Ti) de 0,59 pour 1000 patients-jours ou 0,19 pour 100 admissions, sachant que le nombre de patients admis à l'hôpital pendant plus de 24 heures durant notre étude est d'environ 75 266 et que le nombre de patients-jours est de 249 800.

### 2.3. Caractéristiques démographiques des patients



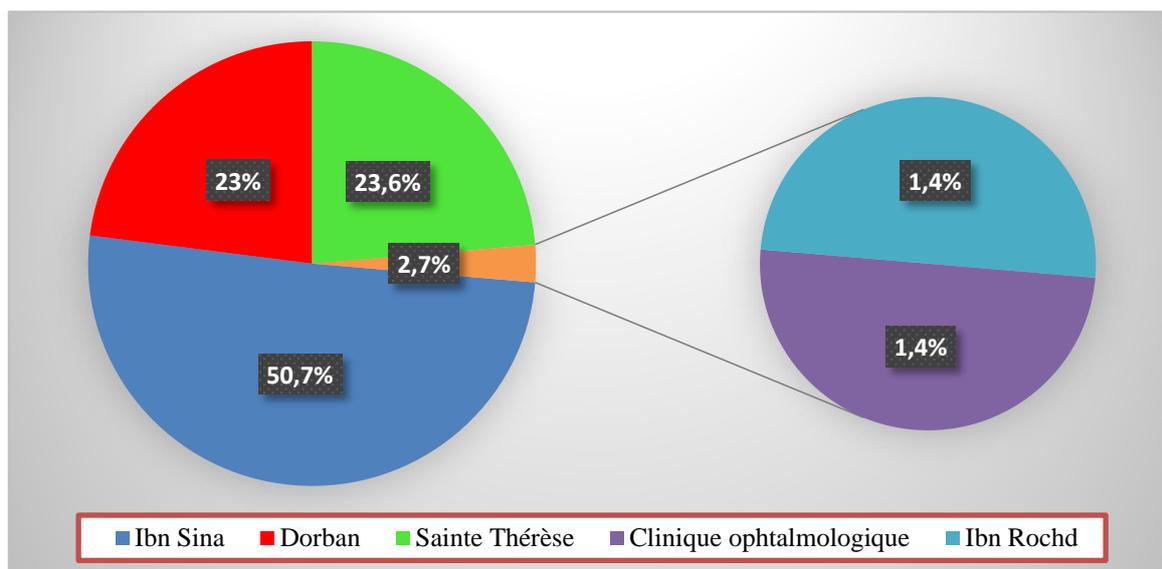
**Figure 15 :** Répartition des patients selon les tranches d'âge et le sexe

Notre population d'étude est composée de 91 (61,5 %) hommes et de 57 (38,5 %) femmes, avec un sexe ratio : 1,59. L'âge moyen des patients était de 38,8 ans, 42,7 ans pour les hommes et 44,5 ans pour les femmes.

Une prédominance du sexe masculin a été observée dans la tranche d'âge 15 à <45 ans, 28,6% *versus* 12,3% ( $p < 0,05$ ). On note cependant une prédominance significative du sexe féminin en comptant les 2 premières tranches d'âge comme catégorie enfant (<15 ans), 36,8% *versus* 22% ( $p < 0,05$ ). Aucune différence significative n'a été observée au sein des catégories adultes (15 à <65 ans) et personnes âgées (65+).

Sur les 148 patients hospitalisés, 41 (27,7%) étaient de la catégorie enfant, 79 (53,4%) adulte, et 28 (18,9%) personnes âgées.

#### 2.4. Répartition des patients selon les hôpitaux



**Figure 16** : Répartition des patients au sein des hôpitaux du CHU d'Annaba

L'hôpital Ibn Sina prédomine avec un taux d'infection à *S. aureus* de 50,7% (n=75), suivi par les hôpitaux Sainte Thérèse et Dorban, avec 23,6% (n=35) et 23% (n=34), respectivement. (Figure 16).

#### 2.5. Répartition des patients selon le type de service

La figure 17, montre que la majorité des prélèvements positifs à *S. aureus* proviennent du service endocrinologie-diabétologie (47,3%, n=70), suivi par la pédiatrie (20,9%, n=31), les maladies infectieuses (10,1%, n=15), ORL (6,8%, n=10), les unités de soins intensifs (4,1%, n=6), la dermatologie (3,4%, n=5), et (7,4%, n=11) pour les services restants.

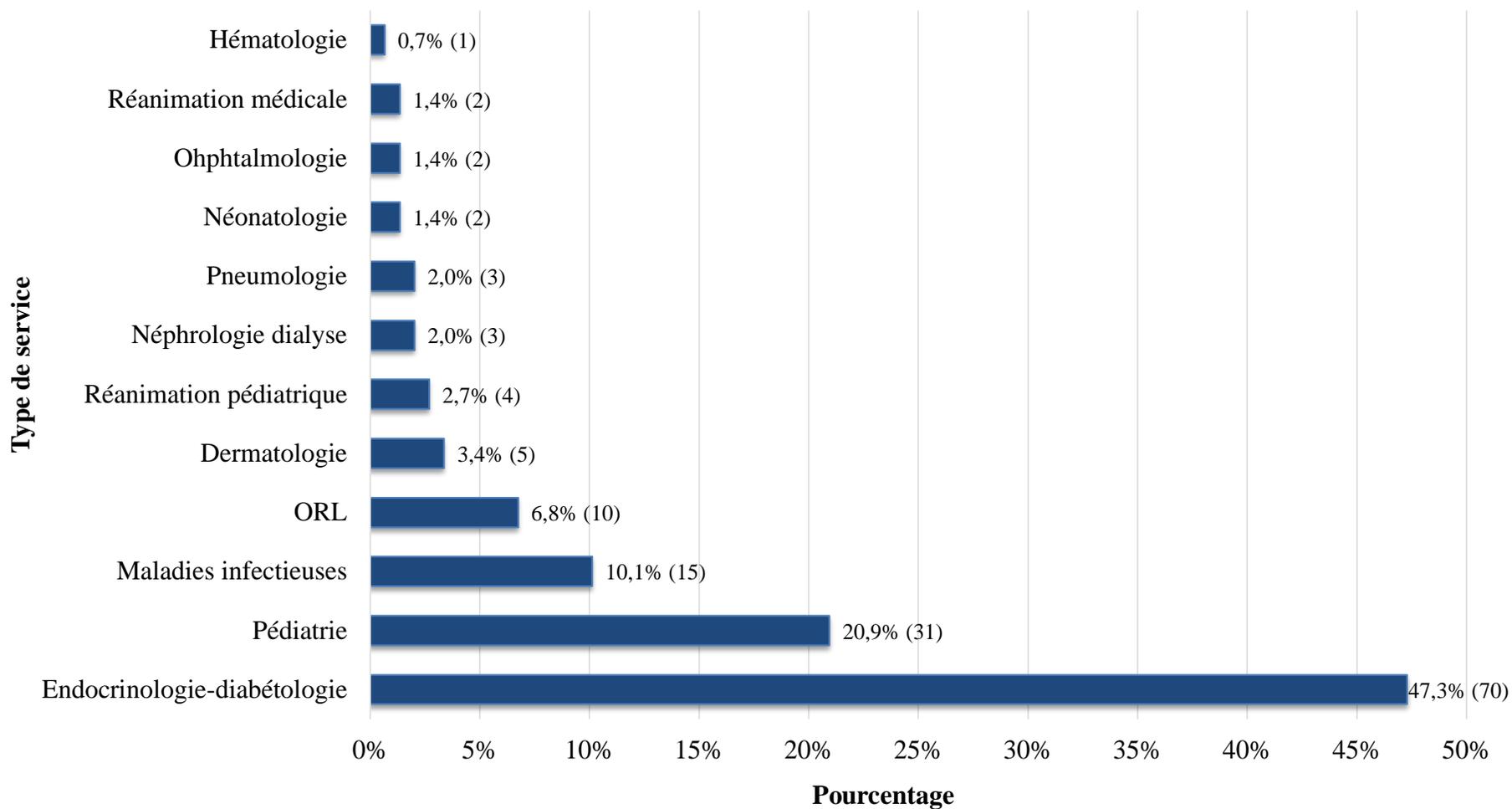
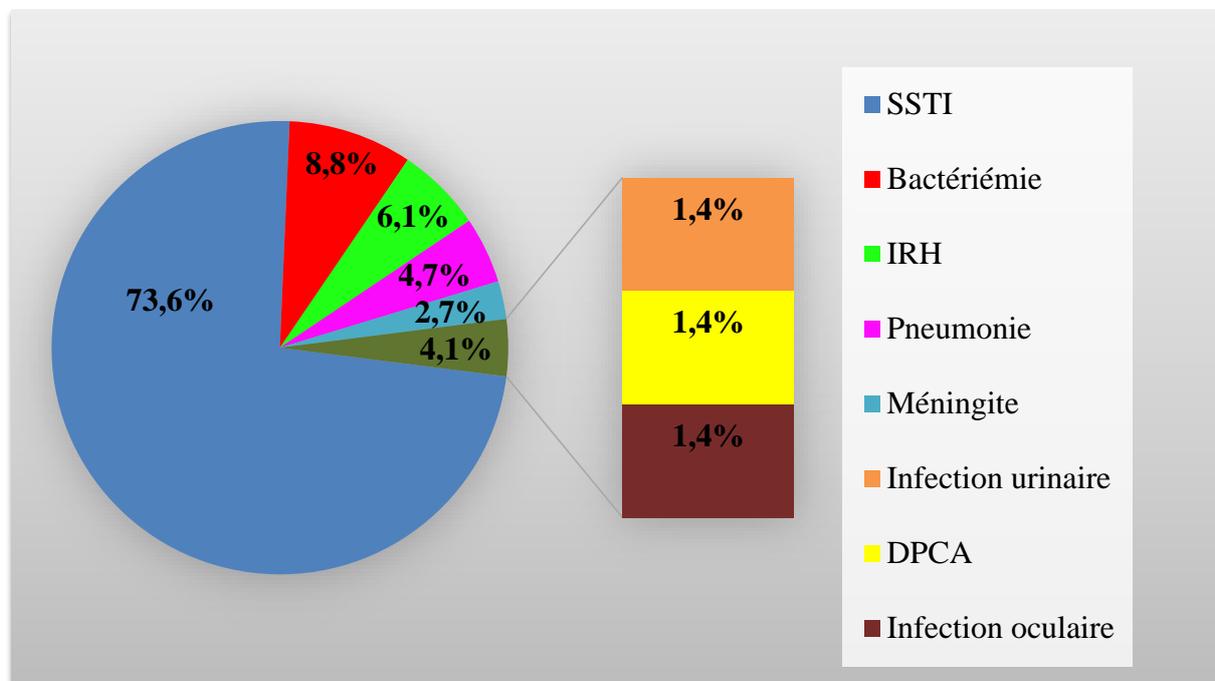


Figure 17 : Répartition des patients en fonction des services

## 2.6. Les différentes infections causées par *S. aureus*



**Figure 18** : Répartition des différentes infections à *S. aureus* isolées chez les patients

Les infections cutanées et des tissus mous représentaient la majorité (n = 109, 73,6%) des infections à *S. aureus*, répartis entre les SSTIs liées au diabète (n = 70, 47,3%) et les lésions cutanées non liées au diabète (n = 39, 26,4%). Les infections restantes étaient des bactériémies (n=13, 8,8%), des infections respiratoires hautes (n=9, 6,1%), des pneumonies (n=7, 4,7%) et autres (n=10, 6,8%). (**Figure 18**).

## 2.7. Répartition des infections à *S. aureus* selon les tranches d'âge

La **figure 19** montre que le taux des SSTIs chez la tranche d'âge 45 à <65 ans (95,6%, n=44) est significativement très élevée que chez les autres tranches d'âge ( $p < 0,001$ ). Aussi, la proportion des SSTIs est significativement élevée chez la tranche d'âge 65+ (78,6%, n=22) que chez <5ans (53,3%, n=16) et de 5 à <15 ans (45,45%, n=5) ( $p < 0,05$ ).

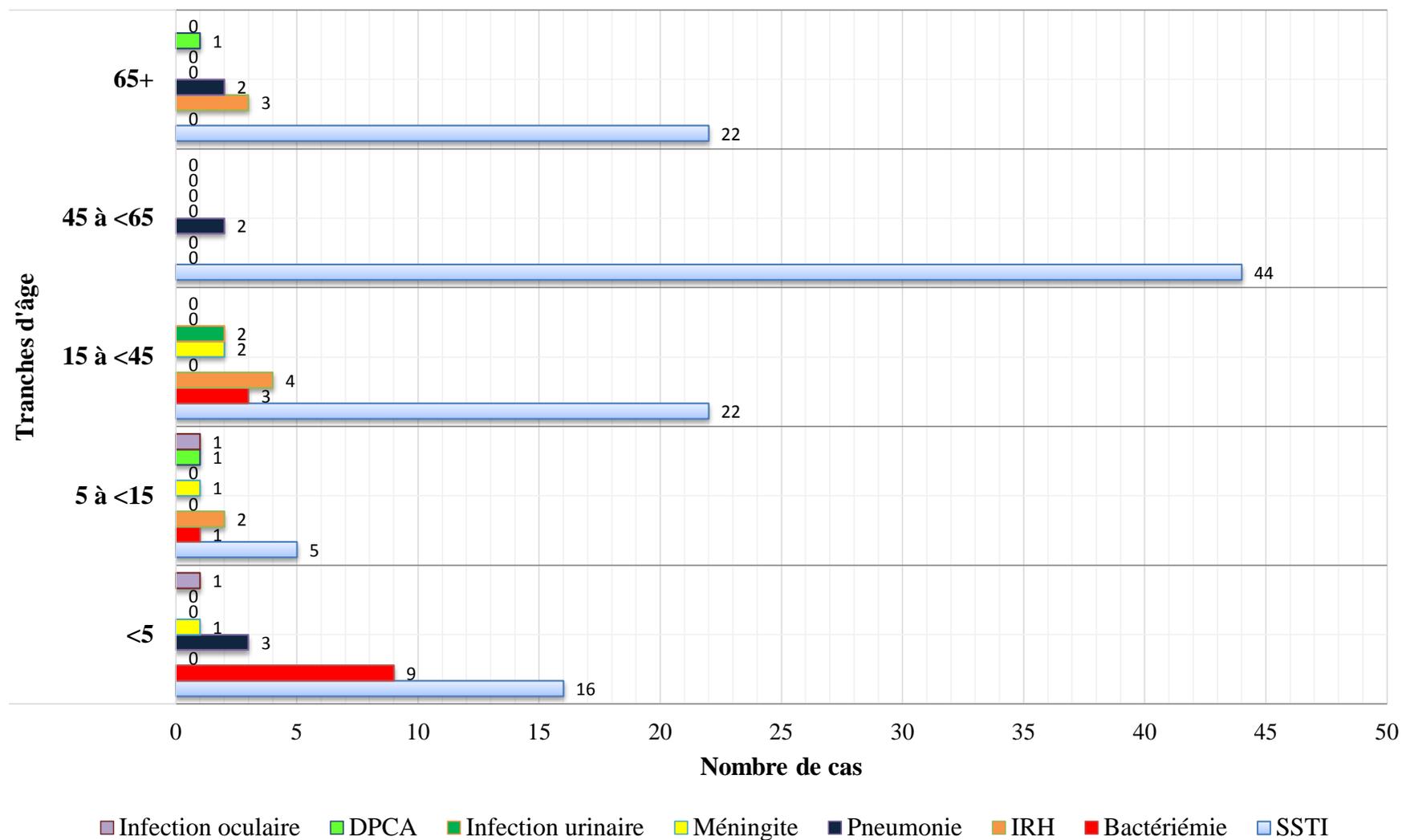


Figure 19 : Répartition des infections à *S. aureus* en fonction des tranches d'âge.

On note aussi que le taux des bactériémies chez les moins 5 ans (30%, n=9) est significativement supérieurs que chez la tranche d'âge (5 à <15 ans) (9%, n=1) et (15 à 50 ans) (8,1%, n=3) ( $p < 0,05$ ).

## 2.8. Répartition des infections à *S. aureus* selon l'origine de l'acquisition

**Tableau 14** : Répartition des infections à *S. aureus* selon l'origine d'acquisition et les services pédiatrie/adultes.

Types d'infections	Infections Hospitalières		Infections communautaires	
	(n = 119)		(n = 29)	
	N	%	N	%
<b>Services adultes</b>				
SSTIs	85	71,4	5	17,2
Pneumonie	3	2,5	1	3,4
IRH	7	5,9	2	6,9
Bactériémie	3	2,5	0	0
Autres	3	2,5	4	13,8
<b>Service pédiatrie</b>				
SSTIs	9	7,6	10	34,5
Pneumonie	1	0,8	2	6,9
Bactériémie	5	4,2	5	17,2
Méningites	3	2,5	0	0
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>29</b>	<b>100</b>

Sur 148 souches de *S. aureus*, 119 (80,4%) étaient nosocomiales et 29 (19,6%) étaient d'origine communautaire. Le **tableau 14** nous indique que le taux des *SSTIs* d'origine nosocomiale est significativement supérieur que celui des *SSTIs* communautaire que ce soit au sein des services adultes ou pédiatrie.

### **3. SARM et SASM : données épidémiologiques et cliniques**

#### **3.1. Fréquence des SARM**

En ce qui concerne les SARM, 94 souches de *S. aureus* se sont avérées résistantes phénotypiquement à la méticilline (ou à l'oxacilline), soit un taux de 63,5%.

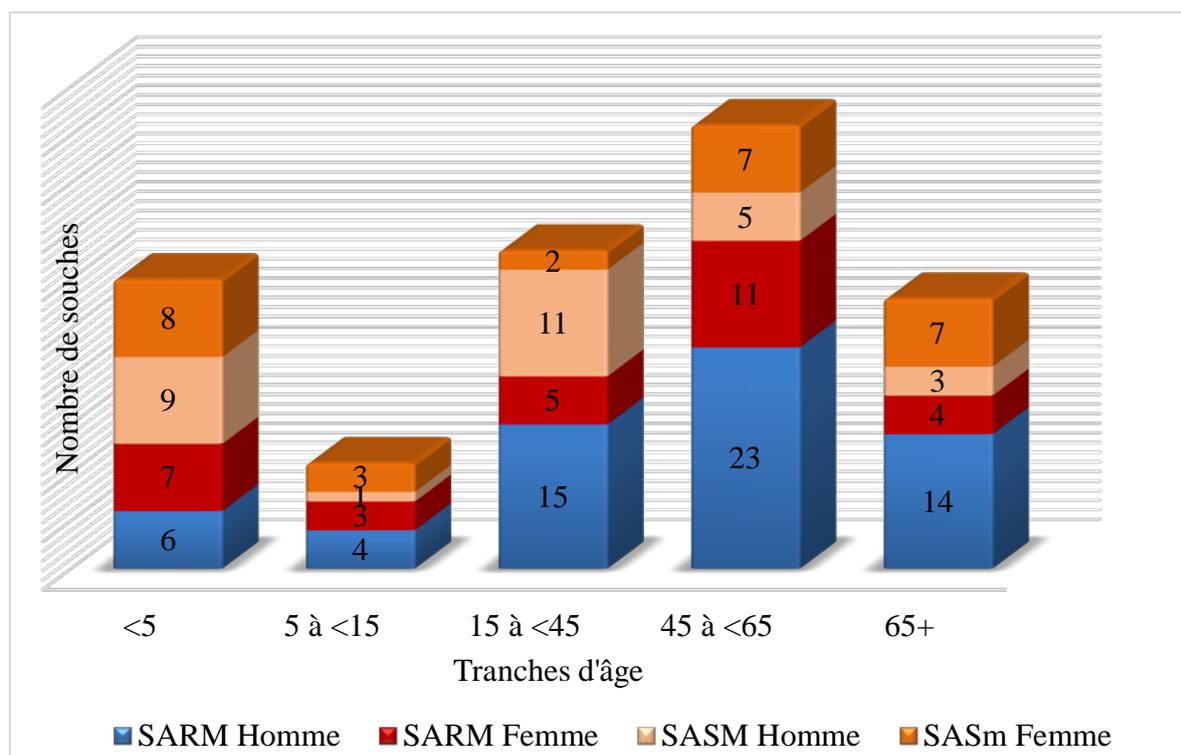
L'utilisation de la RT-PCR au niveau de l'hôpital Bichat Claude-Bernard en France, pour l'identification moléculaire et la détection du gène *mecA*, ont permis de détecter 92 SARM, soit 2 (1,35%) de moins que les méthodes phénotypiques. Les 2 souches se sont avérées sensibles à la méticilline. Ainsi la fréquence des SARM dans la région d'Annaba est de 62,2%.

#### **3.2. Taux de densité d'incidence des infections à SARM**

Un total de 92 infections à SARM a été documenté chez 148 patients hospitalisés sur période d'étude de 9 mois, ce qui représente un Ti de 0,36 pour 1000 patients-jours ou 0,12 pour 100 admissions.

Les 92 infections à SARM étaient hospitalières dans 92,4% (n=85) des cas, et d'origine communautaire dans 7,6% (n=7) des cas. Ce qui donne un Ti des infections à SARM-H de 0,34 pour 1000-patients-jours ou 0,11 pour 100 admissions.

### 3.3. Répartition des SARM et SASM selon le sexe et les tranches d'âge des patients



**Figure 20** : Distribution des souches SARM et/ou SASM selon le sexe et les tranches d'âge des patients.

Sur les 148 souches de *S. aureus*, on a isolé 92 SARM et 56 SASM, soit un pourcentage de 62,2% et 37,8%, respectivement.

En comparant les infections à SARM et SASM en fonction des tranches d'âge, on note :

- Les patients avec des isolats de SARM étaient beaucoup plus adultes (>15 ans) (78,26%, n=72) que les patients avec des isolats de SASM (62,5%, n=35) ( $p<0,05$ ). Alors que les infections à SASM étaient beaucoup plus isolées chez les enfants (37,5%, n=21) que les infections à SARM (21,7%, n=20) ( $p<0,05$ ).
- Une prédominance significative des infections à SASM chez les moins 5 ans ( $p<0,05$ ) avec un taux de 30,4% (n=17) versus 14,1% (n=13) de SARM.

- Une prédominance significative des infections à SARM chez (45 à moins 65 ans) avec un taux de 36,9% (n=34) versus 21,4% (n=12) de SASM ( $p<0,05$ ).

Aucune prédominance des infections à SARM n'a été observée entre les hommes et les femmes. Cependant, le taux des souches SASM chez les hommes est significativement supérieur que celui trouvé chez les femmes de 15 à moins 45 ans (37,9%, n=11 versus 7,4%, n=2) ( $p<0,05$ ).

### **3.4. Répartition des SARM et SASM selon le type de service**

En étudiant la répartition des souches SARM/SASM au sein des différents services, on observe deux différences significatives. La première concerne le taux des SARM très significativement supérieur à celui des SASM au niveau de l'endocrinologie-diabétologie (64,1%, n=59 versus 19,6%, n=11) ( $p<0,001$ ). En outre, le taux des SASM au niveau du service maladies infectieuses est significativement élevé que celui des SARM (19,6%, n=11 versus 4,3%, n=4) ( $p<0,05$ ).

**(Figure 21).**

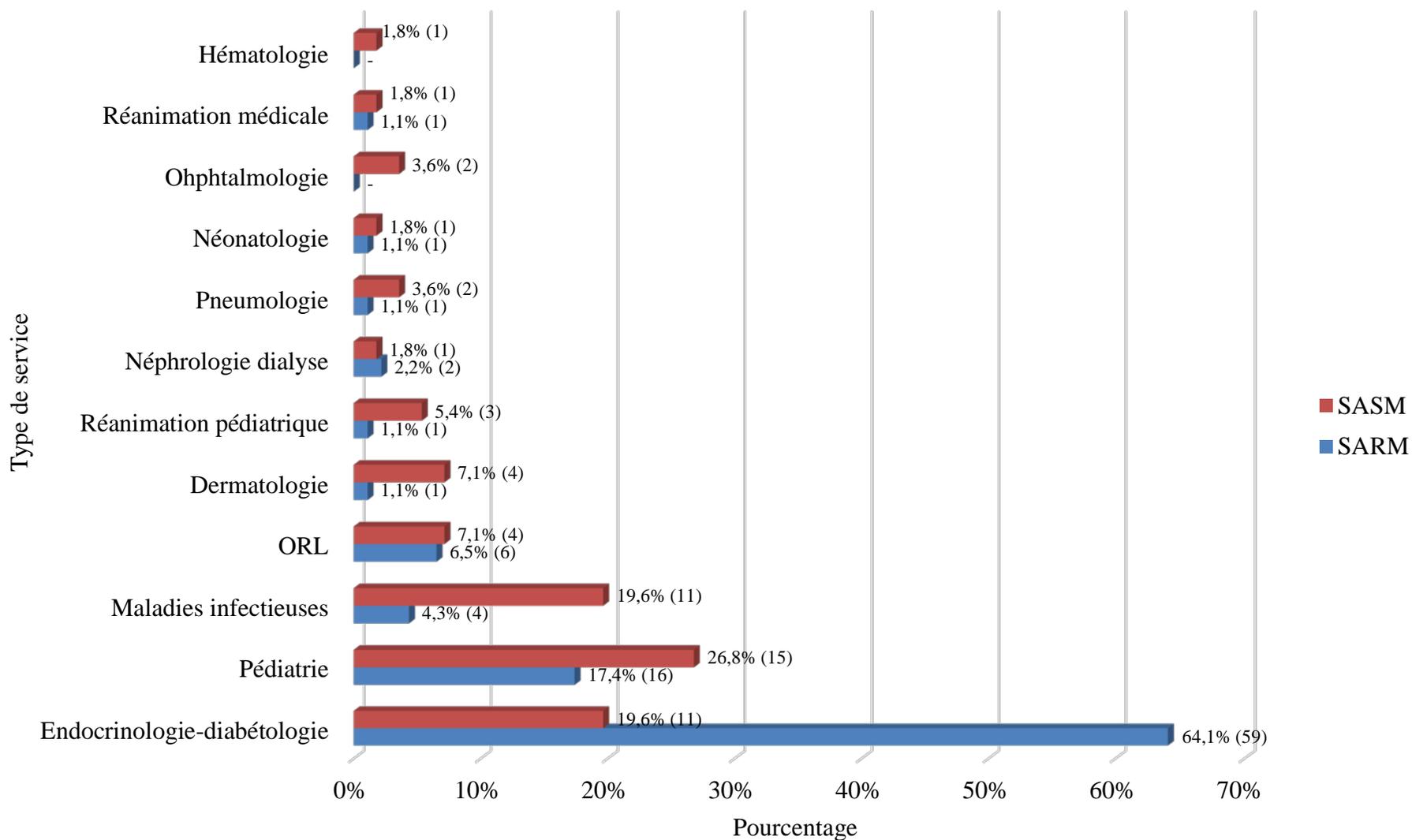


Figure 21 : Distribution des souches SARM et SASM selon le type de service

### **3.5. Répartition des infections à *S. aureus* en fonction des souches SARM et SASM**

En comparant le taux des *SSTIs* causées par les souches SARM par rapport à celles causées par les souches SASM, on remarque une nette prédominance en faveur des souches SARM avec un taux de 84,8% (n=78) versus 55,4% (n=31) ( $p<0,001$ ). Cependant, on note un taux supérieurement significativement des bactériémies causées par les SASM que celles causées par les SARM (17,9%, n=10 versus 3,3% n=3) ( $p<0,05$ ) (**Figure 22**).

