



Master : Biotechnologie Microbienne

PROJET DE FIN D'ETUDES

Sous le thème :

Portage nasal de *Staphylococcus aureus* : Prévalence, étude de la résistance aux antibiotiques et de la virulence chez les patients et personnel de quatre centres d'hémodialyse de Fès

Stage effectué à : l'Institut Pasteur du Maroc et au CHU Hassan II de Fès

Présenté par : Idrissa DIAWARA

Encadré par :

Dr. ELAZHARI Mohamed : Institut Pasteur du Maroc à Casablanca

Pr. MUSTAPHA Mahmoud : CHU Hassan II de Fès

Pr. BEKHTI Khadija : FST de Fès

Soutenu le : 20/06/2012

Jury :

- Dr. ELAZHARI Mohamed
- Dr. TIMINOUNI Mohamed
- Pr. HAGGOU Abdellatif
- Pr. FIKRI Ben Brahim Kawtar
- Pr. BEKHTI Khadija

Année universitaire : 2011-2012

Ce travail a été réalisé sous la direction de Dr. Elazhari Mohamed dans le laboratoire de Bactériologie moléculaire de l'Institut Pasteur du Maroc en collaboration avec le CHU Hassan II de Fès et la Faculté des Sciences et Techniques de Fès-Saïss

Remerciements & dédicaces

Au terme de ce travail je rends tout d'abord la louange à Dieu, sans sa grâce nous n'aurions pu faire ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements :

A mes encadrants

✓ **Dr. Elazhari Mohamed,**

Laboratoire de Bactériologie Médicale, Centre de Biologie Médicale, Institut Pasteur du Maroc

Toutes mes reconnaissances pour m'avoir proposé de réaliser ce travail, pour m'avoir encouragé, encadré et soutenu avec bonne humeur pendant toute sa durée, pour m'avoir permis de donner une nouvelle orientation à ma carrière estudiantine. Votre qualité professionnelle et votre rigueur sont pour moi des exemples à suivre

✓ **Pr. Mustapha Mahmoud**

Professeur de microbiologie-Virologie, Responsable du laboratoire de Bactériologie du CHU Hassan II de Fès.

Je vous remercie sans fin de m'avoir accepté dans votre laboratoire durant la période d'échantillonnage de mon travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour vos encouragements et votre rigueur qui m'ont beaucoup aidé à surmonter toutes les difficultés.

✓ **Dr. Timinouni Mohamed,**

Chef du département de la recherche scientifique, laboratoire de Bactériologie moléculaire, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, m'avoir donné sa confiance pour la réalisation de ce sujet et pour son soutien.

✓ **Pr. Khadija Bekhti**

Professeur de Bactériologie parasitologie, laboratoire de Biotechnologie microbienne à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès

Je tiens à vous exprimer ma grande reconnaissance pour vos conseils judicieux et fructueux. Vous m'avez fait l'honneur en m'encadrant tout au long de mon projet de fin d'étude, vous m'avez toujours accueilli avec générosité et sympathie.

Veillez accepter chère professeur, mon profond respect et mes sincères dévouements.

A vos examinateurs

✓ ***Pr Abdellatif HAGGOUD***

Notre responsable de Master et également membre du jury,

C'est un grand honneur pour moi, cher Professeur, de vous dire merci pour tout ce que nous avons appris auprès de vous et de l'ensemble du corps professoral de la Faculté pendant notre cursus. Vous avez été mon responsable de Master et aujourd'hui membre du jury.

Cher professeur, puisse ce travail être pour moi l'occasion de vous exprimer ma profonde considération.

✓ ***Pr. FIKRI Ben Brahim Kawtar, membre du jury :***

Professeure de microbiologie, Faculté des sciences et techniques de Fès.

Chère professeure, nous vous remercions pour votre dévouement en tant que professeure et votre qualité humaine et professionnelle. Vous nous faites un insigne honneur en acceptant malgré vos multiples occupations d'être membre de notre jury. Nous croyons à tout le bénéfice que vous apporterez à ce travail par votre présence à ce jury. Soyez assuré chère professeure de notre gratitude et de notre profond respect.