On note aussi, un taux significativement élevé des pneumonies causées par les SASM (11%, n=6) que celles causées par les SARM (1,1%, n=1) ( $p<0,05$ ).

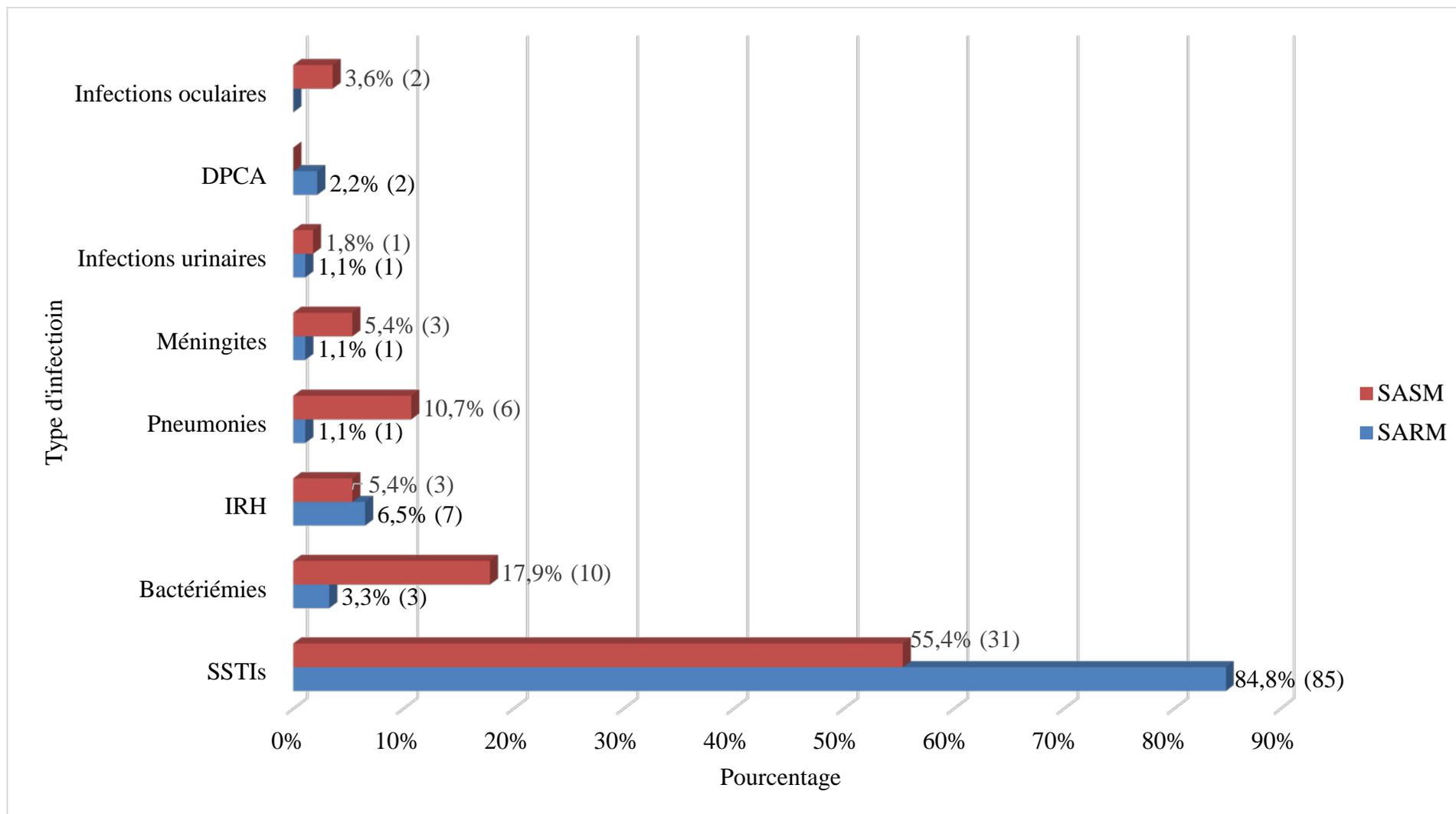
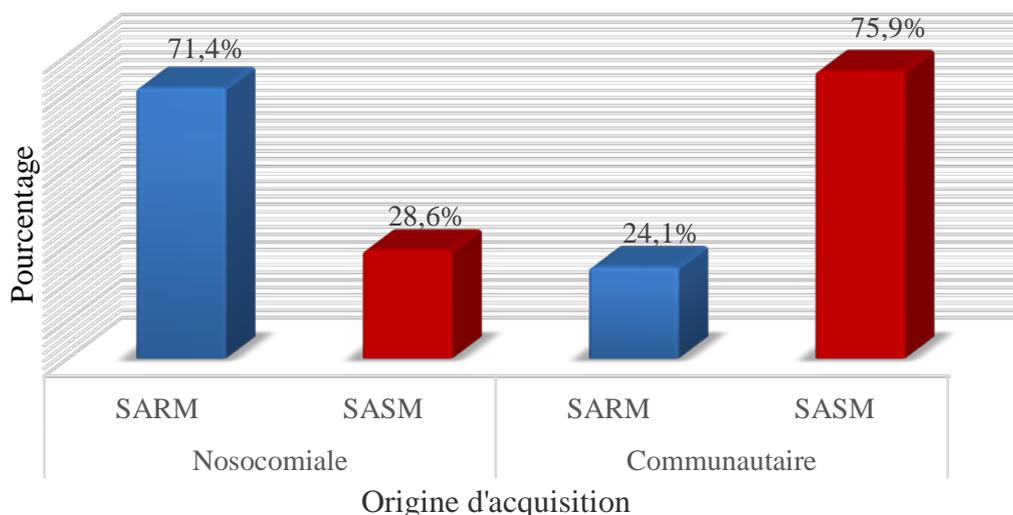


Figure 22 : Pourcentage des infections causées par les SARM et/ou SASM

### 3.6. Répartition des infections à *S. aureus* selon la résistance à la méticilline et l'origine d'acquisition



**Figure 23** : Distribution des infections à SARM et/ou SASM en fonction de leur origine d'acquisition

Sur les 119 infections nosocomiales, 71,4% (n=85) sont causées par les SARM, et 28,6% (n=34) par les SASM. Alors que sur les 29 infections communautaires, 75,9% (n=22) sont causées par les SASM, et 24,1% (n=7) par les SARM (**Figure 23**).

### 3.7. Répartition des infections à SARM selon le type d'infection et l'origine d'acquisition

La **figure 24** nous indique que le taux des SSTIs d'origine nosocomiale causées par les SARM (60,5%, n=72) est significativement supérieur que celui des SSTIs causées par les SASM (18,5%, n=22) ( $p < 0,05$ ).

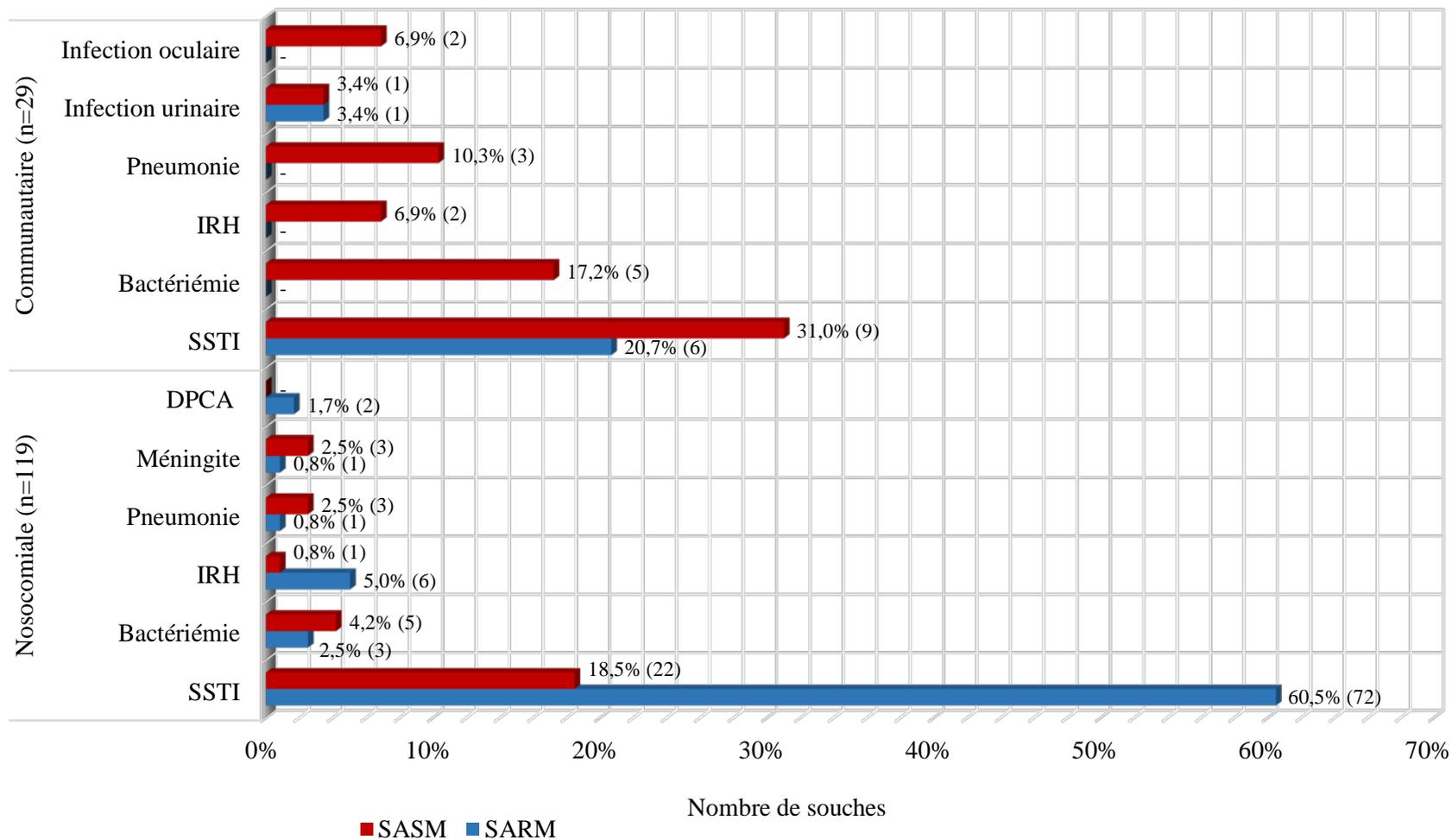


Figure 24 : Distribution des souches SARM et/ou SASM selon le type d'infection et l'origine d'acquisition.

Le **tableau 15** illustre les données épidémiologiques et cliniques des 148 souches de *S. aureus* isolées au niveau des hôpitaux universitaires d'Annaba durant toute la période d'étude.

**Tableau 15** : Les infections associées aux soins et les infections d'acquisition communautaire dues au SARM et au SASM.

Types d'infections	Infections nosocomiales (n = 119)		Infections communautaires (n = 29)	
	SARM	SASM	SARM	SASM
<b>Caractéristiques</b>				
<b>démographiques</b>				
Age médiane (ans)	55	47,5	8	4.5
Sex ratio (M/F)	2.03 (28/57)	1 (17/17)	2.5 (5/2)	1.2 (12/10)
<b>Services adultes</b>				
<i>SSTIs</i>	64 (53.8)	21 (17.6)	0	5 (17.2)
Pneumonie	1 (0.8)	2 (1.6)	0	1 (3.4)
IRH	6 (5.0)	1 (0.8)	0	2 (6.7)
Bactériémie	1 (0.8)	2 (1.6)	0	0
Autres	2 (1.6)	1 (0.8)	1 (3.4)	3 (10.3)
<b>Service pédiatrie</b>				
<i>SSTIs</i>	8 (6.7)	1 (0.8)	6 (20.7)	4 (13.8)
Pneumonie	0	1 (0.8)	0	2 (6.7)
Bactériémie	2 (1.6)	3 (2.4)	0	5 (17.2)
Méningites	1 (0.8)	2 (1.6)	0	0
<b>Total</b>	<b>85 (71.4)</b>	<b>34 (28.6)</b>	<b>7 (24.1)</b>	<b>22 (75.9)</b>

## 4. Résistance des Staphylocoques aux antibiotiques

### 4.1. Résistance des SARM aux antibiotiques

#### 4.1.1. Fréquence de la résistance

Les 92 souches SARM présentaient une résistance associée à d'autres familles d'antibiotiques. Le **tableau 16** montre la fréquence de ces résistances associées. La pristinamycine, la vancomycine, la fosfomycine et la rifampicine ont été constamment actifs et peuvent être de bonnes alternatives thérapeutiques.

La résistance à la méthicilline (oxacilline) des 92 souches du *S. aureus* est croisée avec celle de toutes les bêtalactamines.

La totalité des souches SARM était résistante à la kanamycine. La résistance à la tobramycine et à la gentamicine était de l'ordre de 82,6% et de 80,4%, respectivement. Néanmoins, aucune des souches SARM-C n'était résistante à ces 2 derniers.

Pour les macrolides, et les lincosamides, 64,1% des SARM était résistant à l'érythromycine et à la clindamycine, 53 (57,6%) souches étaient du phénotype  $MLS_B$  inducible.

Nous notons, que 77 souches (83,7%) sont résistantes à l'ofloxacine. Par ailleurs, aucune des souches SARM-C n'était résistante aux fluoroquinolones.

Pour les autres antibiotiques, les taux étaient de 82,6% pour la tétracycline, 58,7% pour le cotrimoxazole, et 57,6% à l'acide fusidique. Nous notons, qu'aucune des souches SARM-C n'est résistante à l'acide fusidique ou le cotrimoxazole.

Une seule souche était résistante à la fosfomycine et avait une origine hospitalière.

**Tableau 16** : Fréquence de la résistance des SARM aux antibiotiques.

Types d'antibiotiques	SARM-H (n=85)		SARM-C (n=7)		p	Total (n=92)	
	R*		R			R	
	N	%	N	%		N	%
Penicilline	85	100	7	100	>0,10	92	100
Kanamycine	84	98,8	7	100	>0,10	92	100
Tobramycine	76	89,4	0	0	<0,001	76	82,6
Gentamicine	74	87,1	0	0	<0,001	74	80,4
Erythromycine	57	67,1	2	28,6	0,09	59	64,1
Clindamycine	57	67,1	2	28,6	0,09	59	64,1
Pristinamycine	0	0	0	0		0	0
Vancomycine	0	0	0	0		0	0
Teicoplanine	0	0	0	0		0	0
Ofloxacine	77	90,6	0	0	<0,001	77	83,7
Tétracycline	74	87,1	2	28,6	0,001	76	82,6
Fusidic acide	53	62,4	0	0	<0,001	53	57,6
Cotrimoxazol	54	63,5	0	0	<0,001	54	58,7
Fosfomycine	1	1,2	0	0		1	1,1
Rifampicine	0	0	0	0		0	0

R= R+I

4.1.2. Profil de résistance des SARM

**Tableau 17** : Phénotypes de résistance des souches SARM aux antibiotiques.

Profils de résistance des souches SARM	SARM-H	SARM-C	Total
	(n= 85)	(n=7)	(n=92)
KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT, FA	43	0	43
KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT	10	0	10
KAN, TET, GEN, ERY, LIN, OFX, SXT, FA	1	0	1
KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, FA	1	0	1
KAN, TOB, ERY, LIN, OFX, TET, FA	1	0	1
KAN, TOB, GEN, OFX, TET	15	0	15
KAN, TOB, GEN, OFX, FA	4	0	4
KAN, ERY, LIN, TET, FA	1	0	1
KAN, TOB, OFX, TET	1	0	1
KAN, TET, FA	2	0	2
KAN, ERY, LIN	0	2	2
KAN, TET	0	2	2
OFX, TET	1	0	1
KAN	4	3	7
FOS	1	0	1

KAN, kanamycine ; TOB, tobramycine ; GEN, gentamicine ; ERY, erythromycine ; LIN, lincomycine ; OFX, ofloxacin ; TET, tétracycline ; SXT, cotrimoxazole ; FA, acide fusidique ; FOS, fosfomycine.

Nous remarquons une prédominance des profils de résistance KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT, FA ; KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT, et KAN, TOB, GEN, OFX, TET chez les souches nosocomiales, ces profils semblent endémiques dans le service d'endocrinologie. Une étude génétique a été faite afin de déterminer la clonalité des souches SARM isolées.

## **4.2. Résistance des SASM aux antibiotiques**

### **4.2.1. Fréquence de la résistance**

Malgré la sensibilité à l'oxacilline, nous notons que le SASM peut être résistant à d'autres antibiotiques (**Tableau 18**). Ainsi, 49 (87,5%) souches étaient résistantes à la pénicilline, 16 souches (28,6%) étaient résistantes à kanamicine, 7 (12,5%) à la tobramycine, 6 (10,7%) à la gentamicine, 10 (17,9%) à l'ofloxacine, 5 (14,3%) à l'érythromycine, 6 (16,1%) à la clindamycine, 15 (30,4%) à l'acide fusidique, 14 (26,8%) à la tétracycline, et uniquement une souche résistante au cotrimoxazole. Les autres antibiotiques ont gardé leur activité.

Par ailleurs, on observe un taux de résistance significativement bas des SASM-C aux antibiotiques suivants : kanamycine, tobramycine, gentamicine, ofloxacine, tétracycline, et acide fusidique ( $p < 0,001$ ).

En outre, l'étude comparative de l'antibiorésistance entre les SARM et les SASM (**Figure 25**) a montré des taux de résistance significativement supérieur à presque tous les antibiotiques mis à part la pénicilline ( $p < 0,001$ ).

**Tableau 18** Fréquence de la résistance des SASM aux antibiotiques.

Types d'antibiotiques	SASM-H (n=34)		SASM-C (n=22)		P	Total (n=56)	
	R		R			R	
	N	%	N	%		N	%
Penicilline	32	94,1	17	77,3	0,09	49	87,5
Kanamycine	16	47,1	0	0	<0,001	16	28,6
Tobramycine	7	20,6	0	0	<0,001	7	12,5
Gentamicine	6	17,6	0	0	<0,001	6	10,7
Erythromycine	5	14,7	3	13,6	>0,10	8	14,3
Clindamycine	6	17,6	3	13,6	>0,10	9	16,1
Pristinamycine	0	0	0	0		0	0
Vancomycine	0	0	0	0		0	0
Teicoplanine	0	0	0	0		0	0
Ofloxacine	10	29,4	0	0	<0,001	10	17,9
Tétracycline	14	41,2	1	4,5	<0,001	15	26,8
Fusidic acide	15	44,1	2	9,1	<0,001	17	30,4
Cotrimoxazol	1	2,9	0	0	>0,10	1	1,8
Fosfomycine	0	0	0	0		0	0
Rifampicine	0	0	0	0		0	0

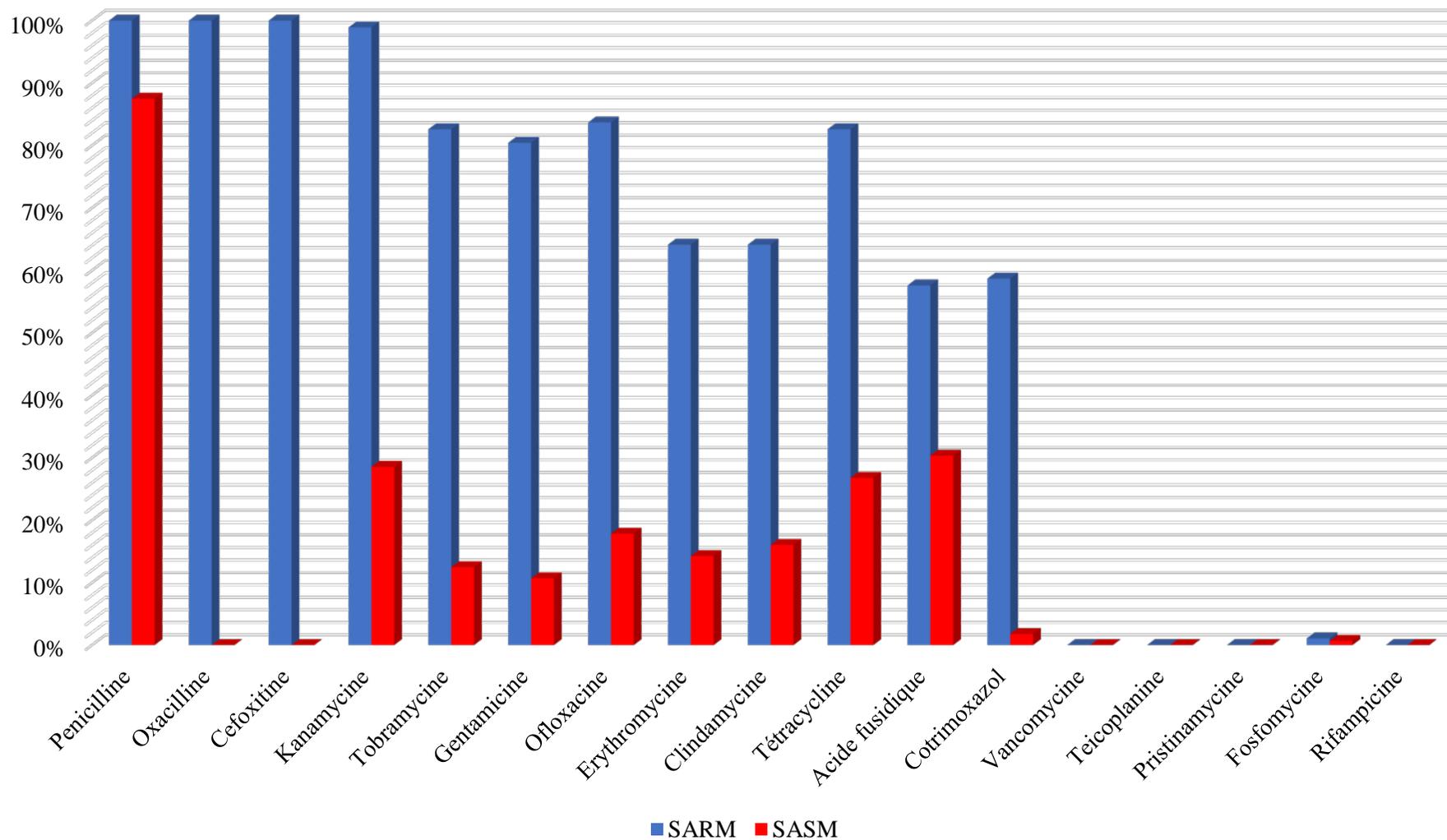


Figure 25 : Comparaison de la résistance aux antibiotiques entre SASM et SARM

## 5. Caractéristiques moléculaire des SARM

### 5.1. Typage du gène *spa*

#### 5.1.1. Séquences du gène *spa*

##### 5.1.1.1. *spa* t037

Séquence	Répétition
GAGGAAGACAACAACAAGCCTGGC	15
AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT	12
AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGT	16
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGC	02
AAAGAAGATGGCAACAAACCTGGT	25
AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT	17
AAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGT	24

##### 5.1.1.2. *spa* t932

Séquence	Répétition
AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT	12
AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGT	16
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGC	02
AAAGAAGATGGCAACAAACCTGGT	25
AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT	17
AAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGT	24

##### 5.1.1.3. *spa* t044

Séquence	Répétition
GAGGAAGACAACAACAAACCTGGT	07
AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGC	23
AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT	12
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT	34
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT	34
AAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGC	33
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT	34

**5.1.1.4. spa t376**

Séquence	Répétition
GAGGAAGACAACAACAAACCTGGT	07
AAAGAAGACGGCAACAACCTGGC	23
AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT	12
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT	34
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT	34
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT	34
AAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGC	33
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT	34

**5.1.1.5. spa 1247**

Séquence	Répétition
GAGGAAGACAACAACAAACCTGGT	07
AAAGAAGACGGCAACAACCTGGC	23
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT	34
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT	34
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT	34
AAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGC	33
AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT	34

**5.1.1.6. spa t005**

Séquence	Répétition
GAGGAAGACAACAAAAACCTGGT	26
AAAGAAGACGGCAACAACCTGGC	23
AAAGAAGACAACAACAACCTGGT	13
AAAGAAGACGGCAACAACCTGGC	23
AAAGAAGATGGCAACAACCTGGC	31
AAAGAAGACAACAAAAGCCTGGC	5
AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT	17
AAAGAAGATGGCAACAACCTGGT	25
AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT	17
AAAGAAGATGGCAACAACCTGGT	25
AAAGAAGACGGCAACAACCTGGT	16
AAAGAAGATGGTAACAACCTGGC	28

**5.1.2. Répartition des souches SARM en fonction du type *spa***

Le **tableau 19** ci-dessous reprend les résultats de l'analyse par PCR des répétitions présentes dans la séquence codant pour la protéine A de *S. aureus* dans lequel sont également introduits les résultats de PCR des fragments de gènes codant pour une nucléase et l'ARN 16S (*rrs*) de *S. aureus*.

**Tableau 19** : Types *spa* des souches SARM

Typage du gène <i>spa</i>		Gènes			SARM	
Profil <i>spa</i>	Type de <i>spa</i>	<i>mecA</i>	<i>nuc</i>	ARNr 16S	N	%
15-12-16-02-25-17-24	t037	+	+	+	40	43,5
12-16-02-25-17-24	t932	+	+	+	32	34,8
7-23-12-34-34-33-34	t044	+	+	+	17	18,5
7-23-12-34-34-34-33-34	t376	+	+	+	1	1,1
7-23-34-34-33-34	t1247	+	+	+	1	1,1
26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28	t005	+	+	+	1	1,1

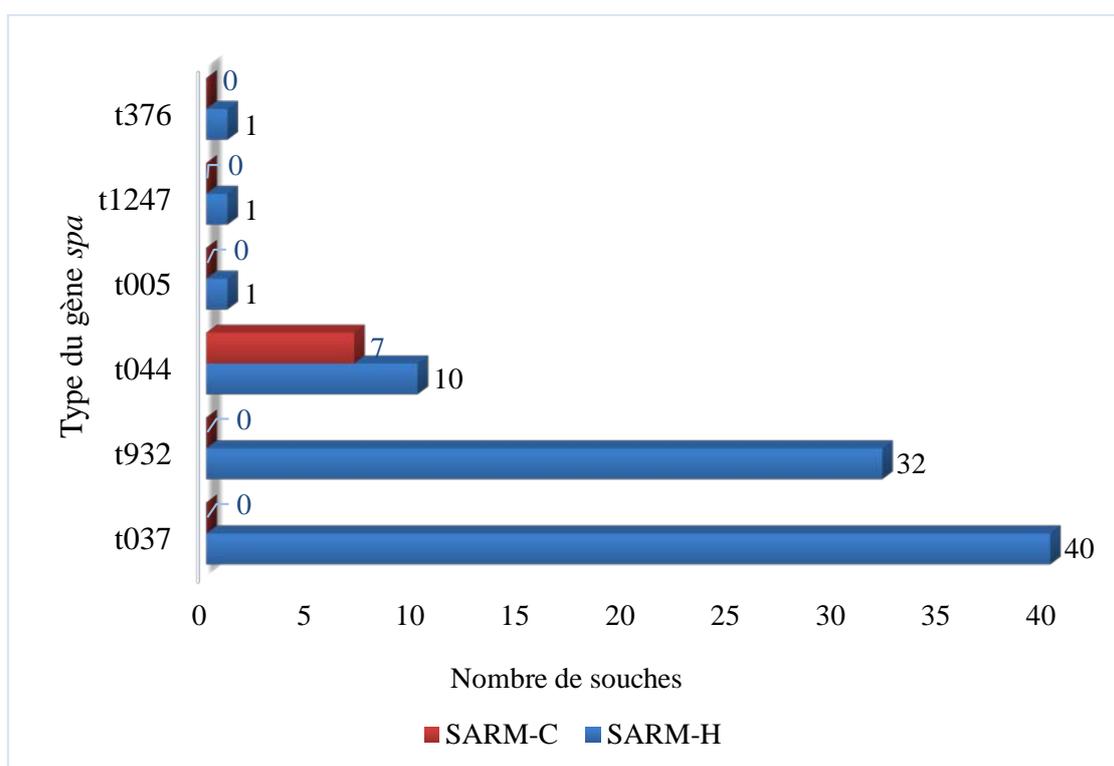
Les résultats présentés dans ce tableau montrent 6 types *spa* différents, dont 3 génotypes majeurs, (t037, t932 and t044) représentant 96.73% (n=89) des isolats.

La seule différence entre les types de *spa* t037 et t932 qui est la délétion de la répétition 15 au sein du ce dernier, fait de t932 un sous-type du *spa type* t037. Il résulte de ce qui précède un taux de 78,26% (n=72) du *spa type* t037.

Deux souches appartenait aux sous-types t1247 et t376, qui diffèrent du *spa type* majeur t044 par la délétion de la répétition 12 et l'addition de la répétition 34, respectivement. Il en résulte *spa t044* avec un taux de 20,65% (n=19).

Le gène ARNr 16S a été amplifié chez toutes les souches confirmant ainsi l'appartenance de ces dernières au genre *Staphylococcus*. Toutes les souches sont positives pour *nuc* confirmant leur appartenance à l'espèce *S. aureus*.

### 5.1.3. Répartition des SARM-H et/ou SARM-C selon le *spa type*



**Figure 26** : Distribution des SARM-H et/ou SARM-C selon le *spa type*

D'après le graphique ci-dessus, on note que sur les 85 SARM-H, 40,78% (n=40) appartenait au *spa t037*, 37,64% (n=32) au *spa t932* (lié au *spa type t037*), 14,63% (n=12) (incluant les sous-types t1247, t376) au *spa t044*, et une souche au *spa t005*.

La totalité des SARM-C (n=7) appartenait au *spa t044*.

#### 5.1.4. Profil de résistance aux antibiotiques des différents spa types

**Tableau 20** : Profils de résistance des différents spa types isolés.

<i>Spa type</i>	Profils de résistance aux non $\beta$ -lactamines	Nombre de souches
t037	KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT, FA	25
	KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT	4
	KAN, TOB, ERY, LIN, OFX, TET, FA	1
	KAN, TOB, GEN, OFX, TET	8
	KAN, TOB, OFX, TET	1
	OFX, TET	1
t932	KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT, FA	18
	KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT	6
	KAN, TET, GEN, ERY, LIN, OFX, SXT, FA	1
	KAN, TOB, GEN, OFX, TET, C	1
	KAN, TOB, GEN, OFX, TET	6
t044	KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, FA	1
	KAN, ERY, LIN, TET, FA	1
	KAN, TOB, GEN, OFX, FA	4
	KAN, TET, FA	2
	KAN, ERY, LIN	2
	KAN, TET	2
	KAN	7
t005	FOS	1

Le **tableau 20** nous indique que sur les 72 souches appartenant au *spa* t037 (incluant *spa* t932), 43 (59,7%) étaient résistantes à plus de 9 non- $\beta$ -lactamines et 69 (95,8%) avaient le phénotype KTG.

D'après le même tableau, on remarque que le taux de résistance aux fluoroquinolones des souches *spa* t044 (26,3%, n=5), est significativement plus faible ( $p<0,001$ ) que celui des souches *spa type* t037 et t932 qui sont toutes résistantes aux fluoroquinolones.

On observe aussi un taux de phénotypes KTG (26,3%, n=5) des souches *spa* t044 significativement plus faible ( $p<0,001$ ) que celui des souches *spa* t037 (incluant *spa* t932) (95,8%, n=69).

Le seul SARM appartenant au *spa* t005 était l'unique souche de *S. aureus* résistante à la fosfomycine. Étonnement, cette souche hospitalière était sensible aux autres non  $\beta$ -lactamines.

5.2. Typage SCCmec

5.2.1. Résultats de la M-PCR 1 (complexe ccr)

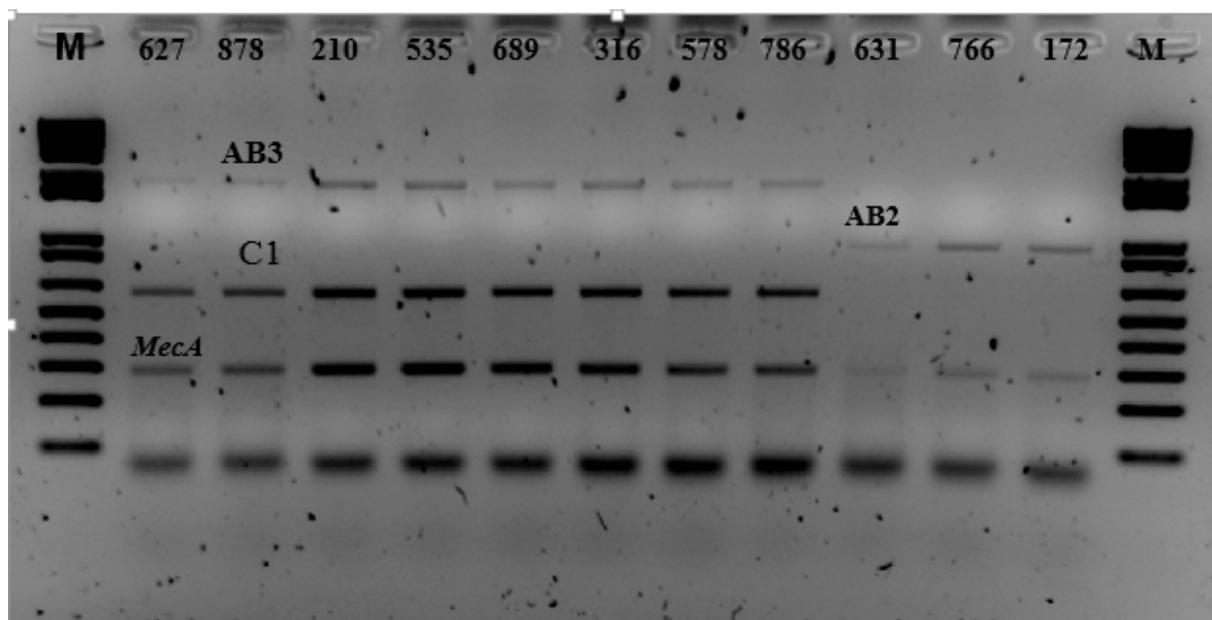


Figure 27 : Résultats de l'amplification du locus *ccr* de la *SCCmec* de quelques souches SARM.

5.2.2. Résultats de la M-PCR 2 (complexe mec)

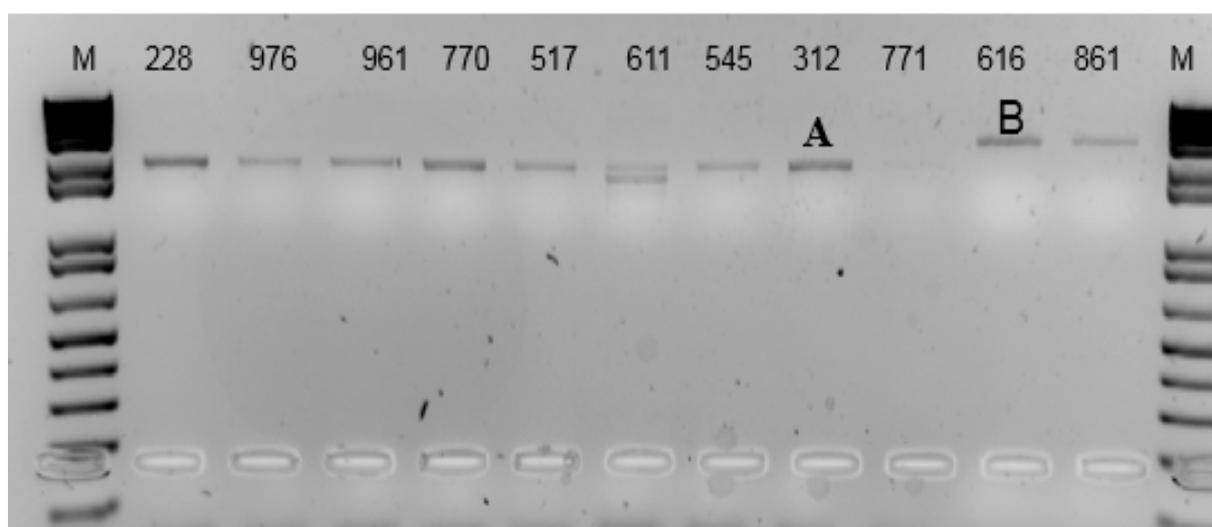
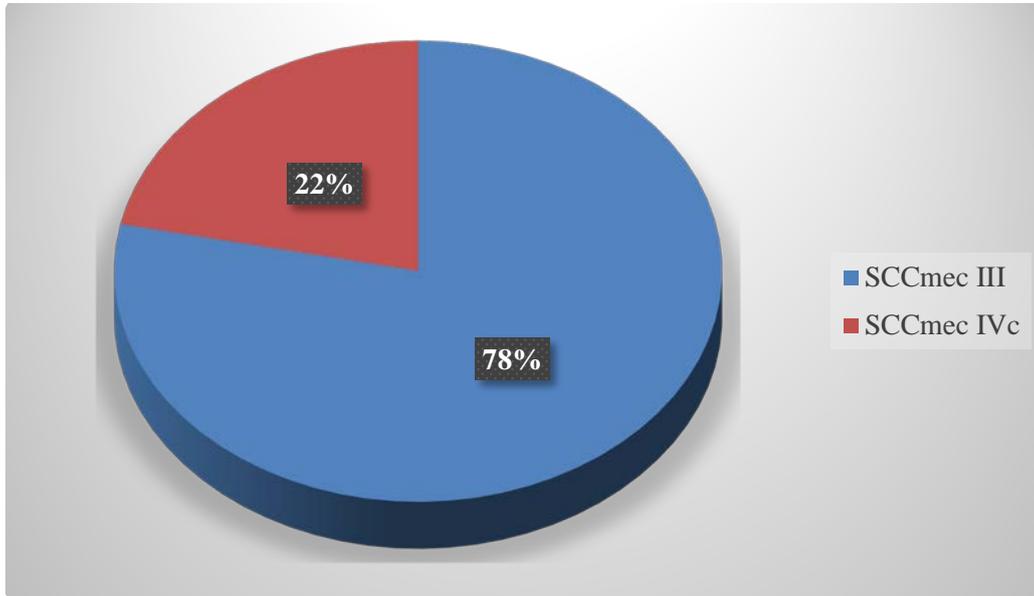


Figure 28 : Résultats de l'amplification du locus *mecA* de la *SCCmec* de quelques souches SARM

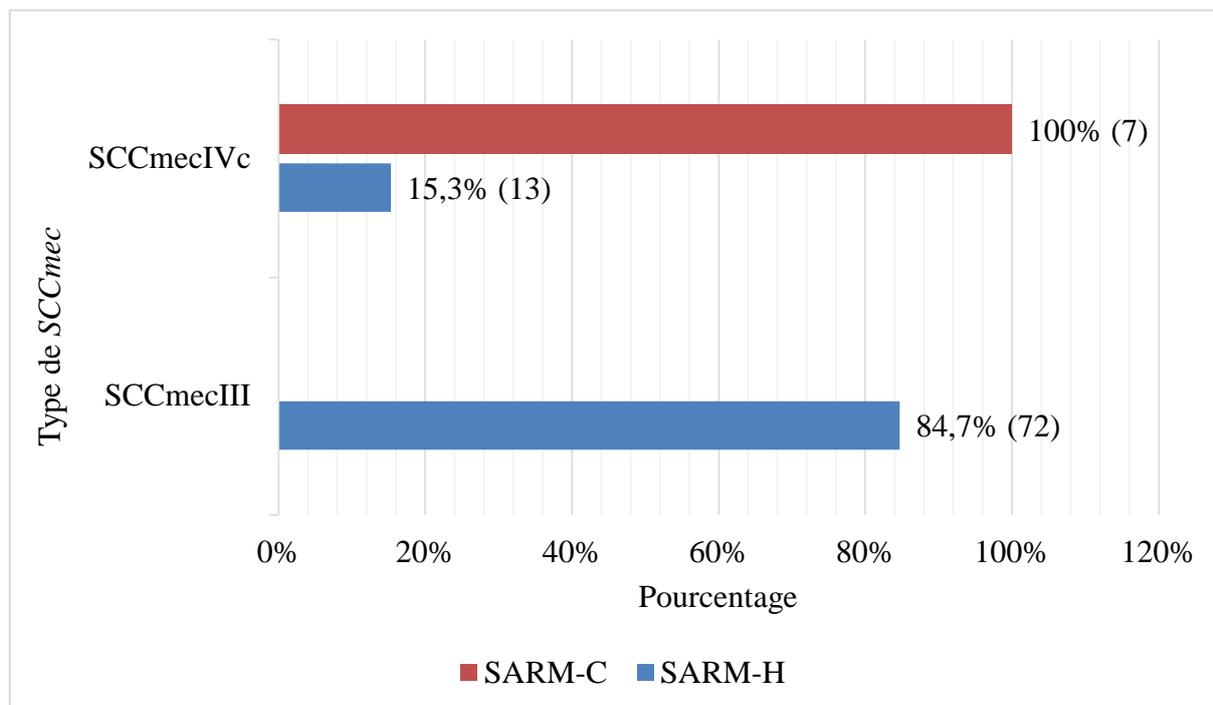
### 5.2.3. Répartition des souches SARM en fonction de la cassette chromosomique staphylococcique



**Figure 29** : Répartition des SARM en selon le type SCCmec

La **figure 29** montre que 78% (n=72) des SARM appartient au type SCCmec III, alors que 22% (n=20) appartient au type SCCmec IVc.

5.2.4. Répartition des SARM-H et/ou SARM-C selon le type SCCmec

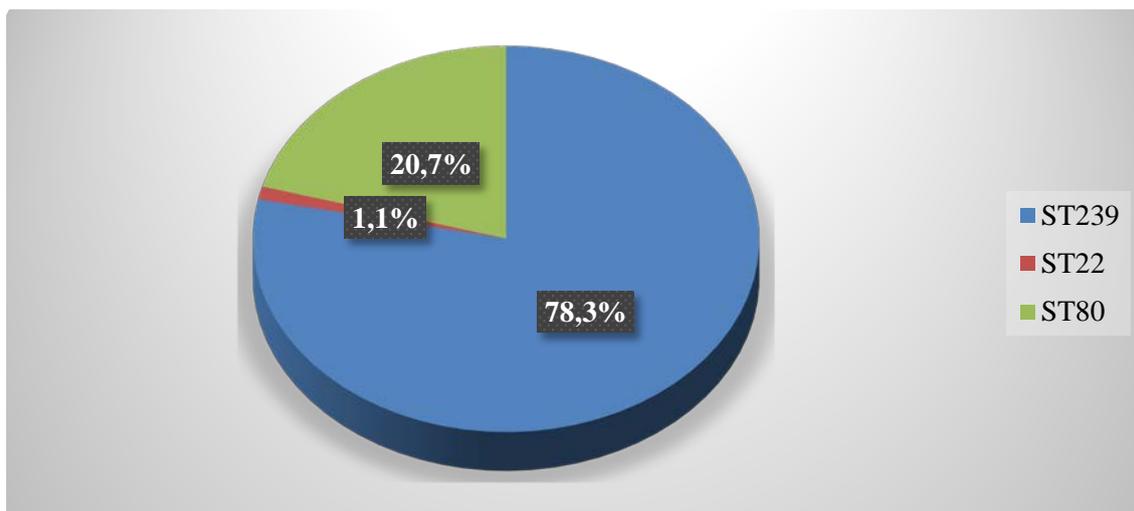


**Figure 30** : Distribution des SARM-H et/ou SARM-C selon le type SCCmec

Comme l'indique le graphique en barres ci-dessus, 72 (84,7%) des SARM-H étaient du type SCCmec III, alors que 13 (15,3%) étaient du type SCCmec IVc.

Tous les SARM-C (n=7) avaient des SCCmec type IVc.

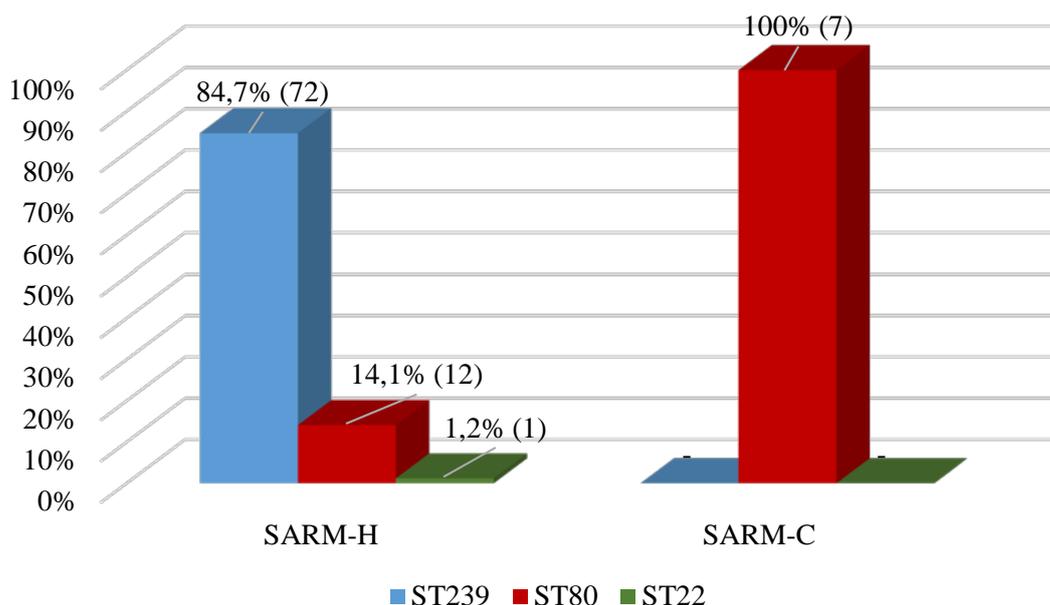
### 5.3. MLST et identification des différents clones isolés



**Figure 31** : Pourcentage des STs isolés.

Trois *sequence type* (ST) ont été détectés. Un premier ST majeur incluant 72 souches de SARM (78,3%), était ST239 et appartenait au complexe clonal CC8. Parmi les 72 souches de ST239, 40 (55,6%) étaient du *spa* t037, tandis que 32 (44,4%) étaient *spa* t932 (lié au *spa* t037). Toutes les souches de ce ST portées le SCC*mec* III et étaient d'origine hospitalière. Toutes ces caractéristiques moléculaires sont celles d'un principal clone hospitalier : le clone Brésilien.

Le deuxième ST incluant 19 souches de SARM (20,65%) avait les caractéristiques suivantes : ST80, *spa* t044, et porté le SCC*mec* IVc. Sur les 19 souches, 12 (13%) étaient des SARM-H et 7 (7,6%) étaient des SARM-C. Ces caractéristiques moléculaires sont ceux du fameux clone Européen ST80.



**Figure 32 :** Distribution des SARM-H et/ou SARM-C selon le Sequence Type

Le dernier clone appartenant au complexe clonal CC22 était ST22. Ce clone connu sous le nom : Lyon et représentant qu'un seul isolat sporadique portait la cassette *SCCmec* de type IV, et un *spa* t005.

#### **5.4. La toxine de Panton-Valentine**

##### **5.4.1. Fréquence de la PVL**

Sur les 92 infections à SARM isolées notre étude, 19 sont secondaires à un SARM possédant le gène de la toxine de Panton et Valentine, soit 20,65%.

##### **5.4.2. Distribution de la PVL selon les clones isolés**

L'analyse génétique révèle donc que les 19 souches proviennent d'un seul et unique clone : le clone Européen ST80-SARM-*SCCmec* IV. Les deux autres clones étaient PVL négative.

##### **5.4.3. Caractéristiques des infections à SARM PVL+**

Au total 19 infection à SARM étaient PVL+ :

Les infections se répartissent ainsi :

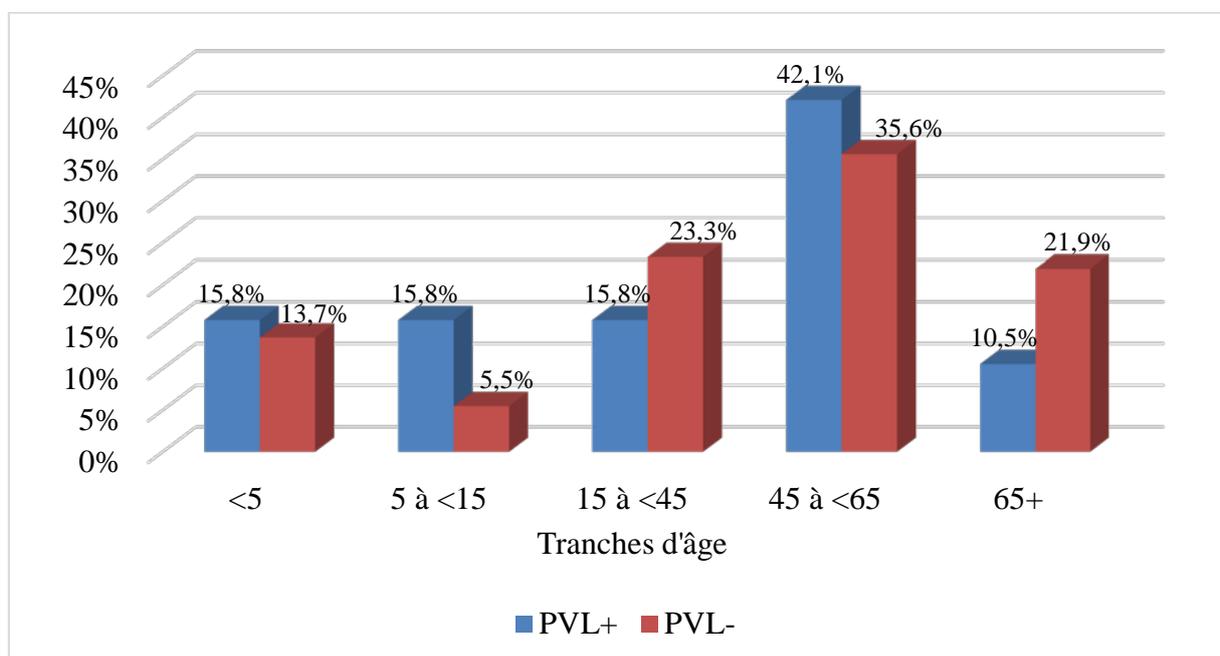
- 18/78 SSTIs soit 23%
- 1/2 infections urinaires soit 50%

La moyenne d'âge était de 39,7 ans, la médiane à 45,5 ans avec des extrêmes de 3 mois à 71 ans ; 6 patients avaient moins de 15 ans soit 31,6%.

L'acquisition était liée aux soins chez 12 patients soit 63,15%.

L'acquisition était communautaire dans 7 cas soit 36,85%.

#### 5.4.4. Comparaison entre infections à SARM PVL+ et SARM PVL-



**Figure 33** : Répartition des patients PVL+ et PVL- selon les tranches d'âge

Cette étude a recueilli 19 cas d'infections à SARM PVL+ et 73 cas d'infections à SARM PVL-

La différence entre l'âge médian des patients atteints d'une infection à SARM PVL+ et celui des patients atteints d'une infection à SARM PVL- : n'est pas significative 47,5 ans versus 50 ans ( $p > 0,10$ ).

Le taux des infections à SARM PVL+ dans la tranche d'âge 5 à <15 ans est significativement élevé que les infections à SARM PVL-, 15,8% versus 5,5% ( $p < 0,05$ ).

**5.4.5. Résistance aux antibiotiques des SARM PVL+ versus SARM PVL-**

**Tableau 21 :** Comparaison de la résistance aux antibiotiques entre les Souches SARM PVL+ et SARM PVL

Type d'antibiotiques	PVL-		PVL+		p
	N	%	N	%	
Kanamycine	72	98,6	19	100	0,6
Tobramycine	71	97,3	5	26,3	<0,001
Gentamicine	69	94,5	5	26,3	<0,001
Ofloxacine	72	98,6	5	26,3	<0,001
Erythromycine	55	75,3	4	21,1	<0,001
Clindamycine	55	75,3	4	21,1	<0,001
Acide fusidique	54	74,0	8	42	0,008
Cotrimoxazole	54	74,0	0	0	<0,001
Tétracycline	71	97,3	5	26,3	
Vancomycine	0	0	0	0	
Teicoplanine	0	0	0	0	
Pristinamycine	0	0	0	0	
Fosfomycine	1	1,4	0	0	
Rifampicine	0	0	0	0	

Selon le **Tableau 21**, on observe une résistance presque quasi-totale à la kanamycine des souches SARM PVL+ et PVL-. Le tableau nous indique aussi que les taux de résistance des antibiotiques suivants : tobramycine, gentamicine, ofloxacine, erythromycine, clindamycine, acide fusidique et cotrimoxazole sont significativement supérieur chez les SARM PVL- que les SARM PVL- ( $p < 0,001$ ).

#### 5.4.6. Résistance des SARM PVL+ selon l'origine d'acquisition

**Tableau 22** : profils de résistance des souches ST80 selon l'origine d'acquisition.

	Origine d'acquisition	
	Hospitalier	Communautaire
<b>Profil de résistance</b>	KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, FA (1)	KAN, ERY, LIN (2)
	KAN, ERY, LIN, TET, FA (1)	KAN, TET (2)
	KAN, TOB, GEN, OFX, FA (4)	KAN (3)
	KAN, TET, FA (2)	
	KAN (4)	

Les souches ST80 SARM PVL+ hospitalières ont exprimé plusieurs résistances aux non-β-lactamines que les isolats communautaires, avec 8 sur les 12 isolats (66,6%) hospitaliers présentant des profils de multi-résistance (y compris 5 isolats (41,6%) montrant à la fois une résistance à la gentamicine et aux fluoroquinolones) (**Tableau 22**).

Aucune des 7 souches SARM-C PVL+ n'était résistante aux fluoroquinolone, alors que 5 (41.6%) des 12 isolats de SARM-H PVL+ ont montré une résistance aux fluoroquinolones.

**Tableau 23** : Profil de résistance aux antibiotiques des 5 souches SARM PVL+ résistantes aux fluoroquinolones (FQR) et des 14 souches SARM PVL+ sensibles aux fluoroquinolones (FQR).

Résistance aux antibiotiques	Souches FQS		Souches FQR		P
	N	%	N	%	
Kanamycine	14	100	0	0	<0,001
Kanamycine-Tobramycine	0	0	0	0	
Kanamycine-Tobramycine-Gentamicine	0	0	5	100	<0,001
Tétracycline	5	35,7	0	0	0,12
Erythromycine	3	21,4	1	20	1
Cotrimoxazole	0	0	0	0	
Rifampicine	0	0	0	0	
Fosfomycine	0	0	0	0	
Acide fusidique	2	14,3	5	100	<0,001

Par ailleurs, les souches SARM PVL+ FQR étaient toutes résistantes à l'acide fusidique et avait un profil de résistance aux aminosides spécifique : elles avaient le phénotype KTG, alors que les souches SARM PVL+ FQS montrées une résistance à la kanamycine et une sensibilité à la tobramycine et à la gentamicine, et étaient plus résistantes à la tétracycline que les souches résistantes aux fluoroquinolones (**Tableau 23**).

Le **tableau 24** illustre toutes les caractéristiques moléculaires et phénotypiques des 92 isolats de SARM inclus dans notre étude

**Tableau 24** : Caractéristiques moléculaires et phénotypiques des isolats de SARM.

Isolats de SARM	ST (CC)	spa type	SCCmec type	PVL	N (%)	Profil de résistance aux non β-lactamines (N)
<b>SARM-H</b> (n = 85)	ST239 (CC8)	t037	III	-	40 (47.1)	KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT, FA (25) KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT (4) KAN, TOB, GEN, OFX, TET (8) KAN, TOB, ERY, LIN, OFX, TET, FA (1) KAN, TOB, OFX, TET (1) OFX, TET (1)
	ST239 (CC8)	t932	III	-	32 (37.6)	KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT, FA (18) KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, TET, SXT (6) KAN, TET, GEN, ERY, LIN, OFX, SXT, FA (1) KAN, TOB, GEN, OFX, TET (6) KAN, TOB, GEN, OFX, TET, C (1)
	ST22 (CC22)	t005	IVc	-	1 (1.2)	FOS (1)
	ST80 (CC80)	t044	IVc	+	12 (14.1)	KAN, TOB, GEN, ERY, LIN, OFX, FA (1) KAN, ERY, LIN, TET, FA (1) KAN, TOB, GEN, OFX, FA (4) KAN, TET, FA (2) KAN (4)
<b>SARM-C</b> (n = 7)	ST80 (CC80)	t044	IVc	+	7 (100)	KAN, ERY, LIN (2) KAN, TET (2) KAN (3)

# CHAPITRE 5

# DISCUSSION

---

Les infections nosocomiales, désormais partie d'un ensemble plus vaste appelé infections associées aux soins, constituent un enjeu majeur de santé publique dans le monde entier à cause de leur fréquence élevée et de la résistance bactérienne souvent très importante, celle-ci aggrave de façon significative la morbidité et la mortalité hospitalières [229]. Elles sont souvent favorisées par la situation médicale du patient, et par les actes invasifs nécessaires au traitement de la pathologie.

Ce qui est particulièrement préoccupant dans les établissements de soins, sont les infections à SARM, vu que ce dernier est généralement multi-résistant. En effet, selon le Réseau Européen de Surveillance de la Résistance Antimicrobienne, le SARM est la cause la plus importante d'IAS résistantes aux antibiotiques à travers le monde [230].

Depuis sa découverte en 1961 au Royaume-Uni [50], le SARM-H a été un pathogène nosocomial sérieux et courant dans les milieux hospitaliers, ainsi que les établissements de soins à long terme dans le monde entier [231]. Cependant, depuis le milieu des années 1990, il y a eu une explosion du nombre d'infections à SARM en raison d'un nouveau SARM très virulent qui affecte les patients sans contact préalable avec les établissements de santé, appelé SARM communautaire [150].

## **1. La situation épidémiologique**

A notre connaissance, cette étude est la première étude multicentrique prospective à décrire le profil moléculaire des SARM-H dans les hôpitaux algériens, ainsi que le premier rapport sur le taux d'incidence d'infections à SARM en Algérie et même dans les pays d'Afrique du Nord. A notre grande surprise, ce taux était relativement faible, de l'ordre de 0,36 pour 1000 patients-jours. Cependant, nous avons constaté une forte proportion de SARM, soit 62,2% des isolats. Le taux le plus élevé a été observé au sein de l'hôpital Ibn Sina et plus particulièrement au niveau du service diabète-endocrinologie. Le deuxième point intéressant de cette étude, est

l'émergence du clone européen SARM ST80 (un clone communautaire) à l'hôpital causant 14,1% des infections à SARM-H.

### **1.1. Incidence et fréquence du SARM en milieu hospitalier**

Il y a étonnamment peu d'études publiées qui présentent des données sur le taux de densité d'incidence des infections (Ti) à *S. aureus* de tout type chez les patients hospitalisés pour comparer notre résultat. La plupart des études épidémiologiques de *S. aureus* ont été porté exclusivement sur les isolats de SARM, et/ou dans des populations particulières [232].

Parmi les rares études, on trouve celle menée en Nouvelle-Zélande par Williamson et *al.*, 2013, où ils ont rapporté un Ti de 412 cas/100 000 habitants par année (2001 à 2011) [233], ou celle menée par Jacobssen et *al.*, 2007, qui rapportent dans une enquête performée en Suède entre 2003 et 2005, un Ti de 33,9 cas /100 000 habitants par année dont 83% des cas était des bactériémies [234]. Cependant, en raison de la différence de dénominateur utilisé pour calculer le taux d'incidence, notre résultat ne peut être comparé à ces études-là.

Contrairement à ce qui était attendu, notre étude a montré un Ti très faible des infections à SARM chez les patients hospitalisés. Ce taux est inférieur à ceux rapportés en Europe et dans le monde, tels que, l'Ecosse avec 7,5 pour 1000 patients-jours en 2009, la Malaisie en 2007, avec 1,39 pour 1000 patients-jours, l'Egypte en 2010, avec 8,3 pour 1000 patients-jours ; ainsi que la France et les Etats-Unis en 2010, avec 0,4 pour 1000 patients-jours, et 0,62 pour 1000 patients-jours, respectivement [235–239]. Néanmoins, ce chiffre reste supérieur à ceux rapportés par certains pays, tels que, la Hongrie entre 2006 et 2010 avec un Ti de 0,06 pour 1000 patients-jours, l'Espagne entre 2001 et 2008 avec un Ti moyen de 0,07 pour 1000 patients-jours, l'Allemagne en 2009 avec 0,08 pour patients-jours, l'Australie en 2013 avec 0,095 pour 1000 patients-jours, le Taiwan en 2009 avec 0,233 pour 1000 patients-jours, et le Canada avec 0,309 pour 1000 patients-jours en 2010 et 2,79 en 2011 [240–245].

Dire qu'il y a de véritables différences dans l'incidence est difficile à établir ; les différences dans la fréquence de l'échantillonnage microbiologique, la disponibilité des services microbiologiques, la structure des systèmes de surveillance et la conformité des rapports peuvent également jouer un rôle important.

Bien que notre Ti des infections à SARM chez les patients hospitalisés soit relativement faible, nous avons noté des proportions de SARM atteignant un niveau alarmant, avec (85/119) soit un taux de 71,42% pour les souches SARM-H, et (7/29) soit un taux de 24,10 % pour les souches SARM-C. En Algérie, la proportion des isolats de SARM chez *S. aureus* a connu une augmentation alarmante au cours des deux dernières décennies, passant de 4,8% en 1996-1997 à 52% en 2007-2009 [7,53]. Dans la présente étude, la fréquence des isolats de SARM était plus élevée que le résultat obtenu précédemment à Tlemcen (Nord-Ouest de l'Algérie) [7], et significativement supérieur par rapport à ce qu'a rapporté le Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, soit un taux de 32.67% en 2012 [246]; ainsi que les autres pays Maghrébins, comme le Maroc et la Tunisie, avec respectivement 18,5%, et 40,5% [247,248].

Dans les pays en développement et notamment en Afrique, la fréquence du SARM se trouve à environ 35,7% , les taux les plus élevés sont observés en Egypte (60 %) et au Sénégal (72 %), alors qu'on trouve les taux les plus bas à Madagascar (5,8%) et au Nigeria (16 %) [249–252].

Les données récentes sur la charge des infections à SARM-H à l'échelle européenne sont disponibles à partir de deux systèmes de surveillance appuyés par l'ECDC (*EARSS*, *HELICS*). En 2012, la charge annuelle des infections à SARM dans les Etats membres de l'Union européenne (UE), l'Islande et la Norvège a été estimée à 37 495 cas avec un pourcentage moyen de 17,8%, sachant qu'elle été estimée à 171 200 cas en 2007 [253,254].

Selon la même source, les taux de SARM en Europe montrent des différences importantes, allant de la plus faible proportion de SARM (0,7% de l'ensemble de *S. aureus*) rapportée en Suède en 2012 (le seul pays à avoir un pourcentage inférieur à 1%), à la proportion la plus élevée (53,9%) rapportée en Roumanie en 2012 [253]. Cinq pays ont rapporté un pourcentage de 1-5%, dont le Danemark (1,3%), la Norvège (1,3%), les Pays-Bas (1,3%), l'Islande (1,7%) et la Finlande (2,2%). Trois pays ont rapporté un pourcentage de 5-10%, dont l'Autriche et l'Estonie avec un pourcentage de 7,7%, 14 pays avec un pourcentage de 10-25%, dont la Bulgarie et l'Espagne avec 19,8% et 24,2%, respectivement. Cinq pays ont un taux de SARM entre 25-50%, et deux pays supérieur à 50%, à savoir le Portugal et la Roumanie [253].

## **1.2. Contrôle du SARM**

Selon les *CDC*, la proportion d'infections nosocomiales à staphylocoques attribués au SARM a augmenté de façon constante aux Etats-Unis de 2% en unités de soins intensifs en 1974 à 64% en 2004 [38,255]. En 2012, et selon la même source, le taux de SARM-H aux Etats-Unis était de 18,1%, et de 4,8% pour les SARM-C. Globalement, par rapport à l'incidence de base du calendrier 2007-2008, il y avait une diminution de 30%. En Allemagne, la proportion de SARM parmi les isolats de *S. aureus* issus des prélèvements à visée diagnostique a été de 1,1% en 1990, a augmenté à 17,5% en 2001, et a finalement atteint 20,3% en 2007 [256]. Les données actuelles issues de la base de données pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques de l'Institut Robert Koch indiquent également un pourcentage relativement stable de cas de SARM (tous les isolats de *S. aureus* obtenu de patients hospitalisés) pour un taux de 19,2% en 2008 et 21,9% en 2009 (RKI : <https://ars.rki.de>, dernier accès 02 Juin, 2014).

La récente diminution des taux de SARM-H aux Etats-Unis et la majorité des pays européens est encourageante et peut être liée à la mise en œuvre des interventions de prévention multifacettes (y compris des mesures axées sur le dépistage, les précautions de contact, la

décolonisation, la gestion des antibiotiques, ou un ensemble de mesures de prévention et de soins). En Belgique, une diminution de l'incidence des infections à SARM-H a été enregistrée entre 2004 et 2008, mesurable comme une diminution de la proportion moyenne de SARM (30-25%, sachant qu'elle a atteint 16,1% en 2012), et une diminution de l'incidence médiane des infections nosocomiales à SARM (3,2 à 1,6 pour 100 admissions) [256,253]. Ce succès a été obtenu par la mise à jour et le renforcement des recommandations nationales de prise en charge des SARM, l'extension de la surveillance prospective, les activités de dépistage, et les activités visant à promouvoir l'utilisation prudente des antibiotiques [257].

En France, la proportion de SARM parmi les souches cliniques de *S. aureus* a diminué de 41% en 1993 à 26,6% en 2007 [220], et était autour de 20,1% en 2011 [113]. Cette forte diminution est liée à un ensemble de mesures visant à réduire la transmission croisée y compris le placement en chambre individuelle, la promotion de l'hygiène des mains, la surveillance active chez les patients à haut risque, la notification rapide des cas, et des rétroactions [220].

En Angleterre, un programme ayant visé la réduction des bactériémies à SARM de moitié de 2004 à 2008, a été un succès grâce à un ensemble de mesures mis en œuvre successivement dans les hôpitaux anglais, dont la déclaration obligatoire de toutes les bactériémies à SARM, l'établissement d'une campagne nationale d'hygiène des mains, l'utilisation prudente des antibiotiques, et l'implantation de ce qu'on appelle des «interventions à fort impact». A savoir des faisceaux de soins axés sur les procédures cliniques clés qui peuvent augmenter le risque d'infection s'ils ne sont pas effectués correctement (par exemple, cathéter veineux central). Après cinq ans, les données confirment une réduction de 62% de l'incidence des SARM à partir d'hémocultures en Angleterre [258].

### **1.3. Facteurs de risque**

Dans notre étude, le taux d'infection à *S. aureus* était plus élevé chez les hommes (61,5 %) que les femmes (38,5%). Ce résultat est similaire à celui trouvé dans une étude précédente effectuée en Algérie [15]. Plusieurs études cliniques suggèrent que le sexe constitue un facteur de risque d'infection. Dans une étude épidémiologique du sepsis, McGowan et al., ont noté une incidence plus élevée de la septicémie chez les hommes comparés aux femmes [259]. Bone et al., ont examiné rétrospectivement quatre études de sepsis sévères et ont noté une prédominance des patients du sexe masculin (60%-65%) [260]. Dans une autre étude menée par Offner et al., ont noté que le sexe masculin est associé à un risque considérablement accru d'infections majeures suivant un traumatisme, un taux équivalent approximativement le double de celui des femmes. Cet effet est plus significatif après des blessures de gravité modérée (ISS 16-25) et persiste dans tous les groupes d'âge [261]. Cependant, la raison de la prédominance du sexe féminin dans la catégorie enfant (<15ans) dans notre étude, demeure inconnue.

Les personnes présentant des facteurs de risque traditionnels, y compris l'hospitalisation, la chirurgie, la résidence dans les établissements de soins à long terme, hémodialyse ou dialyse péritonéale, les personnes infectées par le VIH, le diabète, et les personnes âgées sont à risque accru d'infections à *S. aureus* [1]. En outre, le diabète et ses complications augmentent avec l'âge et peuvent contribuer à l'augmentation de la prévalence des infections à SARM chez les personnes âgées [262]. Ceci explique notre très fort taux des infections à *S. aureus* chez la catégorie adulte (15 à <65 ans), sachant que 65,8% (n=52) de cette catégorie provenait du service endocrinologie-diabétologie.

Venant appuyer notre taux élevé d'infections à SARM chez les enfants (21,7%), un certain nombre d'études indiquent une incidence croissante des IAS à SARM chez les enfants atteints de maladies sous-jacentes prédisposant à l'infection par *S. aureus* [263]. Aussi, des rapports, en

particulier en Amérique du Nord, ont indiqué que le SARM peut être transmis dans la communauté, même chez les enfants sans facteurs de risque traditionnels [264,265].

Nos résultats montrent que la majorité des patients ayant une infection nosocomiale (53,4%) ont une tranche d'âge entre 15 et 65 ans, et qu'une proportion non négligeable (18,9%) a un âge supérieur à 65 ans. Ces résultats ne concordent pas avec la littérature qui souligne que l'âge est un facteur de risque infectieux aux deux extrémités de la vie, avant 1 an et après 75 ans ou ceci peut aisément s'expliquer par l'importance de la morbidité chez le sujet âgé [266].

#### **1.4. Épidémiologie des infections à SARM**

Les infections de la peau et des tissus mous sont l'une des raisons les plus communes sollicitant des soins médicaux. Elles peuvent être des *SSTIs* non compliquées incluant des infections superficielles, telles que la cellulite, les abcès simples, l'impétigo, et les furoncles. Dans la plupart des cas, ces infections peuvent être traitées par une incision chirurgicale seule ou, dans le cas de cellulite, avec uniquement des antibiotiques. Les *SSTIs* compliquées comprennent les infections impliquant soit les tissus mous profonds ou nécessitant une intervention chirurgicale importante, telles que les ulcères infectés, les brûlures et les abcès majeurs, soit une infection chez un patient avec une maladie sous-jacente significative et une comorbidité qui compliquent la réponse au traitement. Par opposition aux *SSTIs* non compliquées, les *SSTIs* compliquées nécessitent souvent une hospitalisation [267].

Parmi les nombreux agents pathogènes impliqués dans les *SSTIs*, *S. aureus* est la bactérie pathogène la plus communément identifiée et plus particulièrement le SARM à la fois chez les patients hospitalisés ou ambulatoires, adultes ou enfants en bonne santé [268–271]. Au cours du Programme de surveillance antimicrobienne SENTRY mené à l'échelle mondiale entre 1998 et 2004 chez les patients hospitalisés, *S. aureus* était la cause la plus fréquente des *SSTIs* en Amérique du Nord, en Europe, et en Amérique Latine avec des taux d'infection de 44,6%,

37,5%, et 33,5%, respectivement. Le taux le plus élevé de la résistance à la méticilline était enregistré en Amérique du Nord (35,9%) [272].

Dans notre étude menée au cours de l'année 2010, 73,7% de toutes les infections à *S. aureus* étaient des *SSTIs*, répartis entre les *SSTIs* compliquées liées au diabète (64,2%) et les lésions cutanées non liées au diabète (35,8%). Sachant que le SARM représentait 71,55% (n=78) des *SSTIs* causées par *S. aureus*. Le SARM-H était isolé chez 92,3% des patients atteints d'une *SSTI* liée au SARM, ce taux est presque plus élevé que ce qui a été publié dans une étude précédente réalisée dans le Minnesota, Etats-Unis [273]. Le taux élevé des *SSTIs* causées par le SARM-H peut être lié à l'incidence élevée des patients diabétiques. Selon la littérature l'augmentation de la prévalence du diabète est susceptible de causer un nombre croissant des *SSTIs* liées au diabète en particulier les infections du pied chez les patients hospitalisés [274]. En effet, au cours de cette étude, 59,3% des échantillons de pus ont été isolés à partir de patients diabétiques qui ont eu tout type de *SSTIs* y compris (cellulite, plaie infectée ou une infection du site opératoire) impliquant le pied.

Comme publié dans d'autres études [274–276], près des deux tiers de nos patients diabétiques avec une infection du pied étaient des hommes. Cependant, contrairement à ce qui a été rapporté dans l'étude de Lipsky et al., 2010, où 63,7% des *SSTIs* liées au diabète étaient causées par le SARM ou dans d'autres études où le SARM provoque 20% à 50% des infections du pied diabétique [119,268,277–280]. Dans notre étude, le SARM n'était responsable que de 15,7% (n=11) des *SSTIs* liées au diabète, 84,3% (n=59) étaient causées par le SARM. Notre résultat est confirmé par une deuxième étude menée à Annaba en 2011, où le SARM a causé 85,9% des *SSTIs* liées au diabète [16].

Quant aux SARM-C, ces dernières représentent 85,7% des *SSTIs* causées par les SARM-C. Effectivement, le SARM-C est principalement associé aux infections de la peau et des tissus

mous [281]. De plus notre résultat ici présent est conforme à ce qui a été rapporté par Antri et al., 2010 [15].

Parallèlement à la propagation du SARM, une augmentation spectaculaire de la durée d'hospitalisation, des coûts des soins médicaux, de la résistance antimicrobienne, et des interventions opératoires pour les *SSTIs* ont été rapportés au cours de la dernière décennie [282–285]. Engemann et al., 2003, ont rapporté dans une étude menée chez des patients présentant des infections du site opératoire, des frais médians hospitaliers atteignant \$52 791 pour les patients atteints d'une infection à SASM et de \$92 363 pour les patients atteints d'une infection à SARM ; ces derniers ont également un taux de mortalité postopératoire 3,4 fois plus élevé [283]

Dans notre étude, la bactériémie constituait environ 9% des infections à *S. aureus*, soit un taux d'incidence de 0,052 cas pour 1000 patients-jours, avec un taux de résistance à la méticilline de l'ordre de 23%, ce qui représente une incidence de l'ordre de 0,012 cas pour 1000 patients-jours. Soixante et un pourcent des bactériémies à *S. aureus* était d'origine nosocomiale, soit une incidence de l'ordre de 0,032 cas pour 1000 patients-jours. Sachant que toutes les bactériémies à SARM étaient nosocomiales.

Parmi les bactériémies à Gram positif, la bactériémie à *S. aureus* est l'une des infections les plus répandues et difficiles à traiter. En effet, selon le programme de surveillance antimicrobienne SENTRY, qui a examiné plus de 81 000 isolats au cours de la période 1997-2002, *S. aureus* était la cause la plus fréquente des bactériémies nosocomiales en Amérique du Nord (26%) et en Amérique latine (21,6%), et était la deuxième cause la plus fréquente des bactériémies nosocomiales en Europe (19,5%) [286]. Elle est associée à une morbidité et une mortalité importantes, avec des taux de mortalité allant de 20% à 50% [287–289].

La comparaison de l'incidence des bactériémies à *S. aureus* entre les différents pays est difficile, étant donné la variété des définitions des cas et du dénominateur. En Australie, des cas de bactériémie à *S. aureus* (survenant après le 2<sup>ème</sup> jour d'admission) ont été recueillis depuis 2003. Cela a une grande similitude avec la définition d'une infection nosocomiale à *S. aureus* utilisée dans notre étude. Ils rapportent dans leurs données récemment publiées, un taux d'incidence de bactériémie à *S. aureus* de l'ordre de 0,064 cas pour 1000 patients-jours, qui est deux fois plus que le nôtre, et une incidence de l'ordre 0.018 cas pour 1000 patients-jours pour les bactériémies à SARM, légèrement supérieur à notre résultat [290]. En Angleterre, un rapport de surveillance national publié en 2013, rapporte une incidence de bactériémies à SARM pareil au notre, soit de l'ordre de 0,012 cas pour 1000 patients-jours [291].

Nos résultats sont encore plus faibles que ceux qui ont été rapportés en Ecosse, avec une incidence de 0,50 cas pour 1000 patients-jours pour les bactériémies à *S. aureus*, et de 0,03 cas pour 1000 patients-jours pour les bactériémies nosocomiales à SARM [292].

Il n'existe pas de données nationales des États-Unis sur l'incidence de bactériémies nosocomiales à *S. aureus* ayant le même dénominateur que le nôtre ; cependant, certaines études donnent un aperçu de la situation. Une étude menée par Kallen et al., 2010, a examiné les infections nosocomiales invasives à SARM dans 9 régions métropolitaines. Chez les patients présentant une bactériémie nosocomiale invasive à SARM, l'incidence a diminué, passant de 0,88 à 0,62 pour 10 000 personne-année, soit une réduction de l'incidence annuelle de 11,2% [293].

Concernant la proportion des isolats de SARM causant des bactériémies, selon les données du réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques de 2007, notre résultat est semblable à celui de la Belgique et de la Hongrie soit 23.3%, et inférieur à celui de l'Israël, l'Italie, l'Angleterre, la Croatie, l'Irlande, la Grèce, la Chypre, et le Portugal, avec

33,5%, 33,7%, 35,6%, 37,6%, 38,1%, 48%, 48,2%, et 48,4%, respectivement. Cependant il reste supérieur à ceux qui ont été rapporté en Islande, Norvège, Suède, Danemark, Pays-Bas, Finlande, Autriche, Bulgarie, où les pourcentages sont presque nuls, avec 0%, 0,1%, 0,5%, 0,8%, 1,4%, 1,6%, 9,2%, 13,2%, respectivement [294].

Au cours de ces 20 dernières années, les tendances internationales ont montré une nette croissance des rapports de bactériémies à SARM chez les enfants. En Angleterre et au Pays de Galles, une vaste étude multicentrique, a rapporté une augmentation de la proportion des bactériémies à SARM de 0,9% en 1990 à 13% en 2000 [295]. Aux États-Unis, Wisplinghoff et al., ont rapporté une augmentation du taux des bactériémies à SARM de 10% en 1995 à 29% en 2001 dans 49 hôpitaux pédiatriques à travers le pays [296], tandis que Burke et al., ont rapporté une augmentation similaire de 9% en 2001 à 24% en 2006 en Californie[297]. En Afrique, le seul pays ayant publié des données sur ce sujet est l’Afrique de sud. La proportion des bactériémies à SARM chez les enfants dans ce pays a montré une hausse nette de 2% en 1974 à 18% en 1992, à 26% en 2011 [298–300]. Contrairement à ces résultats, dans notre étude, aucune bactériémie à SARM n’a été observée chez les enfants.

Encore une fois, les différences dans la fréquence de l’échantillonnage microbiologique, la disponibilité des services microbiologiques et la structure des systèmes de surveillance peuvent influencer significativement nos résultats.

## 2. Résistance aux autres antibiotiques

Dans la présente étude, une résistance associée à la gentamicine, à l'érythromycine, à l'ofloxacine, à la tétracycline, à l'acide fusidique, et au cotrimoxazole, a été retrouvée. Aucune résistance aux glycopeptides, à la rifampicine, ou à la pristinamycine n'a été retrouvée.

### 2.1. Glycopeptides

La vancomycine représente toujours l'un des traitements les plus probants face aux infections à SARM, mais cette utilisation systématique a conduit à l'émergence de souches *GISA* évoquant une crainte de développer un aspect épidémique.

Contrairement à nos résultats, Rebiahi et al., ont rapporté 3 souches de SARM résistantes à la vancomycine à Tlemcen (ouest d'Algérie), avec des CMI allant de (16 µg/mL, 64 µg/mL, et 128 µg/mL), appuyés par la détection du gène *van A* [7].

L'augmentation des SARM dans les hôpitaux algériens a favorisé l'intégration des glycopeptides dans les schémas thérapeutiques permettant l'élimination de ces souches, ces molécules étaient jusqu'à ces dernières années préservées du phénomène de résistance. D'autres auteurs ont déclaré que l'augmentation des SARM a accompagné l'utilisation abusive de la vancomycine [301].

### 2.2. Aminosides

Pour les aminosides, le taux de SARM résistant à la gentamicine (phénotype KTG) constaté dans cette étude est de 80,4 %. Cette résistance est plus élevée, comparée à celle observée en Tunisie (18 %), au Maroc (60,8 %) et en France (6,1 %) [302–304].

L'analyse des résultats de la résistance à la gentamicine des SARM en Algérie permet de noter une nette augmentation de la résistance : elle était de l'ordre de 7 % en 2006 [305], et se situait à 34% en 2011 [15]. Dans les pays voisins la tendance est également à la hausse, elle était à

40,2 % au Maroc à la fin des années 90 [306], et a atteint 60,8 % en 2011 [303]. En Tunisie la résistance des SARM se stabilise autour de 18% [302,307].

Contrairement à cette évolution, en France la fréquence de sensibilité du SARM aux antibiotiques surveillés (gentamicine, tobramycine, érythromycine et fluoroquinolones) a augmenté depuis 1998. Par exemple, le taux de sensibilité à la gentamicine est passée de 61 % en 1998 à près de 93,1 % en 2009 [304].

La résistance à la kanamycine et la tobramycine est respectivement de 100% et 82,2%. Ces taux sont plus élevés que ceux retrouvés en Tunisie, où la résistance est respectivement de 78% et 21% [302].

### **2.3. Macrolides et lincosamides**

Avec un taux de résistance à l'érythromycine de 64,1 %, notre résultat est plus élevé que ce qui a été rapporté dans une précédente étude algérienne avec un taux de 56% [7], ainsi que certains pays méditerranéens, tels que : la Libye (47 %), la Tunisie (49%), ou la France (41,8 %), mais reste inférieur à ce qui a été rapporté au Maroc (89,8%) [302–304,308]. Ceci peut être expliqué par le fait que le traitement des infections à Staphylocoques fait appel essentiellement à ces antibiotiques, avec bien sûr la disponibilité de ces médicaments sur le marché algérien et leur accessibilité sans prescription médicale.

Cependant, notre taux reste légèrement inférieur à celui des Etats-Unis (66%) [309], et beaucoup plus faible au Nigéria (69%), en Ethiopie (74%), en Afrique de Sud (82 %), et en Tanzanie (92%) [310–313].

Les résultats montrent que la résistance à la Clindamycine (64,1 %) a été associée à celle de l'érythromycine ce qui nous incite à penser au même mécanisme de résistance (phénotype MLSgB) qui confère la résistance aux Macrolides, Lincosamides, et streptogramines B [166].

On note aussi que notre taux de résistance à la clindamycine est significativement supérieur à ce qui a été rapporté dans l'Ouest de l'Algérie par Rebiahi et al., avec 12,2 % [7]. Notre résultat est identique à celui de la Tanzanie (64%), reste supérieur à celui observé en France (44 %), et inférieur à celui de l'Afrique de Sud (82 %) [304,312,313].

#### **2.4. Fluoroquinolones**

Dans la présente étude, un pourcentage significativement élevé (83,7 %) des isolats de SARM a montré une résistance à l'ofloxacine. Ce taux est supérieur à ce qui a été rapporté dans les autres pays africains, notamment la Tunisie (41%), le Maroc (60%), l'Afrique du Sud (18%), et le Nigéria (31%) [314,302,313,315]. Néanmoins, ce taux reste inférieur à ce qu'ont rapporté les différents réseaux d'ONERBA où le taux de résistance aux fluoroquinolones est de 88% [304]. Il est aussi inférieur si on le compare à celui de l'Inde ou du Pakistan qui ont des taux de résistance supérieur à 90% [316].

Les fluoroquinolones sont parmi les classes antimicrobiennes les plus couramment prescrites dans l'hôpital et dans la communauté [317]. Cependant, l'utilisation inappropriée des fluoroquinolones devrait être identifiée et réduite. Plusieurs enquêtes récentes suggèrent que les fluoroquinolones eux-mêmes peuvent effectivement prédisposer les patients à l'infection ou le portage de SARM [317].

#### **2.5. Autres antibiotiques**

Dans notre étude, 41,3% des SARM étaient sensibles au Cotrimoxazole. Ce taux est inférieur à celui du Maroc (47%), de la Tunisie (87%), du Madagascar (61%), et de l'Afrique du Sud (71%) [314,302,318,249]. En France, la sensibilité au cotrimoxazole des souches SARM est très importante car on dénombre une proportion entre 95 et 98 % de SARM sensibles en 2009 [304]. En Israël, la susceptibilité des SARM isolés liés aux bactériémies nosocomiales vis-à-vis au

cotrimoxazole a augmenté de 73% en 1994-1998 à 95 % en 2001-2004 [319]. Les mêmes tendances ont été observées aux Etats-Unis [320].

Cotrimoxazole (triméthoprim/sulfasont inférméthoxazole), est un ancien antibiotique largement utilisé depuis plusieurs décennies dans les pays à ressources limitées en raison de son faible coût, de son profil de toxicité acceptable, son activité bactéricide, et sa disponibilité dans les deux voies orale et intraveineuse [319]. Ceci peut expliquer les faibles taux de sensibilité observés en Algérie et dans les pays africains.

La Rifampicine a été efficace contre les souches de SARM isolées, puisque aucune souche n'a pu résister à cette molécule. En Algérie, son utilisation a été relativement délaissée au profit de nouvelles molécules ; ce qui pourrait expliquer la restauration de son efficacité. Ces données sont inférieurs aux taux rapportés en Algérie (2,3%), en Tunisie (6,7%, 2%), et au Maroc (30%) [305,307,302,314].

L'efficacité de la fosfomycine a été remarquable, puisque cette molécule a été active sur 98,9% des SARM. Ce taux est supérieur à celui rapporté par Rebiahi et al., à Tlemcen avec une sensibilité de l'ordre de 93% [7]. Il reste supérieur aux taux observés au Maroc et au Madagascar, qui ont trouvé respectivement, 94% et 97% [249,314]. En France, entre 1993 et 2009, la sensibilité des souches SARM envers la fosfomycine est augmentée en passant de 66,7 à 94,9% [304].

Le caractère multirésistant des SARM observé dans la présente étude limite le choix des antibiotiques pour le traitement. Dans les hôpitaux, la vancomycine reste l'antibiotique approprié pour le traitement des infections à SARM. Cependant, la sélection des souches résistantes aux glycopeptides est une préoccupation, en particulier avec l'isolement de certaines souches avec une sensibilité réduite à la vancomycine [321]. Compte tenu de cette situation, il est intéressant de souligner l'importance de l'introduction et la commercialisation d'autres

molécules actives contre le SARM en Algérie, tels que la daptomycine, l'inézolide, et la tigécycline [322].

### **3. Epidémiologie moléculaire**

Historiquement, les infections à SARM-H ont été causées par des clones diffusés à l'échelle internationale. Les clones les plus fréquemment rencontrés sont le clone ibérique (ST247-IA), le clone brésilien (ST239-III A), le clone Hongrois (ST239 -III), le clone de New York / Japon (ST5-II), et le clone pédiatrique (ST5-IV) [55]. Trois autres clones doivent être ajoutés à cette liste restreinte pour couvrir les pays de l'Europe du nord : EMRSA-15 (ST22-SCCmecI), EMRSA- 16 (ST36-SCCmecII) et Berlin (ST45-SCCmecIV) [55].

Des travaux antérieurs ont démontré que les clones prédominants dans les hôpitaux d'Algérie sont le clone Européen (ST80-SARM-SCCmec IVc) (censé être un clone communautaire), suivi du clone Brésilien / Hongrois (ST239-MRSA-SCCmec III) [15,305]. En effet, Antri et al., ont indiqué que le clone ST80-SCCmec IVc représente actuellement 75 % des isolats de SARM-H dans l'hôpital universitaire d'Alger [15]. Plus récemment, une étude concernant qu'un service menée dans un des hôpitaux d'Annaba a révélé que ce clone européen représenté 13,7% des isolats de SARM impliqué dans les ulcères du pied diabétique, cependant, que ces isolats étaient communautaires ou hospitaliers n'est pas connu [16]. Dans notre étude, le clone ST80 représentait 14,1% de toutes les infections à SARM- H, représentant ainsi son émergence actuelle comme un agent pathogène nosocomial dans cette zone géographique. Les autres isolats de SARM-H ont presque tous été liés au clone Brésilien / Hongrois (ST239, SCCmec III, spa t037) (n= 72, 84.70%), une importante lignée de SARM-H qui est également répandue dans d'autres hôpitaux algériens [15]. D'intérêt particulier est le fait que, contrairement à l'hôpital universitaire d'Alger où le clone européen a réussi à dominer les souches de SARM-

H, notre étude montre que le clone prédominant à Annaba SARM-H ST239 a su résisté jusqu'à maintenant à l'invasion du SARM-C ST80 au sein du milieu hospitalier.

Malgré que les SARM-C ne sont pas génotypiquement et phénotypiquement liées aux ancestraux multi-résistants SARM-H, récemment, ils ont commencé à remplacer ces derniers autrefois pandémiques (CC5, 8, 22, 36, et 45) dans les établissements de soins [6,323]. Depuis 2003, des épidémies nosocomiales causées par des clones de SARM-C ont été progressivement signalées en Amérique du Nord, en Allemagne, en Israël, en Suisse, en Grèce et au Royaume-Uni [324]. Ces épidémies sont dues à différents clones de SARM-C PVL positifs tels que ST5, ST22, ST30, ST80 [325,324,152]. Récemment, une épidémie de SARM-C causée par USA300 a été rapportée dans une pouponnière d'un hôpital en Italie [326]. Aux Etats-Unis, où l'émergence de SARM-C comme une cause d'infections nosocomiales est le plus documenté, un modèle mathématique déterministe a prédit que le SARM-C deviendra la souche de SARM dominante dans les hôpitaux et les établissements de santé, en raison de la expansion réservoir de la communautaire de SARM-C et l'augmentation des personnes admises à l'hôpital [9].

Les infections à SARM-C ont été dominées par cinq majeures lignées : ST1-IV (USA400), ST8-IV (USA300), ST30-IV (Sud-ouest du pacifique), ST59-IV/V (USA1000, Taiwan), et ST80-IV (le SARM-C européen), chacune étant limitée géographiquement [327]. Commun à toutes ces lignées, est le fait qu'ils sont généralement sensibles aux non- $\beta$ -lactamines, abritent les SCCmec de petites tailles de types IV/V, et portent la PVL [8]. Cependant, comme plusieurs lignées sont PVL-négative, cette dernière n'est pas considérée comme un marqueur universel pour SARM-C [328–330].

Le clone européen ST80-IV (allèle 1-3-1-14-11-51-10) a été identifié au début des années 1990 et se trouve aujourd'hui dans toute l'Europe, le Moyen-Orient et Afrique du Nord [15,331,121]. Les SARM-C ont été associés principalement avec les infections communautaires,

essentiellement les *SSTIs* chez les jeunes [8]. Le fait d'avoir dans notre étude 94,7% des isolats ST80-IV (12 SARM-H et 7 SARM-C) associé aux *SSTIs*, vient confirmer la notion que ce clone est principalement associé aux *SSTIs* dans le milieu hospitalier et/ou communautaire [332].

La résistance à la tétracycline, à la kanamycine, et la sensibilité réduite à l'acide fusidique sont les caractéristiques historiques du clone européen de SARM-C ST80 en Europe (Otter and French, 2010). Cependant, près de la moitié des isolats de SARM-H ST80 (5/12 ; 41,7%) étaient résistants à la gentamicine et aux fluoroquinolones, comme dans l'étude d'Alger [15]. Comparé aux isolats du clone européen en Europe, nous avons détecté une plus grande sensibilité à la tétracycline (14/19 ; 73,7%). Ces résultats indiquent que le SARM-C est en mesure de développer ses profils de résistance dans les milieux hospitaliers où les volumes de consommation d'antimicrobiens sont plus élevés que dans la communauté. Ce qui est inquiétant, des modèles informatiques suggèrent que l'acquisition de la résistance aux fluoroquinolones chez le SARM-C peut constituer un avantage sélectif important et prévoient leur succès propagation à l'hôpital [333].

A des concentrations élevées, la PVL provoque la lyse de la cellule hôte ; cependant, à des concentrations plus faibles, la PVL prépare les neutrophiles pour libérer des médiateurs inflammatoires tels que le leucotriène B<sub>4</sub>, et IL-8 [334]. Bien que son rôle dans la pathogénicité reste controversé, de nombreuses études menées sur des souris montrent le rôle de PVL dans l'inactivation mitochondriale et l'apoptose ainsi que son association avec certaines maladies établies telles que la pneumonie nécrosante et les *SSTIs* [8,36]. Contrairement aux souches ST80 PVL-négative qui ont été rapporté en Algérie [335], en France et en Suisse [126], toutes nos souches ST80 étaient PVL-positive. Ceci correspond à ce qui a été trouvé dans l'étude de Anti et al, [15]. Que ces isolats sont nées des souches PVL-positive en raison de la perte du phage PVL ou représentent les souches ST80 sauvages qui n'avaient pas encore acquis le phage PVL est quelque chose qui doit être encore clarifiée.

Le type le plus commun du gène *spa* à ce jour détecté dans les isolats de ST80-SARM-SCCmecIV est le spa t044 (motif de répétition 07 23 12 34 34 33 34) en Europe [126,336], en Afrique [17,331,337], et en Asie [338–340]. Cette constatation était en ligne avec notre résultat.

Le clone Brésilien / Hongrois est probablement le clone le plus prédominant dans le monde (70 à 80% des souches SARM), causant la majeure partie des infections nosocomiales à SARM. Les premiers rapports publiés sur les infections à SARM causées par le clone ST239 sont des épidémies hospitalières, de SARM résistants à la gentamicine, en Australie, au Royaume-Uni, et aux Etats-Unis, qui a commencé à la fin des années 1970 et au début des années 1980 [341–343]. Les épidémies hospitalières causées par ST239 sont documentés partout en Europe et en Amérique du Sud durant les années 1980 et 1990 [344–352] ; et partout en Asie et au Moyen-Orient durant les années 1990 et 2000 [353–362]. Actuellement, le clone ST239 est une cause majeure d'infections à SARM dans les hôpitaux asiatiques ; une étude a suggéré que le ST239 représente 90% des infections nosocomiales à SARM en Asie, une région géographique qui comprend 60% de la population mondiale [58,363]. Il a été rapporté récemment au Royaume-Uni comme cause d'épidémies de bactériémies liées aux accès vasculaires [364].

Dans notre étude, 84,7% des SARM-H étaient du type ST239-SARM-III-t037 (incluant t932 qui est un sous-type du t037), ce résultat est supérieur de ce qui a été rapporté en Chine où ST239 était le clone dominant avec un pourcentage de 51,5%. Cependant, Cheng et al., rapportent la prédominance du spa type t030 et non pas t037 [365]. ST239-SARM-III-t037 prévalait avant les années 2000 et a ensuite été remplacé par ST239-SARM-III-T030, qui continue à être le clone le plus prédominant [366]. Cheng et al., suggèrent que ST239-MRSA-III-t030 dispose d'une stratégie de survie plus forte que celle du ST239-SAM-III-t037 pour une transmission facile dans les hôpitaux chinois [365]. En cartographiant le génome de ce dernier, Harris *et al.*, ont trouvé que t037 représentait le spa type ancestrale du ST239-SARM-III [367]. Nos résultats suggèrent que ce type continue d'être le clone prévalent de SARM en Algérie. Sa

prédominance dans les hôpitaux d'Algérie peut être due à ses propriétés avantageuses par rapport aux autres clones, comme une meilleure capacité à former les biofilm et une tendance à acquérir des gènes qui lui confèrent une résistance à différentes d'agents antimicrobiens [368]. Dans cette étude, le clone ST239 avait différents profil de multirésistance à différents antibiotiques dont : kanamycine, tobramycine, gentamicine, érythromycine, clindamycine, ofloxacin, tétracycline, acide fusidique, et triméthoprim-sulfaméthoxazole. Ainsi, 75% (n=54) des souches SARM-ST239 était résistant à l'SXT. Ceci est en accord avec ce qui a été rapporté en Inde, Indonésie, Singapour, Sri Lanka, Taiwan, et en Grèce [346,359,369], alors que les souches rapportées en Chine, Viêt Nam, et la République tchèque étaient des souches sensibles à l'SXT [359,369,370]. Ces données, combinées à nos résultats actuels suggèrent que la sensibilité des isolats de SARM-ST239 à l'SXT est différente selon le pays d'isolement.

La souche sporadique SARM PVL négative, caractérisé par t005 et ST22 qu'on a isolé dans notre étude, est liée à l'un des majors clones de SARM circulant dans les hôpitaux au Royaume-Uni, où il a été désigné EMRSA-15 [371]. Bien que ce clone, également connu sous le nom de ST22-IV, abrite la SCCmec de type IV et est rare aux Etats-Unis [117], est maintenant en train de s'établir dans plusieurs régions du monde [372,373]. Typiquement EMRSA-15 est sensible à la gentamicine et résistants à l'érythromycine et la ciprofloxacine [372].

Le groupe clonal ST22 comprend les SARM ainsi que les SASM [55], les deux peuvent contenir les gènes de la PVL. En 2005, une souche SARM ST22 PVL-positive a provoqué une grande épidémie en Bavière (Allemagne) [151]. La souche qu'on a isolée était sensible à la plupart des agents antimicrobiens non- $\beta$ -lactamines, y compris l'érythromycine et la ciprofloxacine. Notre souche était susceptible à tous les non- $\beta$ -lactamines à l'exception de la fosfomycine résultant en un profil de sensibilité très divergent de celui d'EMRSA-15.

# CONCLUSION

---

L'émergence des souches ST80-SARM-SCCmecIV PVL<sup>+</sup> dans la communauté soulève la crainte que ces souches aillent migrer dans le milieu hospitalier [374], et en effet, cette étude fournit la preuve que c'est déjà le cas. Jusqu'à présent, les souches de SARM-C ont été sensibles aux antibiotiques autres que les  $\beta$ -lactamines, permettant des options de traitement alternatives. Toutefois, dans le milieu hospitalier, il est probable que des souches multirésistantes émergeront, et l'apparition des isolats du clone européen ST80 résistants à la ciprofloxacine, l'érythromycine, à l'acide fusidique, et la tétracycline peut représenter la première vague de multirésistance des SARM-C.

En résumé, les souches de SARM-C sont susceptibles de devenir de plus en plus responsables d'IAS. Le transfert du SARM-C entre l'hôpital et la communauté peut entraîner des infections à SARM plus fréquentes dans la communauté, des infections à SARM plus graves chez les patients hospitalisés, la propagation du SARM dans des services auparavant épargnées comme la pédiatrie et l'obstétrique, des infections à SARM plus fréquentes chez les travailleurs de la santé, et l'émergence de souches multirésistantes de SARM-C. À l'ère de du SARM-C comme une cause des IAS, une terminologie future devrait définir le vrai SARM-C sur la base de ces caractéristiques microbiologiques et moléculaires [12].

L'autre point, est que, contrairement à l'hôpital d'Alger où ST80 est le clone prédominant, nous avons constaté que le principal clone dans l'hôpital d'Annaba (86%) était le clone Brésilien/Hongrois ST239-III. De ce fait, d'autres études devraient être mises en œuvre afin d'expliquer la différence dans l'épidémiologie du SARM-H en Algérie, de comprendre les raisons de la résistance du clone ST239-III à l'invasion du clone européen ST80 à Annaba (Est Algérien).

Ce qui est particulièrement intéressant aussi, est l'isolement dans notre étude de la souche SARM ST22 SCCmec IVc du spa type t005, atypique par sa sensibilité à tous les non  $\beta$ -

lactamines à l'exception de la fosfomycine et l'absence de la toxine PVL, alors qu'elle porte la *SCCmec* du type IV.

Le fardeau des infections nosocomiales causées par le SARM-C va probablement continuer à augmenter dans les années à venir, avec un remplacement progressif des lignées historiques du SARM-H. L'importation continue de souches hautement épidémiques dans un environnement qui favorise leur propagation peut être un déterminant significatif de cette tendance [12]. L'étendue du réservoir communautaire du SARM-C reste mal documentée en Algérie, il incombe donc aux autorités de santé de développer des systèmes de surveillance non seulement qui sont en mesure de suivre la dynamique des clones de SARM en Algérie, mais aussi à fournir les ressources pour le dépistage des porteurs de SARM. Le personnel hospitalier a la responsabilité de mettre en œuvre, de maintenir et de respecter certaines mesures :

- Dispositions relatives à la prescription des antibiotiques :
- Organisation générale de la prescription des antibiotiques à l'hôpital nécessitant la réactualisation du CLIN et de la commission des médicaments ; ainsi que la mise en disposition de référents à qui on fera appel pour la validation de la prescription de certains antibiotiques ;
- Listes d'antibiotiques réservés à certaines indications et délivrés sur justification écrite (comportant des renseignements cliniques et bactériologiques) ;
- Campagne de sensibilisation au bon usage du médicament, à prendre soin de sa santé, sans antibiotiques.
- Instauration d'une politique stratégique et efficace pour l'amélioration des conditions d'hygiène :
- Assurer la formation et sensibilisation de tous les acteurs de la santé : médecins, microbiologistes, personnels soignants, et hygiénistes ;

- Des précautions rigoureuses doivent être entreprises en vue de réduire les risques de transmission de ces microorganismes, elles doivent être appliquées à l'ensemble des patients, quel que soit le statut infectieux, et lors de tous risque de contact avec n'importe quel produit biologique. Il est également impératif de procéder à un isolement systématique des patients à risque dès l'entrée dans un service ;
- Hygiène des mains demeure la première ligne de défense. Ce geste doit être aussi efficace que redondant moyennant des solutions hydro-alcooliques avant et après chaque soin sur un même patient.
- Promouvoir la recherche en matière de caractérisation phénotypique et génotypique de la résistance par la mise à disposition d'équipements de laboratoire et formation du personnel. Concernant les SARM, créer une base d'enregistrement de données qui permettra de suivre la circulation des différents clones.

Les hôpitaux doivent rester des lieux où les citoyens peuvent aspirer à des résultats de santé positifs avec confiance

## Bibliographie

- [1] Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* 1998;339:520–32. doi:10.1056/NEJM199808203390806.
- [2] Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis. *Microbiol Rev* 1987;51:88–134.
- [3] Johnson AP. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the European landscape. *J Antimicrob Chemother* 2011;66 Suppl 4:iv43–8. doi:10.1093/jac/dkr076.
- [4] Kopp BJ, Nix DE, Armstrong EP. Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant Staphylococcus aureus infections. *Ann Pharmacother* 2004;38:1377–82. doi:10.1345/aph.1E028.
- [5] Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2010;67:3057–71. doi:10.1007/s00018-010-0389-4.
- [6] Song J-H, Hsueh P-R, Chung DR, Ko KS, Kang C-I, Peck KR, et al. 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. doi:10.1093/jac/dkr024.
- [7] Rebiahi SA, Abdelouahid DE, Rahmoun M, Abdelali S, Azzaoui H. Emergence of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria). *Médecine Mal Infect* 2011;41:646–51. doi:10.1016/j.medmal.2011.09.010.
- [8] David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:616–87. doi:10.1128/CMR.00081-09.
- [9] Otter JA, French GL. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains as a cause of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect* 2011;79:189–93. doi:10.1016/j.jhin.2011.04.028.
- [10] Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Pantón–Valentine leukocidin. *Lab Invest* 2006;87:3–9. doi:10.1038/labinvest.3700501.
- [11] Patel M, Waites KB, Hoesley CJ, Stamm AM, Canupp KC, Moser SA. Emergence of USA300 MRSA in a tertiary medical centre: implications for epidemiological studies. *J Hosp Infect* 2008;68:208–13. doi:10.1016/j.jhin.2007.12.010.
- [12] Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe. *Lancet Infect Dis* 2010;10:227–39. doi:10.1016/S1473-3099(10)70053-0.
- [13] Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of Staphylococcus aureus clinical isolates carrying Pantón–Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2006;12:29–34. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01295.x.
- [14] Dauwalder O, Lina G, Durand G, Bes M, Meugnier H, Jarlier V, et al. Epidemiology of Invasive Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clones Collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol* 2008;46:3454–8. doi:10.1128/JCM.01050-08.
- [15] Antri K, Rouzic N, Dauwalder O, Boubekri I, Bes M, Lina G, et al. High prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2011;17:526–32. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03273.x.
- [16] Djahmi N, Messad N, Nedjai S, Moussaoui A, Mazouz D, Richard J-L, et al. Molecular epidemiology of Staphylococcus aureus strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E398–404. doi:10.1111/1469-0691.12199.

- [17] Ben Nejma M, Mastouri M, Bel Hadj Jrad B, Nour M. Characterization of ST80 Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77:20–4. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.010.
- [18] Ogston A. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *Br Med J* 1881;1:369.b2–375.
- [19] Freney J. Précis de bactériologie clinique. Paris: Éd. Eska; 2007.
- [20] Le Loir Y, Gautier M. *Staphylococcus aureus*. Paris; Cachan: Éd. Tec & doc ; Éd. médicales internationales; 2009.
- [21] Armstrong-Esther CA. Carriage patterns of *Staphylococcus aureus* in a healthy non-hospital population of adults and children. *Ann Hum Biol* 1976;3:221–7.
- [22] VandenBergh MFQ, Yzerman EPF, van Belkum A, Boelens HAM, Sijmons M, Verbrugh HA. Follow-Up of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage after 8 Years: Redefining the Persistent Carrier State. *J Clin Microbiol* 1999;37:3133–40.
- [23] Williams REO. HEALTHY CARRIAGE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS: ITS PREVALENCE AND IMPORTANCE1. *Bacteriol Rev* 1963;27:56–71.
- [24] Eriksen NH, Espersen F, Rosdahl VT, Jensen K. Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. *Epidemiol Infect* 1995;115:51–60.
- [25] Kluytmans JAJW, Wertheim HFL. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection* 2005;33:3–8. doi:10.1007/s15010-005-4012-9.
- [26] Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:505–20.
- [27] Noble WC, Valkenburg HA, Wolters CH. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J Hyg (Lond)* 1967;65:567–73.
- [28] Peacock SJ, Justice A, Griffiths D, de Silva GDI, Kantzanou MN, Crook D, et al. Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. *J Clin Microbiol* 2003;41:5718–25.
- [29] Acton DS, Plat-Sinnige MJT, van Wamel W, de Groot N, van Belkum A. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2009;28:115–27. doi:10.1007/s10096-008-0602-7.
- [30] Mertz D, Frei R, Jaussi B, Tietz A, Stebler C, Flückiger U, et al. Throat swabs are necessary to reliably detect carriers of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2007;45:475–7. doi:10.1086/520016.
- [31] Cohen PR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: a review of epidemiology, clinical features, management, and prevention. *Int J Dermatol* 2007;46:1–11. doi:10.1111/j.1365-4632.2007.03215.x.
- [32] Cunningham R, Cockayne A, Humphreys H. Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bone and joint infections. *J Med Microbiol* 1996;44:157–64.
- [33] Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:224–42.
- [34] Novick RP, Subedi A. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chem Immunol Allergy* 2007;93:42–57. doi:10.1159/0000100857.
- [35] Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res GMR* 2003;2:63–76.

- [36] Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 2007;315:1130–3. doi:10.1126/science.1137165.
- [37] Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2004;39:309–17. doi:10.1086/421946.
- [38] Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R, et al. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2006;42:389–91. doi:10.1086/499367.
- [39] Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2003;36:53–9. doi:10.1086/345476.
- [40] Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin resistance in Staphylococcus aureus bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 2005;26:166–74. doi:10.1086/502522.
- [41] Buckingham SC, McDougal LK, Cathey LD, Comeaux K, Craig AS, Fridkin SK, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus at a Memphis, Tennessee Children’s Hospital. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:619–24.
- [42] Fraunholz M, Sinha B. Intracellular staphylococcus aureus: Live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2. doi:10.3389/fcimb.2012.00043.
- [43] Cox RA, Conquest C, Mallaghan C, Marples RR. A major outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus caused by a new phage-type (EMRSA-16). *J Hosp Infect* 1995;29:87–106.
- [44] Baggett HC, Hennessy TW, Rudolph K, Bruden D, Reasonover A, Parkinson A, et al. Community-onset methicillin-resistant Staphylococcus aureus associated with antibiotic use and the cytotoxin Panton-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Infect Dis* 2004;189:1565–73. doi:10.1086/383247.
- [45] Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A. Staphylococcus aureus resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol Baltim Md 1950* 2004;172:1169–76.
- [46] Yves LL, Michel G. Staphylococcus aureus. Lavoisier; 2009.
- [47] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome mec, Encodes Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1549–55. doi:10.1128/AAC.44.6.1549-1555.2000.
- [48] Menzies BE, Kourteva I. Internalization of Staphylococcus aureus by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* 1998;66:5994–8.
- [49] Ayliffe GA. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1997;24 Suppl 1:S74–9.
- [50] Jevons MP. “Celbenin” - resistant Staphylococci. *Br Med J* 1961;1:124.
- [51] Michel-Briand Y, Chabert Y. Une histoire de la résistance aux antibiotiques à propos de six bactéries. Paris: L’Harmattan; 2009.
- [52] Chang HR. MRSA and staphylococcal infections. Lulu; 2006.

- [53] Kesah C, Ben Redjeb S, Odugbemi TO, Boye CS-B, Dosso M, Ndinya Achola JO, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2003;9:153–6.
- [54] Centers for Disease Control and Prevention. From the Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *JAMA J Am Med Assoc* 1999;282:1123–5.
- [55] Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7687–92. doi:10.1073/pnas.122108599.
- [56] Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001;9:486–93.
- [57] Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol Pol Tow Mikrobiol Pol Soc Microbiol* 2011;60:95–103.
- [58] Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, et al. 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. doi:10.1128/AAC.50.3.1001-1012.2006.
- [59] Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Söderquist B, Hiramatsu K. Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain Isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3512–6. doi:10.1128/AAC.00087-08.
- [60] Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sørnum M, et al. Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3046–50. doi:10.1128/AAC.01475-10.
- [61] International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4961–7. doi:10.1128/AAC.00579-09.
- [62] Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1323–36. doi:10.1128/AAC.45.5.1323-1336.2001.
- [63] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS431-Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-Carrying, Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1955–63. doi:10.1128/AAC.45.7.1955-1963.2001.
- [64] McCarthy AJ, Witney AA, Gould KA, Moodley A, Guardabassi L, Voss A, et al. The distribution of mobile genetic elements (MGEs) in MRSA CC398 is associated with both host and country. *Genome Biol Evol* 2011;3:1164–74. doi:10.1093/gbe/evr092.
- [65] Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol IJMM* 2002;292:67–74. doi:10.1078/1438-4221-00192.
- [66] Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid

- identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:264–74. doi:10.1128/AAC.00165-06.
- [67] Panton PN, Valentine FCO. STAPHYLOCOCCAL TOXIN. *The Lancet* 1932;219:506–8. doi:10.1016/S0140-6736(01)24468-7.
- [68] Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002;359:753–9. doi:10.1016/S0140-6736(02)07877-7.
- [69] Foster T. *Staphylococcus*. In: Baron S, editor. *Med. Microbiol.* 4th ed., Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
- [70] Tanaka K, xxx, xxxx. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1988;2:151–3.
- [71] Descy J, Meex C, Melin P, Hayette MP, Huynen P, De Mol P. [MALDI-TOF mass spectrometry in clinical bacteriology or how to identify a bacteria within one minute]. *Rev Médicale Liège* 2010;65 Spec no.:29–34.
- [72] Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2001;20:157–71. doi:10.1002/mas.10004.
- [73] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, Scola BL, Fournier P-E, Rolain JM, et al. 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. doi:10.1086/600885.
- [74] Bernardo K, Pakulat N, Macht M, Krut O, Seifert H, Fleer S, et al. Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* 2002;2:747–53. doi:10.1002/1615-9861(200206)2:6<747::AID-PROT747>3.0.CO;2-V.
- [75] Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000;49:295–300.
- [76] Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. Phylogenetic analysis and identification of *Shigella* spp. by molecular probes. *Mol Cell Probes* 1997;11:427–32. doi:10.1006/mcpr.1997.0136.
- [77] Soussy CJ. Société Française de Microbiologie. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: recommandations 2011. CA-SFM; 2012.
- [78] Wikler MA, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
- [79] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263–73.
- [80] Havill NL, Boyce JM. Evaluation of a New Selective Medium, BD BBL CHROMagar MRSA II, for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 2010;48:2228–30. doi:10.1128/JCM.02376-09.
- [81] García-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H, Webb CR, Brown DFJ, Curran MD, et al. 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. doi:10.1016/S1473-3099(11)70126-8.
- [82] Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA(LGA251)*. *Clin Microbiol*

- Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 2012;18:395–400. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03715.x.
- [83] Tom TSM, Kruse MW, Reichman RT. Update: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening and decolonization in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2009;88:695–702. doi:10.1016/j.athoracsur.2009.02.010.
- [84] Peterson JF, Riebe KM, Hall GS, Wilson D, Whittier S, Palavecino E, et al. Spectra MRSA, a New Chromogenic Agar Medium To Screen for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2010;48:215–9. doi:10.1128/JCM.01555-09.
- [85] Malhotra-Kumar S, Abrahantes JC, Sabiiti W, Lammens C, Vercauteren G, Ieven M, et al. Evaluation of Chromogenic Media for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2010;48:1040–6. doi:10.1128/JCM.01745-09.
- [86] Denys GA, Renzi PB, Koch KM, Wissel CM. Three-Way Comparison of BBL CHROMagar MRSA II, MRSASelect, and Spectra MRSA for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in Nasal Surveillance Cultures. *J Clin Microbiol* 2013;51:202–5. doi:10.1128/JCM.02022-12.
- [87] OHara S. Novel Rapid Culture-Based Detection Method for Methicillin-Resistant *Streptococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2008;46:3181–2. doi:10.1128/JCM.01201-08.
- [88] Nonhoff C, Roisin S, Hallin M, Denis O. Evaluation of Clearview Exact PBP2a, a new immunochromatographic assay, for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LL-MRSA). *J Clin Microbiol* 2012;50:3359–60. doi:10.1128/JCM.01829-12.
- [89] Rossney AS, Herra CM, Brennan GI, Morgan PM, O’Connell B. 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. doi:10.1128/JCM.02487-07.
- [90] Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, et al. 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;42:1875–84. doi:10.1128/JCM.42.5.1875-1884.2004.
- [91] Andriessse GI, van Rijen M, Bogaers D, Bergmans AMC, Kluytmans JAJW. Comparison of two PCR-based methods and conventional culture for the detection of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in pre-operative patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2009;28:1223–6. doi:10.1007/s10096-009-0770-0.
- [92] Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1993;17:153–62; quiz 163–4.
- [93] Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, et al. 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.
- [94] Kuhn G, Francioli P, Blanc DS. Double-Locus Sequence Typing Using *clfB* and *spa*, a Fast and Simple Method for Epidemiological Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2007;45:54–62. doi:10.1128/JCM.01457-06.
- [95] Tenover FC, Gay EA, Frye S, Eells SJ, Healy M, McGowan JE. Comparison of Typing Results Obtained for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates with the DiversiLab System and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2009;47:2452–7. doi:10.1128/JCM.00476-09.

- [96] Reed KD, Stemper ME, Shukla SK. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of MRSA. In: Ji Y, editor. *Methicillin-Resist. Staphylococcus Aureus MRSA Protoc.*, vol. 391, Totowa, NJ: Humana Press; 2007, p. 59–69.
- [97] Yao D, Yu F, Qin Z, Chen C, He S, Chen Z, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections (SSTIs). *BMC Infect Dis* 2010;10:133. doi:10.1186/1471-2334-10-133.
- [98] Kaltenboeck B, Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv Clin Chem* 2005;40:219–59.
- [99] Ruimy R, Dos-Santos M, Raskine L, Bert F, Masson R, Elbaz S, et al. 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;46:2045–51. doi:10.1128/JCM.02250-07.
- [100] Deplano A, Schuermans A, Van Eldere J, Witte W, Meugnier H, Etienne J, et al. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. The European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCMID. *J Clin Microbiol* 2000;38:3527–33.
- [101] Welsh J, McClelland M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5275–9.
- [102] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6531–5.
- [103] Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 1999;7:482–7.
- [104] Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;38:1008–15.
- [105] Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandembroucke-Grauls CM, Verhoef J, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 1996;15:60–4.
- [106] Kahl BC, Mellmann A, Deiwick S, Peters G, Harmsen D. 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. doi:10.1128/JCM.43.1.502-505.2005.
- [107] Delpech M. [DNA chips]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2000;58:29–38.
- [108] Van Leeuwen WB, Jay C, Snijders S, Durin N, Lacroix B, Verbrugh HA, et al. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* with DNA array technology. *J Clin Microbiol* 2003;41:3323–6.
- [109] Trad S, Allignet J, Frangeul L, Davi M, Vergassola M, Couve E, et al. DNA microarray for identification and typing of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42:2054–64.
- [110] Stryjewski ME, Corey GR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2014;58 Suppl 1:S10–9. doi:10.1093/cid/cit613.
- [111] Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:273–82. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030.
- [112] Mejía C, Zurita J, Guzmán-Blanco M. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis* 2010;14 Suppl 2:S79–86.

- [113] European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2011. Stockholm: ECDC; 2012.
- [114] Alioua MA, Labid A, Amoura K, Bertine M, Gacemi-Kirane D, Dekhil M. Emergence of the European ST80 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of healthcare-associated infections in Eastern Algeria. *Médecine Mal Infect* 2014;44:180–3. doi:10.1016/j.medmal.2014.01.006.
- [115] Hiramatsu K, Okuma K, Ma XX, Yamamoto M, Hori S, Kapi M. New trends in *Staphylococcus aureus* infections: glycopeptide resistance in hospital and methicillin resistance in the community. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:407–13.
- [116] Huang Y-C, Su L-H, Wu T-L, Liu C-E, Young T-G, Chen P-Y, et al. Molecular Epidemiology of Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2004;42:307–10. doi:10.1128/JCM.42.1.307-310.2004.
- [117] McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol* 2003;41:5113–20.
- [118] Pan ES, Diep BA, Charlebois ED, Auerswald C, Carleton HA, Sensabaugh GF, et al. Population dynamics of nasal strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--and their relation to community-associated disease activity. *J Infect Dis* 2005;192:811–8. doi:10.1086/432072.
- [119] Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med* 2006;355:666–74. doi:10.1056/NEJMoa055356.
- [120] Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages S-A, et al. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2008;197:1523–30. doi:10.1086/587907.
- [121] Larsen AR, Stegger M, Böcher S, Sørnum M, Monnet DL, Skov RL. Emergence and characterization of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Denmark, 1999 to 2006. *J Clin Microbiol* 2009;47:73–8. doi:10.1128/JCM.01557-08.
- [122] Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D, Nuebel U. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1258–63. doi:10.1093/jac/dkm384.
- [123] Valentini P, Parisi G, Monaco M, Crea F, Spanu T, Ranno O, et al. An uncommon presentation for a severe invasive infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in Italy: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008;7:11. doi:10.1186/1476-0711-7-11.
- [124] Tavares DA, Sá-Leão R, Miragaia M, de Lencastre H. Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in two areas (urban and rural) of Portugal. *BMC Infect Dis* 2010;10:110. doi:10.1186/1471-2334-10-110.
- [125] Otter JA, Havill NL, Boyce JM, French GL. Comparison of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from teaching hospitals in London and the USA, 2004-2006: where is USA300 in the UK? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2009;28:835–9. doi:10.1007/s10096-008-0698-9.
- [126] Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, et al. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis* 2007;13:594–600. doi:10.3201/eid1304.061316.
- [127] Goering RV, Larsen AR, Skov R, Tenover FC, Anderson KL, Dunman PM. Comparative genomic analysis of European and Middle Eastern community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CC80:ST80-IV) isolates by high-density microarray. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2009;15:748–55. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02850.x.
- [128] Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS One* 2009;4:e4258. doi:10.1371/journal.pone.0004258.
- [129] Diep BA, Sensabaugh GF, Somboonna N, Somboona NS, Carleton HA, Perdreau-Remington F. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. *J Clin Microbiol* 2004;42:2080–4.
- [130] King MD, Humphrey BJ, Wang YF, Kourbatova EV, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Ann Intern Med* 2006;144:309–17.
- [131] Miller LG, Perdreau-Remington F, Rieg G, Mehdi S, Perlroth J, Bayer AS, et al. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *N Engl J Med* 2005;352:1445–53. doi:10.1056/NEJMoa042683.
- [132] Garnier F, Tristan A, François B, Etienne J, Delage-Corre M, Martin C, et al. Pneumonia and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Emerg Infect Dis* 2006;12:498–500. doi:10.3201/eid1205.051040.
- [133] Adem PV, Montgomery CP, Husain AN, Koogler TK, Arangelovich V, Humilier M, et al. *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-Friderichsen syndrome in children. *N Engl J Med* 2005;353:1245–51. doi:10.1056/NEJMoa044194.
- [134] Rubinstein E. *Staphylococcus aureus* bacteraemia with known sources. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32 Suppl 1:S18–20. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.06.006.
- [135] Nourse C, Starr M, Munckhof W. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causes severe disseminated infection and deep venous thrombosis in children: literature review and recommendations for management. *J Paediatr Child Health* 2007;43:656–61. doi:10.1111/j.1440-1754.2007.01153.x.
- [136] Ruiz ME, Yohannes S, Wladyka CG. Pyomyositis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 2005;352:1488–9. doi:10.1056/NEJM200504073521417.
- [137] Gelfand MS, Cleveland KO, Heck RK, Goswami R. Pathological fracture in acute osteomyelitis of long bones secondary to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: two cases and review of the literature. *Am J Med Sci* 2006;332:357–60.
- [138] Kourbatova EV, Halvosa JS, King MD, Ray SM, White N, Blumberg HM. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as a cause of health care-associated infections among patients with prosthetic joint infections. *Am J Infect Control* 2005;33:385–91. doi:10.1016/j.ajic.2005.06.006.
- [139] Chua T, Moore CL, Perri MB, Donabedian SM, Masch W, Vager D, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates in urban Detroit. *J Clin Microbiol* 2008;46:2345–52. doi:10.1128/JCM.00154-08.

- [140] Millar BC, Prendergast BD, Moore JE. Community-associated MRSA (CA-MRSA): an emerging pathogen in infective endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1–7. doi:10.1093/jac/dkm410.
- [141] Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA J Am Med Assoc* 2007;298:1763–71. doi:10.1001/jama.298.15.1763.
- [142] Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2008;46:787–94. doi:10.1086/528716.
- [143] Boyce JM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of health care-associated infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2008;46:795–8. doi:10.1086/528717.
- [144] Saiman L, O’Keefe M, Graham PL 3rd, Wu F, Saïd-Salim B, Kreiswirth B, et al. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2003;37:1313–9. doi:10.1086/379022.
- [145] Gonzalez BE, Rueda AM, Shelburne SA 3rd, Musher DM, Hamill RJ, Hulten KG. Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as the cause of healthcare-associated infection. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 2006;27:1051–6. doi:10.1086/507923.
- [146] Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2006;42:647–56. doi:10.1086/499815.
- [147] Benoit SR, Estivariz C, Mogdasy C, Pedreira W, Galiana A, Galiana A, et al. Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002–2004. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1216–23. doi:10.3201/eid1408.071183.
- [148] Park SH, Park C, Yoo J-H, Choi S-M, Choi J-H, Shin H-H, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated bloodstream infections in Korea. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 2009;30:146–55. doi:10.1086/593953.
- [149] Webb GF, Horn MA, D’Agata EMC, Moellering RC Jr, Ruan S. Competition of hospital-acquired and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in hospitals. *J Biol Dyn* 2010;4:115–29. doi:10.1080/17513750903026411.
- [150] David MD, Kearns AM, Gossain S, Ganner M, Holmes A. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nosocomial transmission in a neonatal unit. *J Hosp Infect* 2006;64:244–50. doi:10.1016/j.jhin.2006.06.022.
- [151] Linde H, Wagenlehner F, Strommenger B, Drubel I, Tanzer J, Reischl U, et al. Healthcare-associated outbreaks and community-acquired infections due to MRSA carrying the Panton-Valentine leucocidin gene in southeastern Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2005;24:419–22. doi:10.1007/s10096-005-1341-7.
- [152] Sax H, Posfay-Barbe K, Harbarth S, Francois P, Touveneau S, Pessoa-Silva CL, et al. Control of a cluster of community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatology. *J Hosp Infect* 2006;63:93–100. doi:10.1016/j.jhin.2005.11.016.
- [153] Davis SL, Rybak MJ, Amjad M, Kaatz GW, McKinnon PS. Characteristics of patients with healthcare-associated infection due to SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 2006;27:1025–31. doi:10.1086/507918.

- [154] Huang H, Flynn NM, King JH, Monchaud C, Morita M, Cohen SH. Comparisons of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and hospital-associated MRSA infections in Sacramento, California. *J Clin Microbiol* 2006;44:2423–7. doi:10.1128/JCM.00254-06.
- [155] Pittet D, Dharan S, Touvneau S, Sauvan V, Perneger TV. Bacterial contamination of the hands of hospital staff during routine patient care. *Arch Intern Med* 1999;159:821–6.
- [156] Scanvic A, Denic L, Gaillon S, Giry P, Andremont A, Lucet JC. Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2001;32:1393–8. doi:10.1086/320151.
- [157] Fitzgerald JR. Human Origin for Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio* 2012;3:e00082–12. doi:10.1128/mBio.00082-12.
- [158] Armand-Lefevre L, Ruimy R, Andremont A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis* 2005;11:711–4. doi:10.3201/eid1105.040866.
- [159] Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1965–6. doi:10.3201/eid1112.050428.
- [160] Van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, de Neeling A, van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1834–9. doi:10.3201/eid1312.070384.
- [161] Graveland H, Duim B, van Duijkeren E, Heederik D, Wagenaar JA. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *Int J Med Microbiol IJMM* 2011;301:630–4. doi:10.1016/j.ijmm.2011.09.004.
- [162] Rasigade J-P, Laurent F, Hubert P, Vandenesch F, Etienne J. Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1330. doi:10.3201/eid1608.100317.
- [163] Graveland H, Wagenaar JA, Bergs K, Heesterbeek H, Heederik D. Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact. *PloS One* 2011;6:e16830. doi:10.1371/journal.pone.0016830.
- [164] Brown K. Penicillin man: Alexander Fleming and the antibiotic revolution. Stroud, Gloucestershire: Sutton Pub.; 2004.
- [165] OMS. [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_210\\_fre.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_210_fre.pdf).  
[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_210\\_fre.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_210_fre.pdf) 2001.  
[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_210\\_fre.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_210_fre.pdf) (accessed June 12, 2014).
- [166] Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. *Antibiogramme*. Paris: Eska; 2006.
- [167] O’Neil MJ. *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 14th ed. Whitehouse Station, N.J: Merck; 2006.
- [168] Patel JB, Gorwitz RJ, Jernigan JA. Mupirocin resistance. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2009;49:935–41. doi:10.1086/605495.
- [169] Asseray N, Caillon J, Roux N, Jacqueline C, Bismuth R, Kergueris MF, et al. Different aminoglycoside-resistant phenotypes in a rabbit *Staphylococcus aureus* endocarditis infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1591–3.
- [170] Suárez JE, Mendoza MC. Plasmid-encoded fosfomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:791–5.
- [171] Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:781–91.
- [172] Daurel C, Leclercq R. L’antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Rev Francoph Lab* 2008;2008:81–90. doi:10.1016/S1773-035X(08)74870-6.

- [173] Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 2014. doi:10.1016/j.tim.2014.04.007.
- [174] Ferrero L, Cameron B, Crouzet J. Analysis of *gyrA* and *grlA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1554–8.
- [175] Wang J-L, Tang H-J, Hsieh P-H, Chiu F-Y, Chen Y-H, Chang M-C, et al. Fusidic acid for the treatment of bone and joint infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:103–7. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.03.010.
- [176] Périchon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4580–7. doi:10.1128/AAC.00346-09.
- [177] Crossley KB. *Staphylococci in human disease*. 2nd ed. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010.
- [178] Wu G, Abraham T, Rapp J, Vastey F, Saad N, Balmir E. Daptomycin: evaluation of a high-dose treatment strategy. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:192–6. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.03.006.
- [179] Gallon O, Guillet-Caruba C, Lamy B, Laurent F, Doucet-Populaire F, Decousser J-W, et al. In vitro activity of daptomycin against *Staphylococci* isolated from bacteremia and community-onset skin and soft tissue infections in France: data from two nationwide studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2009;28:1209–15. doi:10.1007/s10096-009-0764-y.
- [180] Vaubourdolle M. *Infectiologie*. Rueil-Malmaison: Wolters Kluwer; 2007.
- [181] Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2002;34:482–92. doi:10.1086/324626.
- [182] Ross JE, Farrell DJ, Mendes RE, Sader HS, Jones RN. Eight-year (2002-2009) summary of the linezolid (Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum; ZAAPS) program in European countries. *J Chemother Florence Italy* 2011;23:71–6. doi:10.1179/joc.2011.23.2.71.
- [183] Kasten MJ. Clindamycin, metronidazole, and chloramphenicol. *Mayo Clin Proc* 1999;74:825–33. doi:10.4065/74.8.825.
- [184] Stettler R, Trampuz A. [The “second life” of rifampicin]. *Rev Médicale Suisse* 2014;10:670–2.
- [185] Byrne ME, Gillespie MT, Skurray RA. 4',4'' adenylyltransferase activity on conjugative plasmids isolated from *Staphylococcus aureus* is encoded on an integrated copy of pUB110. *Plasmid* 1991;25:70–5.
- [186] Lelièvre H, Lina G, Jones ME, Olive C, Forey F, Roussel-Delvallez M, et al. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. *J Clin Microbiol* 1999;37:3452–7.
- [187] Kaase M, Lenga S, Friedrich S, Szabados F, Sakinc T, Kleine B, et al. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2008;14:614–6. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.01997.x.
- [188] Gennimata D, Davies J, Tsiftoglou AS. Bleomycin resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:65–75.
- [189] Projan SJ, Novick R. Comparative analysis of five related *Staphylococcal* plasmids. *Plasmid* 1988;19:203–21.

- [190] Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1156–63. doi:10.1128/AAC.50.4.1156-1163.2006.
- [191] Tennent JM, Young HK, Lyon BR, Amyes SG, Skurray RA. Trimethoprim resistance determinants encoding a dihydrofolate reductase in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Med Microbiol* 1988;26:67–73.
- [192] Otsuka T, Zaraket H, Takano T, Saito K, Dohmae S, Higuchi W, et al. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2007;13:325–7. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01632.x.
- [193] Jappe U, Heuck D, Strommenger B, Wendt C, Werner G, Altmann D, et al. *Staphylococcus aureus* in dermatology outpatients with special emphasis on community-associated methicillin-resistant strains. *J Invest Dermatol* 2008;128:2655–64. doi:10.1038/jid.2008.133.
- [194] De Oliveira NEM, Cavalcanti EDC, Laport MS, Bastos M do C de F, Giambiagi-deMarval M. Constitutive expression of the *ileS-2* gene responsible for high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 2009;58:1582–4. doi:10.1099/jmm.0.013912-0.
- [195] Matsuoka M, Endou K, Kobayashi H, Inoue M, Nakajima Y. A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:221–7.
- [196] Antonio M, McFerran N, Pallen MJ. Mutations affecting the Rossman fold of isoleucyl-tRNA synthetase are correlated with low-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:438–42.
- [197] Projan SJ, Moghazeh S, Novick RP. Nucleotide sequence of pS194, a streptomycin-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 1988;16:2179–87.
- [198] Trzcinski K, Cooper BS, Hryniewicz W, Dowson CG. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:763–70.
- [199] Korczynska M, Mukhtar TA, Wright GD, Berghuis AM. Structural basis for streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* by virginiamycin B lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:10388–93. doi:10.1073/pnas.0701809104.
- [200] Kadlec K, Schwarz S. Novel ABC transporter gene, *vga(C)*, located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3589–91. doi:10.1128/AAC.00570-09.
- [201] Mukhtar TA, Koteva KP, Hughes DW, Wright GD. Vgb from *Staphylococcus aureus* inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism not hydrolysis. *Biochemistry (Mosc)* 2001;40:8877–86.
- [202] Byrne ME, Rouch DA, Skurray RA. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene* 1989;81:361–7.
- [203] Rowland SJ, Dyke KG. Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1990;4:961–75.
- [204] Westh H, Hougaard DM, Vuust J, Rosdahl VT. Prevalence of *erm* gene classes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated between 1959 and 1988. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:369–73.
- [205] Bismuth R, Zilhao R, Sakamoto H, Guesdon JL, Courvalin P. Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1611–4.

- [206] Holden MTG, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NPJ, Enright MC, et al. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9786–91. doi:10.1073/pnas.0402521101.
- [207] Girou E, Pujade G, Legrand P, Cizeau F, Brun-Buisson C. Selective screening of carriers for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in high-risk hospital areas with a high level of endemic MRSA. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1998;27:543–50.
- [208] Lucet J-C, Chevret S, Durand-Zaleski I, Chastang C, Régnier B, Multicenter Study Group. Prevalence and risk factors for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to the intensive care unit: results of a multicenter study. *Arch Intern Med* 2003;163:181–8.
- [209] Lucet J-C, Grenet K, Armand-Lefevre L, Harnal M, Bouvet E, Regnier B, et al. High prevalence of carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission in elderly patients: implications for infection control strategies. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 2005;26:121–6. doi:10.1086/502514.
- [210] Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Kotilainen P, Scotford R, Siren E, Vuopio-Varkila J. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2000;19:101–7.
- [211] Verhoef J, Beaujean D, Blok H, Baars A, Meyler A, van der Werken C, et al. A Dutch approach to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 1999;18:461–6.
- [212] Buck JM, Como-Sabetti K, Harriman KH, Danila RN, Boxrud DJ, Glennen A, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Minnesota, 2000–2003. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1532–8. doi:10.3201/eid1110.050141.
- [213] Boyce JM, Opal SM, Potter-Bynoe G, Medeiros AA. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a hospital after exposure to a health care worker with chronic sinusitis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1993;17:496–504.
- [214] Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 2003;24:362–86. doi:10.1086/502213.
- [215] Cooper BS, Stone SP, Kibbler CC, Cookson BD, Roberts JA, Medley GF, et al. Isolation measures in the hospital management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): systematic review of the literature. *BMJ* 2004;329:533. doi:10.1136/bmj.329.7465.533.
- [216] Grundmann H, Hori S, Winter B, Tami A, Austin DJ. Risk factors for the transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an adult intensive care unit: fitting a model to the data. *J Infect Dis* 2002;185:481–8. doi:10.1086/338568.
- [217] Bartzokas CA, Paton JH, Gibson MF, Graham F, McLoughlin GA, Croton RS. Control and eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on a surgical unit. *N Engl J Med* 1984;311:1422–5. doi:10.1056/NEJM198411293112207.
- [218] Locksley RM, Cohen ML, Quinn TC, Tompkins LS, Coyle MB, Kirihara JM, et al. Multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction, transmission, and evolution of nosocomial infection. *Ann Intern Med* 1982;97:317–24.
- [219] Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, Mourouga P, Sauvan V, Touveneau S, et al. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. Infection Control Programme. *Lancet* 2000;356:1307–12.
- [220] Jarlier V, Trystram D, Brun-Buisson C, Fournier S, Carbonne A, Marty L, et al. Curbing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French hospitals through a 15-year

- institutional control program. *Arch Intern Med* 2010;170:552–9. doi:10.1001/archinternmed.2010.32.
- [221] Boyce JM, Potter-Bynoe G, Chenevert C, King T. Environmental Contamination Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Possible Infection Control Implications. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:622–7. doi:10.2307/30141488.
- [222] French GL, Otter JA, Shannon KP, Adams NMT, Watling D, Parks MJ. Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. *J Hosp Infect* 2004;57:31–7. doi:10.1016/j.jhin.2004.03.006.
- [223] Garner JS. Guideline for isolation precautions in hospitals. The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 1996;17:53–80.
- [224] Courcol R. Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale? *Rev Francoph Lab* 2009;2009:61–4. doi:10.1016/S1773-035X(09)70251-5.
- [225] McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, Snook LA, Nagle E, Mulvey MR, et al. Development of a triplex real-time PCR assay for detection of Panton-Valentine leukocidin toxin genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005;43:6147–9. doi:10.1128/JCM.43.12.6147-6149.2005.
- [226] Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1999;37:3556–63.
- [227] Armand-Lefevre L, Buke C, Ruppe E, Barbier F, Lolom I, Andremont A, et al. Secular trends and dynamics of hospital associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2010;16:1435–41. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03138.x.
- [228] Sullivan CB, Diggle MA, Clarke SC. Multilocus sequence typing: Data analysis in clinical microbiology and public health. *Mol Biotechnol* 2005;29:245–54. doi:10.1385/MB:29:3:245.
- [229] Parneix P, Stingre, Didier. Les infections nosocomiales et associées aux soins. Bordeaux: les Études hospitalières; 2010.
- [230] European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2010. Stockholm: ECDC; 2011.
- [231] Brumfitt W, Hamilton-Miller JM. The worldwide problem of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exp Clin Res* 1990;16:205–14.
- [232] Ray GT, Suaya JA, Baxter R. Trends and Characteristics of Culture-Confirmed *Staphylococcus aureus* Infections in a Large U.S. Integrated Health Care Organization. *J Clin Microbiol* 2012;50:1950–7. doi:10.1128/JCM.00134-12.
- [233] Williamson DA, Lim A, Thomas MG, Baker MG, Roberts SA, Fraser JD, et al. Incidence, trends and demographics of *Staphylococcus aureus* infections in Auckland, New Zealand, 2001–2011. *BMC Infect Dis* 2013;13:569. doi:10.1186/1471-2334-13-569.
- [234] Jacobsson G, Dashti S, Wahlberg T, Andersson R. The epidemiology of and risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections in western Sweden. *Scand J Infect Dis* 2007;39:6–13. doi:10.1080/00365540600810026.

- [235] Health Protection Scotland. NHS Scotland MRSA Screening Pathfinder Programme Final Report Volume 1: An investigation of the Clinical Effectiveness of MRSA Screening 2011. 2011.
- [236] Al-Talib H, Yean C, Al-Jashmya K, Hasan H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infection trends in Hospital Universiti Sains Malaysia during 2002-2007. *Ann Saudi Med* 2010;0:0. doi:10.4103/0256-4947.67077.
- [237] Khalifa RA, Hamdy MS, Heweidy EI. A multidisciplinary program using World Health Organization observation forms to measure the improvement in hand hygiene compliance in burn unit. *Life Sci J* 2011;763–90.
- [238] Carbonne A, Arnaud I, Maugat S, Marty N, Dumartin C, Bertrand X, et al. National multidrug-resistant bacteria (MDRB) surveillance in France through the RAISIN network: a 9 year experience. *J Antimicrob Chemother* 2012. doi:10.1093/jac/dks464.
- [239] Jain R, Kralovic SM, Evans ME, Ambrose M, Simbartl LA, Obrosky DS, et al. Veterans Affairs Initiative to Prevent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med* 2011;364:1419–30. doi:10.1056/NEJMoa1007474.
- [240] Adriaenssens N, Coenen S, Versporten A, Muller A, Vankerckhoven V, Goossens H, et al. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): quality appraisal of antibiotic use in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:vi71–7. doi:10.1093/jac/dkr459.
- [241] Jesús Rodríguez-Baño M PhD, Lola García R, Encarnación Ramírez M PhD, Carmen Lupión R, Miguel A. Muniain M PhD, Carmen Velasco P, et al. Long-Term Control of Endemic Hospital-Wide Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): The Impact of Targeted Active Surveillance for MRSA in Patients and Healthcare Workers •. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:786–95. doi:10.1086/653025.
- [242] Jurke A, Köck R, Becker K, Thole S, Hendrix R. Reduction of the nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* incidence density by a region-wide search and follow-strategy in forty German hospitals of the EUREGIO, 2009 to 2011. *Euro Surveill* 2012;18.
- [243] HISWA. Healthcare Infection Surveillance Western Australia Quarterly Aggregate Report 2013.
- [244] Lee Y-T, Tsao S-M, Lin H-C, Huang H-J, Lee M-C, Hsueh P-R. Decline in the incidence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) correlates with decreased antimicrobial consumption at a tertiary care hospital in Taiwan, 2001–2009. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:523–30. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.07.014.
- [245] Public Health Agency of Canada. Antimicrobial resistant organisms (ARO) surveillance: surveillance report for data from January 1, 2007 to December 31, 2011. 2013.
- [246] Rahal K, Belouni R, Tali-Maamar H, Boudouane M. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 2012.
- [247] Mesrati I, Saïdani M, Ennigrou S, Zouari B, Ben Redjeb S. Clinical isolates of Pantone-Valentine leucocidin- and gamma-haemolysin-producing *Staphylococcus aureus*: prevalence and association with clinical infections. *J Hosp Infect* 2010;75:265–8.
- [248] Zriouil SB, Bekkali M, Zerouali K. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage at the Ibn Rochd University Hospital Center, Casablanca, Morocco. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis* 2012;16:279–83.
- [249] Randrianirina F, Soares J-L, Ratsima E, Carod J-F, Combe P, Grosjean P, et al. In vitro activities of 18 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from the Institut Pasteur of Madagascar. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007;6:5. doi:10.1186/1476-0711-6-5.

- [250] Saied T, Elkholy A, Hafez SF, Basim H, Wasfy MO, El-Shoubary W, et al. Antimicrobial resistance in pathogens causing nosocomial bloodstream infections in university hospitals in Egypt. *Am J Infect Control* 2011;39:e61–5. doi:10.1016/j.ajic.2011.04.009.
- [251] Seydi M, Sow AI, Soumaré M, Diallo HM, Hatim B, Tine R, et al. [Staphylococcus aureus bacteremia in the Dakar Fann University Hospital]. *Médecine Mal Infect* 2004;34:210–5.
- [252] Shittu A, Oyedara O, Abegunrin F, Okon K, Raji A, Taiwo S, et al. Characterization of methicillin-susceptible and -resistant staphylococci in the clinical setting: a multicentre study in Nigeria. *BMC Infect Dis* 2012;12:286. doi:10.1186/1471-2334-12-286.
- [253] European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2012. Stockholm: ECDC; 2013.
- [254] European Union, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union, European Medicines Agency. The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and development of new antibacterial agents. Luxembourg: EUR-OP; 2009.
- [255] Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP, Banerjee S, Henderson TS, Tolson JS, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 1992;13:582–6.
- [256] Kock R, Mellmann A, Schaumburg F, Friedrich AW, Kipp F, Becker K. The Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108:761–7. doi:10.3238/arztebl.2011.0761.
- [257] Goossens H, Coenen S, Costers M, S DC. Achievements of the Belgian Antibiotic Policy Coordination Committee (BAPCOC) 2008. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19036> (accessed June 3, 2014).
- [258] Health Protection Agency (HPA). Healthcare-associated Infections in England: 2008-2009 Report. London:HPA; 2009.
- [259] McGowan JE, Barnes MW, Finland M. Bacteremia at Boston City Hospital: Occurrence and Mortality during 12 Selected Years (1935-1972), with Special Reference to Hospital-Acquired Cases. *J Infect Dis* 1975;132:316–35. doi:10.1093/infdis/132.3.316.
- [260] Bone RC. TOward an epidemiology and natural history of sirs (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 1992;268:3452–5. doi:10.1001/jama.1992.03490240060037.
- [261] Offner PJ, Moore EE, Biffl WL. MAle gender is a risk factor for major infections after surgery. *Arch Surg* 1999;134:935–40. doi:10.1001/archsurg.134.9.935.
- [262] Bradley SF. Staphylococcus aureus infections and antibiotic resistance in older adults. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2002;34:211–6. doi:10.1086/338150.
- [263] Gray JW. MRSA: the problem reaches paediatrics. *Arch Dis Child* 2004;89:297–8.
- [264] Adedeji A, Weller TMA, Gray JW. MRSA in children presenting to hospitals in Birmingham, UK. *J Hosp Infect* 2007;65:29–34. doi:10.1016/j.jhin.2006.09.024.
- [265] Graham PL 3rd, Lin SX, Larson EL. A U.S. population-based survey of Staphylococcus aureus colonization. *Ann Intern Med* 2006;144:318–25.
- [266] Cruse PJ, Foord R. The epidemiology of wound infection. A 10-year prospective study of 62,939 wounds. *Surg Clin North Am* 1980;60:27–40.
- [267] Itani KMF, Merchant S, Lin S-J, Akhras K, Alandete JC, Hatoum HT. Outcomes and management costs in patients hospitalized for skin and skin-structure infections. *Am J Infect Control* 2011;39:42–9. doi:10.1016/j.ajic.2010.03.018.

- [268] Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med* 2005;352:1436–44. doi:10.1056/NEJMoa043252.
- [269] Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Everett ED, Dellinger P, Goldstein EJC, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2005;41:1373–406. doi:10.1086/497143.
- [270] Duong M, Markwell S, Peter J, Barenkamp S. Randomized, Controlled Trial of Antibiotics in the Management of Community-Acquired Skin Abscesses in the Pediatric Patient. *Ann Emerg Med* 2010;55:401–7. doi:10.1016/j.annemergmed.2009.03.014.
- [271] Frei CR, Makos BR, Daniels KR, Oramasionwu CU. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections as a common cause of hospitalization in United States children. *J Pediatr Surg* 2010;45:1967–74. doi:10.1016/j.jpedsurg.2010.05.009.
- [272] Moet GJ, Jones RN, Biedenbach DJ, Stilwell MG, Fritsche TR. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:7–13. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.05.009.
- [273] Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA J Am Med Assoc* 2003;290:2976–84. doi:10.1001/jama.290.22.2976.
- [274] Lipsky BA, Tabak YP, Johannes RS, Vo L, Hyde L, Weigelt JA. Skin and soft tissue infections in hospitalised patients with diabetes: culture isolates and risk factors associated with mortality, length of stay and cost. *Diabetologia* 2010;53:914–23. doi:10.1007/s00125-010-1672-5.
- [275] Lipsky BA. Medical treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2004;39 Suppl 2:S104–14. doi:10.1086/383271.
- [276] Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, et al. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2004;39:885–910. doi:10.1086/424846.
- [277] Nather A, Bee CS, Huak CY, Chew JLL, Lin CB, Neo S, et al. Epidemiology of diabetic foot problems and predictive factors for limb loss. *J Diabetes Complications* 2008;22:77–82. doi:10.1016/j.jdiacomp.2007.04.004.
- [278] Stanaway S, Johnson D, Moulik P, Gill G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation from diabetic foot ulcers correlates with nasal MRSA carriage. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;75:47–50. doi:10.1016/j.diabres.2006.05.021.
- [279] Tentolouris N, Petrikkos G, Vallianou N, Zachos C, Daikos GL, Tsapogas P, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in infected and uninfected diabetic foot ulcers. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2006;12:186–9. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01279.x.
- [280] Vardakas KZ, Horianopoulou M, Falagas ME. Factors associated with treatment failure in patients with diabetic foot infections: An analysis of data from randomized controlled trials. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;80:344–51. doi:10.1016/j.diabres.2008.01.009.
- [281] Crawford SE, David MZ, Glikman D, King KJ, Boyle-Vavra S, Daum RS. Clinical importance of purulence in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *J Am Board Fam Med JABFM* 2009;22:647–54. doi:10.3122/jabfm.2009.06.090025.
- [282] Rennie RP, Jones RN, Mutnick AH, SENTRY Program Study Group (North America). Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of pathogens isolated from skin and

- soft tissue infections: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45:287–93.
- [283] Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, Fowler VG, Bronstein MZ, Trivette SL, et al. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2003;36:592–8. doi:10.1086/367653.
- [284] Kaye KS, Engemann JJ, Mozaffari E, Carmeli Y. Reference group choice and antibiotic resistance outcomes. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1125–8. doi:10.3201/eid1006.020665.
- [285] Klein E, Smith DL, Laxminarayan R. Hospitalizations and Deaths Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1840–6. doi:10.3201/eid1312.070629.
- [286] Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;50:59–69. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2004.05.003.
- [287] Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med* 2002;162:2229–35.
- [288] Turnidge JD, Kotsanas D, Munckhof W, Roberts S, Bennett CM, Nimmo GR, et al. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a major cause of mortality in Australia and New Zealand. *Med J Aust* 2009;191:368–73.
- [289] Wyllie DH, Crook DW, Peto TEA. Mortality after *Staphylococcus aureus* bacteraemia in two hospitals in Oxfordshire, 1997–2003: cohort study. *BMJ* 2006;333:281. doi:10.1136/bmj.38834.421713.2F.
- [290] Mitchell BG, Collignon PJ, McCann R, Wilkinson IJ, Wells A. A Major Reduction in Hospital-Onset *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Australia–12 Years of Progress: An Observational Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2014;59:969–75. doi:10.1093/cid/ciu508.
- [291] Health Protection Agency. Financial year counts and rates of MRSA bacteraemia by NHS Acute Trust (FY 2008/09–FY 2012/13). 2012.
- [292] Lawes T, Edwards B, López-Lozano J-M, Gould I. Trends in *Staphylococcus aureus* bacteraemia and impacts of infection control practices including universal MRSA admission screening in a hospital in Scotland, 2006–2010: retrospective cohort study and time-series intervention analysis. *BMJ Open* 2012;2. doi:10.1136/bmjopen-2011-000797.
- [293] Kallen AJ, Mu Y, Bulens S, et al. Health care–associated invasive mrsa infections, 2005–2008. *JAMA* 2010;304:641–7. doi:10.1001/jama.2010.1115.
- [294] EARSS. European Antimicrobial Resistance Surveillance System database. 2008.
- [295] Khairulddin N, Bishop L, Lamagni TL, Sharland M, Duckworth G. Emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia among children in England and Wales, 1990–2001. *Arch Dis Child* 2004;89:378–9.
- [296] Wisplinghoff H, Seifert H, Tallent SM, Bischoff T, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:686–91. doi:10.1097/01.inf.0000078159.53132.40.
- [297] Burke RE, Halpern MS, Baron EJ, Gutierrez K. Pediatric and neonatal *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, risk factors, and outcome. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 2009;30:636–44. doi:10.1086/597521.

- [298] Cotton MF, Burger PJ, Bodenstern WJ. Bacteraemia in children in the south-western Cape. A hospital-based survey. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneesk* 1992;81:87–90.
- [299] Davis WG, White CE. Cloxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a children's hospital. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneesk* 1974;48:1341–4.
- [300] Naidoo R, Nuttall J, Whitelaw A, Eley B. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Bacteraemia at a Tertiary Children's Hospital in Cape Town, South Africa. *PLoS ONE* 2013;8:e78396. doi:10.1371/journal.pone.0078396.
- [301] Awad SS, Elhabash SI, Lee L, Farrow B, Berger DH. Increasing incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections: reconsideration of empiric antimicrobial therapy. *Am J Surg* 2007;194:606–10. doi:10.1016/j.amjsurg.2007.07.016.
- [302] Mastouri M, Nour M, Ben Nejma M, Bouallegue O, Hammami M, Khedher M. Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline : détection des premières souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides en Tunisie. *Pathol Biol* 2006;54:33–6. doi:10.1016/j.patbio.2004.10.009.
- [303] Soraa N, Tali A, Addebous A, Zahlane K, Bouskraoui M, Chabaa L. Epidémiologie et résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* dans un hôpital pédiatrique au CHU de Marrakech. *J Biol Médicale* 2012;Avri 2012:39–43.
- [304] ONERBA. Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) : rapport d'activité 2009-10. 2011.
- [305] Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy M-E, Lina G, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1083–5. doi:10.1128/AAC.50.3.1083-1085.2006.
- [306] Belabbès H, Elmdaghri N, Hachimi K, Marih L, Zerouali K, Benbachir M. Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* isolé des infections communautaires et hospitalières à Casablanca. *Médecine Mal Infect* 2001;31:25–8. doi:10.1016/S0399-077X(01)00165-2.
- [307] Ben jema Z, Mahjoubi F, Ben Haj H'mida Y, Hammami N, Ben Ayed M, Hammami A. Profil bactériologique des bactériémies et sensibilité aux antibiotiques des bactéries en cause dans la région de Sfax (1993–1998). *Pathol Biol* 2004;52:82–8. doi:10.1016/j.patbio.2003.04.003.
- [308] Buzaid N, Elzouki A-N, Taher I, Ghenghesh KS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a tertiary surgical and trauma hospital in Benghazi, Libya. *J Infect Dev Ctries* 2011;5:723–6.
- [309] Bordon J, Master RN, Clark RB, Duvvuri P, Karlowsky JA, Ayesu K, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistance to non-beta-lactam antimicrobials in the United States from 1996 to 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67:395–8. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.03.006.
- [310] Fayomi O D, Oyediran E I,O, Adeyemo A T, Oyekale O T. Prevalence And Antibiotic Resistance Pattern Of Methicillin-Resistance *Staphylococcus Aureus* Among In-Patients At A Tertiary Health Facility In Ido-Ekiti, Nigeria. *Internet J Lab Med* 4 2011.
- [311] Abera B, Alem A, Bezabih B. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcus from clinical isolates at Felege Hiwot Referral Hospital, North West Ethiopia. *Ethiop Med J* 2008;46:149–54.
- [312] Mshana SE, Kamugisha E, Miramb M, Chalya P, Rambau P, Mahalu W, et al. Prevalence of clindamycin inducible resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

- at Bugando Medical Centre, Mwanza, Tanzania. *Tanzan J Health Res* 2009;11. doi:10.4314/thrb.v11i2.45197.
- [313] Shittu AO, Lin J. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. *BMC Infect Dis* 2006;6:125. doi:10.1186/1471-2334-6-125.
- [314] Elhamzaoui S, Benouda A, Allali F, Abouqual R, Elouennass M. [Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated in two university hospitals in Rabat, Morocco]. *Médecine Mal Infect* 2009;39:891–5. doi:10.1016/j.medmal.2009.01.004.
- [315] Nwankwo EO, Nasiru MS. Antibiotic sensitivity pattern of *Staphylococcus aureus* from clinical isolates in a tertiary health institution in Kano, Northwestern Nigeria. *Pan Afr Med J* 2011;8:4.
- [316] Sarma JB, Ahmed GU. Characterisation of methicillin resistant *S. aureus* strains and risk factors for acquisition in a teaching hospital in northeast India. *Indian J Med Microbiol* 2010;28:127–9. doi:10.4103/0255-0857.62489.
- [317] Weber SG, Gold HS, Hooper DC, Karchmer AW, Carmeli Y. Fluoroquinolones and the Risk for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitalized Patients<sup>1</sup>. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1415–22. doi:10.3201/eid0911.030284.
- [318] Brink A, Moolman J, da Silva MC, Botha M, National Antibiotic Surveillance Forum. Antimicrobial susceptibility profile of selected bacteraemic pathogens from private institutions in South Africa. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneesk* 2007;97:273–9.
- [319] Goldberg E, Paul M, Talker O, Samra Z, Raskin M, Hazzan R, et al. Co-trimoxazole versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a retrospective cohort study. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1779–83. doi:10.1093/jac/dkq179.
- [320] Tsuji BT, Rybak MJ, Cheung CM, Amjad M, Kaatz GW. Community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a comparison of molecular epidemiology and antimicrobial activities of various agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58:41–7. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.10.021.
- [321] Loomba PS, Taneja J, Mishra B. Methicillin and Vancomycin Resistant *S. aureus* in Hospitalized Patients. *J Glob Infect Dis* 2010;2:275–83. doi:10.4103/0974-777X.68535.
- [322] Micek ST. Alternatives to Vancomycin for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Clin Infect Dis* 2007;45:S184–90. doi:10.1086/519471.
- [323] Brady JM, Stemper ME, Weigel A, Chyou P-H, Reed KD, Shukla SK. Sporadic “transitional” community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from health care facilities in the United States. *J Clin Microbiol* 2007;45:2654–61. doi:10.1128/JCM.02579-06.
- [324] Otter JA, French GL. Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 2006;6:753–5. doi:10.1016/S1473-3099(06)70636-3.
- [325] Ali H, Nash JQ, Kearns AM, Pichon B, Vasu V, Nixon Z, et al. Outbreak of a South West Pacific clone Panton-Valentine leucocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a UK neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2012;80:293–8. doi:10.1016/j.jhin.2011.12.019.
- [326] Sanchini A, Spitoni MG, Monaco M, Raglio A, Grigis A, Petrò W, et al. Outbreak of skin and soft tissue infections in a hospital newborn nursery in Italy due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *J Hosp Infect* 2013;83:36–40. doi:10.1016/j.jhin.2012.09.017.

- [327] DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* 2010;375:1557–68. doi:10.1016/S0140-6736(09)61999-1.
- [328] Nimmo GR, Coombs GW, Pearson JC, O'Brien FG, Christiansen KJ, Turnidge JD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. *Med J Aust* 2006;184:384–8.
- [329] Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (pvl) reveal that pvl is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *J Clin Microbiol* 2007;45:2554–63. doi:10.1128/JCM.00245-07.
- [330] Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Tan J, Conly JM. Coexistence of Panton-Valentine leukocidin-positive and -negative community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA400 sibling strains in a large Canadian health-care region. *J Infect Dis* 2008;197:195–204. doi:10.1086/523763.
- [331] Hanssen A-M, Fossum A, Mikalsen J, Halvorsen DS, Bukholm G, Sollid JUE. Dissemination of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in Northern Norway: Sequence Types 8 and 80 Predominate. *J Clin Microbiol* 2005;43:2118–24. doi:10.1128/JCM.43.5.2118-2124.2005.
- [332] Larsen AR, Skov RL, Jarlier V, Henriksen AS. Epidemiological differences between the UK and Ireland versus France in *Staphylococcus aureus* isolates resistant to fusidic acid from community-acquired skin and soft tissue infections. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:589–94. doi:10.1093/jac/dkm532.
- [333] Kardas-Sloma L, Boëlle PY, Opatowski L, Brun-Buisson C, Guillemot D, Temime L. Impact of antibiotic exposure patterns on selection of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital settings. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4888–95. doi:10.1128/AAC.01626-10.
- [334] Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:629–41. doi:10.1038/nrmicro2200.
- [335] Djoudi F, Bonura C, Benallaoua S, Touati A, Touati D, Aleo A, et al. Panton-Valentine leukocidin positive sequence type 80 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a staphylococcal cassette chromosome mec type IVc is dominant in neonates and children in an Algiers hospital. *New Microbiol* 2013;36:49–55.
- [336] Hadjihannas L, Psychogiou M, Empel J, Kosmidis C, Goukos D, Bouzala J, et al. Molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonizing surgical patients in Greece. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;74:420–2. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.012.
- [337] Enany S, Yaoita E, Yoshida Y, Enany M, Yamamoto T. Molecular characterization of Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Egypt. *Microbiol Res* 2010;165:152–62. doi:10.1016/j.micres.2009.03.005.
- [338] Khalil W, Hashwa F, Shihabi A, Tokajian S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80-IV clone in children from Jordan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:228–30. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.03.012.
- [339] Sonnevend Á, Blair I, Alkaabi M, Jumaa P, Al Haj M, Ghazawi A, et al. Change in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones at a tertiary care hospital in the United Arab Emirates over a 5-year period. *J Clin Pathol* 2012;65:178–82. doi:10.1136/jclinpath-2011-200436.

- [340] Tokajian ST, Khalil PA, Jabbour D, Rizk M, Farah MJ, Hashwa FA, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in Lebanon. *Epidemiol Infect* 2010;138:707–12. doi:10.1017/S0950268810000440.
- [341] Cookson BD, Phillips I. Epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1988;21:57–65. doi:10.1093/jac/21.suppl\_C.57.
- [342] Dubin DT, Chikramane SG, Inglis B, Matthews PR, Stewart PR. Physical mapping of the *mec* region of an Australian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage and a closely related American strain. *J Gen Microbiol* 1992;138:169–80. doi:10.1099/00221287-138-1-169.
- [343] Pavillard R, Harvey K, Douglas D, Hewstone A, Andrew J, Collopy B, et al. Epidemic of hospital-acquired infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in major Victorian hospitals. *Med J Aust* 1982;1:451–4.
- [344] Aires de Sousa M, Sanches IS, Ferro ML, Vaz MJ, Saraiva Z, Tendeiro T, et al. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Clin Microbiol* 1998;36:2590–6.
- [345] Aires De Sousa M, Miragaia M, Sanches IS, Avila S, Adamson I, Casagrande ST, et al. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J Clin Microbiol* 2001;39:2197–205. doi:10.1128/JCM.39.6.2197-2205.2001.
- [346] Aires de Sousa M, Bartzavali C, Spiliopoulou I, Sanches IS, Crisóstomo MI, de Lencastre H. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece. *J Clin Microbiol* 2003;41:2027–32.
- [347] De Lencastre H, Severina EP, Milch H, Thege MK, Tomasz A. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 1997;3:289–96.
- [348] Melter O, Aires de Sousa M, Urbásková P, Jakubů V, Zemlicková H, de Lencastre H. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 2003;41:4998–5005.
- [349] Sanches IS, Aires de Sousa M, Cleto L, de Campos MB, de Lencastre H. Tracing the origin of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a Portuguese hospital by molecular fingerprinting methods. *Microb Drug Resist Larchmt N* 1996;2:319–29.
- [350] Szczepanik A, Koziol-Montewka M, Al-Doori Z, Morrison D, Kaczor D. Spread of a single multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone carrying a variant of staphylococcal cassette chromosome *mec* type III isolated in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2007;26:29–35. doi:10.1007/s10096-006-0237-5.
- [351] Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AM, de Lencastre H, et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J Clin Microbiol* 1995;33:2400–4.
- [352] Wisplinghoff H, Ewertz B, Wisplinghoff S, Stefanik D, Plum G, Perdreau-Remington F, et al. Molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the metropolitan area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998. *J Clin Microbiol* 2005;43:5445–51. doi:10.1128/JCM.43.11.5445-5451.2005.
- [353] Alp E, Klaassen CHW, Doganay M, Altoparlak U, Aydin K, Engin A, et al. MRSA genotypes in Turkey: persistence over 10 years of a single clone of ST239. *J Infect* 2009;58:433–8. doi:10.1016/j.jinf.2009.04.006.
- [354] Arakere G, Nadig S, Swedberg G, Macaden R, Amarnath SK, Raghunath D. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from two hospitals in Bangalore,

- South India. *J Clin Microbiol* 2005;43:3198–202. doi:10.1128/JCM.43.7.3198-3202.2005.
- [355] Bartels MD, Nanuashvili A, Boye K, Rohde SM, Jashiashvili N, Faria NA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tbilisi, the Republic of Georgia, are variants of the Brazilian clone. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2008;27:757–60. doi:10.1007/s10096-008-0500-z.
- [356] Cha HY, Moon DC, Choi CH, Oh JY, Jeong YS, Lee YC, et al. Prevalence of the ST239 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and differences in antimicrobial susceptibilities of ST239 and ST5 clones identified in a Korean hospital. *J Clin Microbiol* 2005;43:3610–4. doi:10.1128/JCM.43.8.3610-3614.2005.
- [357] Cîrlan M, Saad M, Coman G, Bilal NE, Elbasher AM, Kreft D, et al. International spread of major clones of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: nosocomial endemicity of multi locus sequence type 239 in Saudi Arabia and Romania. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 2005;5:335–9. doi:10.1016/j.meegid.2004.09.005.
- [358] Hsu L-Y, Koh T-H, Singh K, Kang M-L, Kurup A, Tan B-H. Dissemination of multisusceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Singapore. *J Clin Microbiol* 2005;43:2923–5. doi:10.1128/JCM.43.6.2923-2925.2005.
- [359] Ko KS, Lee J-Y, Suh JY, Oh WS, Peck KR, Lee NY, et al. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries. *J Clin Microbiol* 2005;43:421–6. doi:10.1128/JCM.43.1.421-426.2005.
- [360] Liu Y, Wang H, Du N, Shen E, Chen H, Niu J, et al. Molecular evidence for spread of two major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones with a unique geographic distribution in Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:512–8. doi:10.1128/AAC.00804-08.
- [361] Orth D, Grif K, Erdenechimeg L, Battogtokh C, Hosbayar T, Strommenger B, et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Ulaanbaatar, Mongolia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2006;25:104–7. doi:10.1007/s10096-006-0102-6.
- [362] Xu BL, Zhang G, Ye HF, Feil EJ, Chen GR, Zhou XM, et al. Predominance of the Hungarian clone (ST 239-III) among hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered throughout mainland China. *J Hosp Infect* 2009;71:245–55. doi:10.1016/j.jhin.2008.10.029.
- [363] Conceição T, Aires-de-Sousa M, Füzi M, Tóth A, Pászti J, Ungvári E, et al. Replacement of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2007;13:971–9. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01794.x.
- [364] Edgeworth JD, Yadegarfar G, Pathak S, Batra R, Cockfield JD, Wyncoll D, et al. An Outbreak in an Intensive Care Unit of a Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 239 Associated with an Increased Rate of Vascular Access Device—Related Bacteremia. *Clin Infect Dis* 2007;44:493–501. doi:10.1086/511034.
- [365] Cheng H, Yuan W, Zeng F, Hu Q, Shang W, Tang D, et al. Molecular and phenotypic evidence for the spread of three major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones associated with two characteristic antimicrobial resistance profiles in China. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:2453–7. doi:10.1093/jac/dkt213.
- [366] Chen H, Liu Y, Jiang X, Chen M, Wang H. Rapid change of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a Chinese tertiary care hospital over a 15-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1842–7. doi:10.1128/AAC.01563-09.
- [367] Harris SR, Feil EJ, Holden MTG, Quail MA, Nickerson EK, Chantratita N, et al. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science* 2010;327:469–74. doi:10.1126/science.1182395.

- [368] Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, et al. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. *J Infect Dis* 2005;192:801–10. doi:10.1086/432515.
- [369] Aires de Sousa M, Crisóstomo MI, Sanches IS, Wu JS, Fuzhong J, Tomasz A, et al. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. *J Clin Microbiol* 2003;41:159–63.
- [370] Melter O, Santos Sanches I, Schindler J, Aires de Sousa M, Mato R, Kovárova V, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 1999;37:2798–803.
- [371] Johnson AP, Aucken HM, Cavendish S, Ganner M, Wale MC, Warner M, et al. Dominance of EMRSA-15 and -16 among MRSA causing nosocomial bacteraemia in the UK: analysis of isolates from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). *J Antimicrob Chemother* 2001;48:143–4.
- [372] Amorim ML, Faria NA, Oliveira DC, Vasconcelos C, Cabeda JC, Mendes AC, et al. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. *J Clin Microbiol* 2007;45:2881–8. doi:10.1128/JCM.00603-07.
- [373] Gosbell IB, Barbagiannakos T, Neville SA, Mercer JL, Vickery AM, O'Brien FG, et al. Non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Sydney, Australia: emergence of EMRSA-15, Oceania, Queensland and Western Australian MRSA strains. *Pathology (Phila)* 2006;38:239–44. doi:10.1080/00313020600699227.
- [374] O'Brien FG, Pearman JW, Gracey M, Riley TV, Grubb WB. Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. *J Clin Microbiol* 1999;37:2858–62.

# ANNEXES

---

**Annexe 1**

<b>Tableau 25 : Les différents prélèvements en vue de diagnostic bactériologique reçus au sein du laboratoire central de microbiologie de l'hôpital Dorban.</b>				
<b>Echantillon</b>		<b>Conteneur</b>	<b>Transport</b>	<b>Conservation</b>
Plaie, escarre, brûlure, ulcère, abcès ouvert/fermé	Ecouvillonnage, liquide d'aspiration à l'aiguille	Poudrier, tube stérile ou écouvillon	≤ 2 heures température ambiante	≤ 24 heures étuve 35-37°C
Sang		Flacon d'hémoculture	≤ 2 heures température ambiante	≤ 24 heures étuve 35-37°C
Liquide céphalo-rachidien		Tube stérile	≤ 15 minutes température ambiante	≤ 2 heures température ambiante
Cathéter intravasculaire		Poudrier stérile	≤ 15 minutes température ambiante	≤ 2 heures température ambiante
Prélèvements respiratoires (AET, LBA, PDP)		Poudrier stérile	≤ 2 heures température ambiante	< 24 heures 4°C
Urines		Poudrier stérile	≤ 2 heures température ambiante	≤ 24 heures 4°C
Liquides de ponction de cavités normalement stériles (pleural, péricardique, péritonéal, amniotique, articulaire)		Poudrier stérile	≤ 15 minutes température ambiante	≤ 24 heures étuve 35-37°C
Prélèvements oculaires (conjonctive, grattage cornéen, pus intraoculaire)		Ecouvillon/poudrier stérile	≤ 2 heures température ambiante	≤ 24 heures 4°C
Secrétions cervicales et vaginales		Ecouvillon	≤ 2 heures température ambiante	≤ 24 heures 4°C

NB : la coproculture n'a pas été incluse dans notre étude du fait que *S. aureus* ne fait pas partie des bactéries recherchées dans cet examen.

## **Annexe 2**

### **1. Coloration de Gram**

- Réalisation d'un frottis bactérien ;
- Séchage puis fixation du frottis en passant plusieurs fois la lame à travers la flamme du bec Bunsen ;
- Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute (en fonction de la concentration). Cette étape permet de colorer toutes les bactéries en violet, puis rincer à l'eau déminéralisée ;
- Mordançage au lugol : étalez le lugol et laissez agir 20sec. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette, rincez à l'eau déminéralisée ;
- Décoloration à l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée. L'alcool à travers la paroi et décolore le cytoplasme des bactéries qui seront dites : Gram négatives (La coloration au violet de Gentiane disparaît). Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries dites Gram positives ;
- Contre coloration avec de la fuchsine: laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame en utilisant un papier buvard. Les bactéries Gram – seront colorées en rose.
- Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement  $\times 1000$ ), avec un éclairage important (diaphragme ouvert).

## 2. Coloration au bleu de méthylène

- Réaliser un frottis et le fixer ;
- Recouvrir le frottis avec du bleu de méthylène et laisser agir 10 min ;
- Rincer à l'eau déminéralisée ;
- Sécher la lame en utilisant du papier buvard ;
- Examiner à l'objectif x100 à immersion (avec une goutte d'huile) avec un éclairage important (diaphragme ouvert) ;

## 3. Test de la catalase

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes ;
- A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter 2-3 colonies identiques ;
- Observer immédiatement ;
- L'apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase + ;
- Pas de bulles : catalase –

## 4. Test de la coagulase libre

- Ensemencer le plasma de lapin oxalté contenu dans un tube à hémolyse avec quelques gouttes d'une suspension de la souche à tester ;
- Après agitation ; placer le tube à hémolyse au bain-marie à 37°C ou à l'étuve à 37°C ;
- Observer à partir de 30 min et jusqu'à 24 heures ;
- Il est recommandé d'inclure un témoin négatif, par exemple *Staphylococcus epidermidis*, ainsi qu'un témoin positif, par exemple *S. aureus* ;

- Une prise en masse du contenu du tube (coagulation du plasma) → souche coagulase +, **orientation vers *S. aureus*** ;
- Dans le cas où le plasma reste liquid (pas de coagulation) → souche coagulase -, orientation vers SCN.

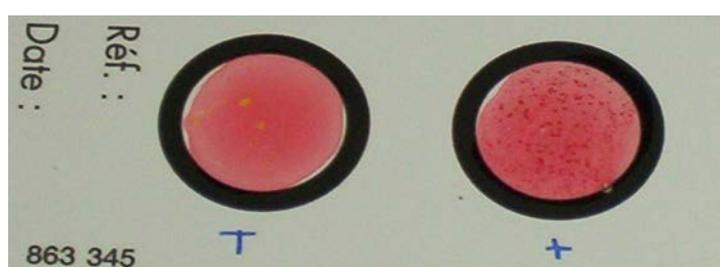
## 5. Test de la DNase

- Ensemencer la gélose de test *DNase* par spot de 3 à 5 mm à l'aide de l'anse de platine chargée de la souche à tester ;
- Il est possible d'ensemencer jusqu'à 6 à 8 souches sur une même boîte de Pétri ;
- Il est recommandé d'inclure un témoin négatif, par exemple *Staphylococcus epidermidis*, ainsi qu'un témoin positif, par exemple *S. aureus* ;
- Incuber les boîtes de Pétri en conditions aérobies pendant 18 à 24 h entre 35 et 37 °C ;
- Après incubation, recouvrir les boîtes de Pétri avec une quantité suffisante de solution d'acide chlorhydrique (HCl). Attendre 2 min afin de permettre à l'acide de pénétrer toute la surface du milieu ;
- L'apparition de zones claires d'ADN dépolymérisé entourant les spots → souche DNase +, **orientation vers *S. aureus***
- Les colonies des souches négatives à la DNase ne présentent pas de zones plus claires en périphérie des colonies → souches DNase -, **orientation vers SCN**.

## 6. Test d'agglutination (*Staphaurex*)

- Déposer une goutte de réactif 1 (test latex) dans un des ronds ;
- Prélever quelques colonies à l'aide d'un bâtonnet en bois ;

- Mélanger au réactif en utilisant toute la surface du rond ;
- Mélanger doucement en inclinant le carton ;
- Le test est positif en cas d'observation d'une agglutination en 40 secondes ou moins → *S. aureus* ;
- En cas de positivité, faire le contrôle négatif avec le réactif 2 (contrôle latex) selon le même mode opératoire.



Absence d'agglutination  
→ Test négatif

Présence d'une agglutination en moins de  
40 s → Test positif  
Identification de *S. aureus*

**Figure 34** : Test d'agglutination (Staphaurex).

## 7. Galerie API 20 STAPH

### a- Technique

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ;
- Une suspension bactérienne d'opacité égale à 0.5 McFarland est préparée avec une ampoule d'API Staph Medium à partir d'une culture pure de 18 heures sur gélose Columbia au sang ;
- A l'aide d'une pipette, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Medium ensemencé. Ne remplir que les tubes et non les cupules, sans dépasser le niveau du tube ;

- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe ;
- Renfermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 18-24h.

b- Lecture et interprétation

- Après incubation, lire les réactions conformément au Tableau de Lecture (voir annexe) en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :
  - Test VP : VP 1 et VP 2
- Attendre 10 minutes. Une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive. Une couleur rose pâle ou rose claire obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.
- Test NIT : NIT 1 et NIT 2
- Attendre 10 minutes. Une coloration rouge indique une réaction positive.
- Test PAL : ZYM A et ZYM B
- Attendre 10 minutes. Une coloration violette indique une réaction positive.

### **Annexe 3**

#### **1. Antibiogramme**

- A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine 2-3 colonies bien isolées et parfaitement identiques ;
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% ;
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ;
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et l'essorer en le pressant sur la paroi interne du tube afin de décharger au maximum ;
- Ensemencer la totalité de la surface gélosée (Gélose Mueller Hinton), sèche, de haut en bas, en stries serrées ;
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose ;
- Six disques sont appliqués par boîte en utilisant un distributeur automatique, ils sont espacés de 24 mm, centre à centre, (mettre l'érythromycine à coté de la clindamycine) ;
- Après incubation de 18 à 24h à 37°C, lire les diamètres des zones d'inhibition au millimètre près grâce à un pied à coulisse.
- Les résultats sont comparés aux valeurs critiques figurant sur la table de lecture, ensuite la souche est classée dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante (**Tableau 26**).

- La souche de control de qualité est *S. 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

**Tableau 26** : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *S. aureus*

Antibiotiques	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
		S	R
Pénicilline G	6 µg (10 UI)	≥ 29	< 28
Oxacilline	5 µg	≥ 20	< 20
Céfoxitine	30 µg	≥ 27	< 25
Kanamycine	30 UI	≥ 17	< 15
Gentamicine	15 µg (10 UI)	≥ 20	< 20
Tobramycine	10 µg	≥ 20	< 20
Erythromycine	15 UI	≥ 22	< 19
Clindamycine	2 UI	≥ 21	< 14
Pristinamycine	15 µg	≥ 22	< 19
Ofloxacine	5 µg	≥ 22	< 22
Tétracycline	30 UI	≥ 23	< 21
Rifampicine	30 µg	≥ 29	< 24
Fosfomycine	50 µg	≥ 14	< 14
Acide fusidique	10 µg	≥ 24	< 24
Teicoplanine	30 µg	≥ 17	
Vancomycine	30 µg	≥ 17	
Cotrimoxazole	1,25 + 23,75 µg	≥ 16	< 13
Nitrofuranes	300 µg	≥ 15	< 15

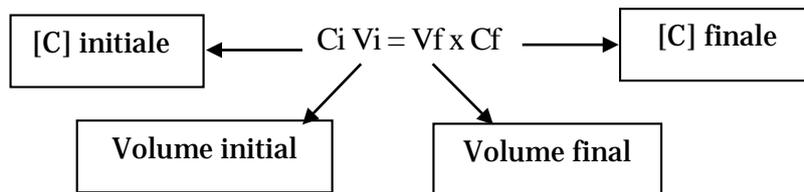
**Annexe 4****1. Préparation de dNTP et d'amorces****1.1. dNTP**

On a 4 dNTP (ATP, GTP, CTP et TTP) à une concentration de 100 mM chacun soit 10  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$ .

Soit:

- dATP (10  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$ )
- dGTP (10  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$ )
- dCTP (10  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$ )
- dTTP (10  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$ )

Nous voulons un Mix de dNTP à 4 mM final chacun.



$$100 \text{ mM} \times \boxed{V_i} = 4 \text{ mM} \times 100 \mu\text{l}$$

$$\text{➤ } (4 \times 100) / 100 = 4 \mu\text{l}$$

On prend donc :

- 4  $\mu\text{l}$  de dATP (100 mM)
- 4  $\mu\text{l}$  de dCTP (100 mM)
- 4  $\mu\text{l}$  de dTTP (100 mM)
- 4  $\mu\text{l}$  de dGTP (100 mM)

On ajoute 84  $\mu\text{l}$  d'eau de BM pour avoir un volume final de 100  $\mu\text{l}$ .

## 1.2. Amorces

Pour obtenir des amorces à 20 pmol/μl, à partir d'amorce à 100 pmol/μl.

$$\boxed{C_i \times V_i = C_f \times V_f}$$

$$100 \text{ pmol}/\mu\text{l} \times X = 20 \text{ pmol}/\mu\text{l} \times 100$$

$$V_i = (20 \text{ pmol} \times 100 \mu\text{l}) / 100 \text{ pmol} = 20 \mu\text{l}$$

$$V_i = 20 \mu\text{l} \text{ à } 100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$$

On prélève donc :

- 20 μl d'amorce à 100 pmol/μl
- 80 μl d'eau de BM

Pour obtenir 100 μl d'amorce à 20 pmol/μl

**Annexe 5****1. Séparation en répétition SPA (Microsoft word)**

GCACCAAAA  
 GAGGAAGACAACAACAAACCTGGT  
 AAAGAAGACGGCAACAACCTGGC  
 AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGC  
 AAAGAAGACGGCAACAACCTGGT  
 AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT  
 AAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGC  
 AAAGAAGACAACAACAACCTGGT  
 AAAGAAGACGGCAACGGAGTACAT  
 GTCGTTAAACCTGGTGATACAGTAAAT-----

CAAACGATGCTCAAGCACCAAAA  
 GAGGAAGACAATAACAAGCCTGGC  
 AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGC  
 AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT  
 AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGC  
 AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT  
 AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT  
 AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGC  
 AAAGAAGATGGCAACAACCTGGT  
 AAAGAAGATGGTAACGGAGTACAT  
 GTCGTTAAACCTGGTGATACAGTAAATGACATTGCAAAAAGCA

AAACGATGCTCAAGCACCAAAA  
 GAGGAAGACAATAACAAGCCTGGC  
 AAAGAAGACAATAACAAGCCTGGC  
 AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT  
 AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT  
 AAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGT  
 AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT  
 AAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGT  
 AAAGAAGACAACAAAAACCTGGT  
 AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGC  
 AAAGAAGATGGCAACAACCTGGT  
 AAAGAAGATGGTAACGGAGTACATGTCGTTAAACCTGGTGATACAGTAAATGAC  
 ATTGAAAAGCA

2. Excel séquence type *spa* onglet 1

r01	GAGGAAGACAACAACAAGCCTAGC
r02	AAAGAAGACAACAAAAAACCTGGC
r03	GAGGAAGACAATAACAACCTGGT
r04	GAGGAAGACAATAACAAGCCTGGT
r05	AAAGAAGACAACAAAAAGCCTGGC
r06	AAAGAAGACGGCAAAAAACCTGGC
r07	GAGGAAGACAACAACAACCTGGT
r08	GAGGAAGACAACAACAAGCCTGGT
r09	GAGGAAGACGGCAACAACCTGGT
r10	AAAGAAGACAATAACAAGCCTGGT
r100	AAAGAAGACAACAAAAAACCTGAC
r101	AAATAAGACAACAACAAGCCTGGT
r102	AAAGAAGACAACAACAACCTGAT
r103	AAAGAAGACGGCAACAACCTGGG
r104	AAAGAAGGCGGCAACAACCTGGT
r105	AAAGAAGATAACAACAAAAACCTGGT
r106	GAGCAAGACAACAACAAGCCTGGT
r107	AAAGAAGACGGCAACAACCTGAC
r108	AAAAAAGACAACAACAACCTGGT
r109	AAAGAAGACGGCAACAACCTAGC
r11	GAGGAAGACAATAACAAGCCTGGC
r110	AAAGAAGACGACAACAAGCCTGGT
r111	AAAGAAGATGGCAACAACCTGGT
r112	AAAGAAGATGGAAACAAGCCTGGC
r113	AAAGAAGACAACAAAAAACCCGGT
r114	AAAGAAGACGGTAACAACCTGGC
r115	AAAGAAGACAACAAAAAGCCTACC
r116	AAATAAGACAATAACAAGCCTGGC
r117	AAAGAAGATGGTAACAAGCCTGGT
r118	AAAGAAGACGTCAACAAGCCTGGT
r119	AAATAAGACGGCAACAAGCCTGGT
r12	AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT
r120	AAAGAAGACAACAAAAAACCTGAT
r121	GAGGAAGACAACAAGCCTGGT
r122	GAGGAAGACAACAAAAAACCTGGA
r123	GAGGAAGACAACAACAATCCTGGC
r124	GAGGAAGGCAACAAAAAACCTGGT
r125	GAGGAAGACGGCAACAACCTGGC
r126	GAGGAAGACAACAAAAAGCCTAGC
r127	AAAGAAGACAACAAAAAACCTGTC
r128	AAAGAAGACAACAACAAGCCTAGT

### 3. Excel séquence spa onglet 2

t1008	08-16-34-13-17-34
t1568	26-17-20-16
t2078	04-13-21-12-17-20-17-12-17-17
t190	11-17-34-24-34-22-25
t594	11-17-34-24-34-22-25-75
t5271	11-17-34-24-34-22-25-25
t1676	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24-24-17
t1677	11-19-12-12-17-34-24-34-22-25
t1678	11-19-12-21-17-34-24-02-22-25
t1679	26-23-66-34-17-20-17-12-17-16
t1636	14-44-13-12-17-17-17-17-17-23-18
t1637	14-44-13-12-18
t1638	14-54-44-13-12-17-17-17-17-23-18
t1696	124-22-34-17-20-17-12-17-16
t1639	07-16-34-12-12-23-02-12-23
t1680	121-17-17-17-17
t1682	09-02-16-13-17-81-16-81
t1697	35-43-34-16-16-02-17-16
t1640	08-02-12-23
t1641	15-12-16-02-16-02-25-16-17-24
t1642	15-16-02-25-17-24-24
t1643	04-44-54-31-12-16-34-16-12-33-34
t1644	08-13-16-34
t1645	08-12-16-02-43-34-16-16-02-17-16
t1646	09-20-16-34-13-17-34-16-34
t1647	08-13-16-34-16-34
t1648	26-23-29-17-25-17-25-28
t1649	15-12-16-02-16-02-25-25-17-24
t1650	15-12-16-16-02-16-02-25-17-25
t1651	08-16-02-43-34-16-02-17-16
t1652	04-44-44-33-31-12-16-34-16-12-25-22-34
t1653	15-12-12-16-02-16-02-25-17
t1654	15-12-16-02-16-02-25-17-17-24-24
t1655	08-16-02-43-34-16-16-02-17-16
t1656	04-21-21-12-41-20-17-12-12-12-17
t1657	15-16-02-16-02-25-25-17-24-24
t1658	15-12-16-02-16-02-25-25-17-24-24-24
t1659	07-16-12-23-02-02-34
t1660	15-12-16-16-16-16-16-02-16-02-25-17-24
t1661	04-21-12-41-20-12-12-12-12-17
t1662	15-25-17-24-24
t1663	08-16-20-13-34
t1664	04-33-31-12-16-16-12-33-34
t1665	26-23-13-23-31-17-17-25-16-28
t1666	08-16-02-83-34-13-17-34-83-34
t1667	15-34-02-16-02-25-17-24
t1668	08-16-34-13-34-13-17-34
t1669	08-16-34-02-43-13-16-16-02-17-16
t1670	04-44-33-31-12-16-34-12-33-34
t1671	04-21-12-41-20-17-12-12-12-12-17
t1672	15-12-16-02-16-16-02-16-02-25-17-24-24
t1673	26-22-17-21-34-34-22-34
t1674	15-12-16-02-25-34-24-17
t1675	15-21-12-16-02-16-02-25-17-24-24-24
t1683	26-17-13-17-20-17-12-17-16
t1684	11-12-21-17-34-17

## Abstract

**Aims:** The aim of the present study was to evaluate the antibiotic susceptibility and to study the molecular profile of hospital MRSA (HA-MRSA) in the University Hospital of Annaba (eastern Algeria), and therefore to assess whether an in-hospital spread of the European community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) clone was on-going in Annaba.

**Material & Methods:** A total of 148 non-duplicated strains of *S. aureus* were collected between February and October 2010, from different pathology samples. Identification of strains was done by conventional methods and confirmed by using Maldi-tof. Antibiotic susceptibility testing was determined on Muller-Hinton agar plates using the disk diffusion method. Molecular characterization of MRSA strains was studied using a variety of molecular methods including spa typing, MLST, SCCmec typing. The detection of Panton Valentine leucocidin genes was also performed.

**Results:** Our study revealed a very low healthcare-associated MRSA infections incidence rate of 0.34 per 1000 patient-days. However, the proportions of HCA-MRSA strains (85/119) and CA-MRSA (7/29) among *S. aureus* strains reached an alarming level. All CA-MRSA strains and 14.1% (n=12) of HCA-MRSA were found associated with ST80 clone. Skin and soft tissue infections were found to be the most common infection (83.7%) caused by MRSA, 63 % were Diabetes related SSTIs.

**Conclusion:** We found that unlike Algiers's hospital where ST80 is the predominant clone, the major clone in Annaba's hospital (86%) was the Hungarian/Brazilian clone MRSA ST239-III. Moreover, the onset of ST-80 clone as a cause of HCA-MRSA infections, thus confirming the emerging role of CA-MRSA as HCA pathogens in Maghreb.

**Key words:** Hospital outbreak; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; molecular typing; skin and soft tissue infections; ST80-IV

## Résumé

**Objectifs :** Cette étude consiste à évaluer la sensibilité aux antibiotiques, et à étudier le profil moléculaire du SARM hospitalier (SARM-H) dans le CHU d'Annaba (Est Algérien), ainsi que d'évaluer si une propagation du clone Européen ST-80 de SARM d'origine communautaire (SARM-C) était en cours en milieu hospitalier.

**Matériel et méthodes :** Dans ce but, 148 souches non-dupliquées de *S. aureus* ont été isolées à partir de différents échantillons pathologiques entre Février et Octobre 2010 dans le CHU d'Annaba. L'identification des souches a été faite par les tests classiques et a été confirmé en utilisant le MALDI-TOF. La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton. La caractérisation moléculaire des souches de SARM a été étudiée en utilisant une variété de méthodes moléculaires : typage *spa*, *MLST*, *SCCmec*, ainsi que la détection des gènes codant la leucocidine de Panton Valentine.

**Résultats :** Notre étude a révélé un très faible taux d'incidence des infections liées aux SARM hospitaliers (SARM-H) de 0,34 pour 1000 patients-jours. Néanmoins, les proportions de souches SARM-H (85/119) et SARM-C (7/29) parmi les souches de *S. aureus* sont plus élevées que celles trouvées en France. Toutes les souches de SARM-C et 14,1% (n = 12) de SARM-H ont été trouvées associées au clone ST-80. Les infections de peau et des tissus mous ont été trouvées étant l'infection la plus fréquente (83,7%) causée par le SARM, 63% était liées au diabète.

**Conclusion :** Contrairement à l'hôpital d'Alger où ST80 est le clone prédominant, le principal clone dans l'hôpital d'Annaba (86%) était le clone Hongrois/Brésilien ST239-III. Aussi, l'apparition du clone ST-80 comme cause d'infections liées aux SARM-H, confirme le rôle émergent de CA-MRSA comme un pathogène hospitalier au Maghreb.

**Mots-clefs :** Epidémie nosocomiale ; *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ; typage moléculaire ; infections de la peau et des tissus mous; ST80-IV