A nos collaborateurs des différents centres d'hémodialyse de Fès

✓ ***Dr Tahri, Centre d'hémodialyse de la clinique des Spécialités Ryad de Fès.***

✓ ***Dr. Lazhraq, Centre d'hémodialyse Elhakim de Fès.***

✓ ***Dr. Hakim, Centre hémodialyse hôpital Provincial AlGhassani.***

✓ ***Pr. Squalli, Centre de néphrologie du CHU Hassan II de Fès.***

✓ ***A tous les staffs médicaux des quatre centres d'hémodialyse de notre étude.***

Un grand merci à vous, sans votre collaboration et votre aide, ce travail n'aurait pas vu le jour. Merci pour votre disponibilité, votre confiance et votre générosité qui m'ont aidé lors de l'échantillonnage dans vos structures respectives tout au long de ce travail. Merci également pour votre sympathie et votre hospitalité.

A Dr. Boly,

Laboratoire d'épidémiologie, de la recherche clinique et santé communautaire, CHU Hassan II de Fès, je tiens à vous remercier pour votre contribution dans les études statistiques de ce travail surtout de m'avoir donné un grand coup de main avec le logiciel SPSS.

Je remercie également toutes les personnes que je n'ai pas citées, elles se reconnaîtront.

Je dédie ce travail :

A ma mère

Les mots ne me suffiront jamais pour exprimer ce que tu représentes et continues à représenter pour moi. J'ai en mémoire la ferme volonté que t'animait de me voir réussir à l'école.

A mon père

Ce travail est le tien. Trouve ici toute mon affection et ma profonde gratitude pour toutes ces années de sacrifices pour moi.

A mes frères et sœurs

Pour exprimer mon affection fraternelle et mon fidèle attachement.

A tous mes ami(e)s

Tous mes ami(e)s et collègues et particulièrement les plus intimes en témoignage des moments inoubliables, des sentiments purs, et des liens solidés qui nous unissent

Liste des figures

Figure 1	Multiplés possibilités d'interactions entre <i>S. aureus</i> et son hôte.....	4
Figure 2	Structure des MSCRAMM avec les domaines S (peptide signal), A, B, C, R (contenant les sites de fixation au ligand représentés par *) W et M (ces derniers étant séparés par le motif LPXTG).....	8
Figure 3	Les Îlots de pathogénicité de <i>S. aureus</i> comportant des gènes codant des exotoxines superantigéniques.....	11
Figure 4	Facteurs de virulence exprimés à la surface ou excrétés par <i>S. aureus</i> en fonction de la densité bactérienne.....	14
Figure 5	Utilisation des antibiotiques et acquisition des résistances par <i>S aureus</i> (Hardy et al., 2004).....	16
Figure 6	Aspect de la bordure de la zone d'inhibition autour d'un disque de pénicilline avec les aspects typiques de zone fantôme pour une souche de <i>S. aureus</i> non productrice de pénicillinase (A) et un aspect d'arrêt net de croissance avec grosses colonies pour une souche productrice de pénicillinase (B).....	18
Figure 7	Phénotype de résistance à l'érythromycine, à la lincomycine.....	22
Figure 8	Circuit d'hémodialyse avec les sites à risque (cercle rouge) de transmission d'agent pathogène.....	25
Figure 9	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) du gène <i>nuc</i> amplifié par PCR pour les souches DF1 à DF12.....	39
Figure 10	Répartition des 62 souches de <i>S. aureus</i> isolées dans les différents centres.....	40
Figure 11	Répartition des 32 personnes du staff médical des 4 centres d'hémodialyse.....	45

Figure 12	Révélation après migration sur gel d'agarose des gènes <i>nuc</i> et <i>mecA</i> amplifiés par PCR multiplex.....	47
Figure 13A	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 1 chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>lukM</i> , <i>seh</i> , <i>selm</i> et <i>tst</i>	49
Figure 13B	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 2, chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>etb</i> , <i>sed</i> , <i>selr</i> , <i>sec</i> et <i>eta</i>	50
Figure 13C	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 3, chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>sea</i> , <i>pvl</i> , <i>hly</i> et <i>selp</i>	50
Figure 13D	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 4, chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>seb</i> et <i>selq</i>	51
Figure 13E	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 5, chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>etd</i> , <i>sell</i> et <i>selo</i>	52
Figure 13F	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 6, chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>edinA/C</i> , <i>edinB</i> et <i>selk</i>	52

Liste des figures

Figure 1	Multiplés possibilités d'interactions entre <i>S. aureus</i> et son hôte.....	4
Figure 2	Structure des MSCRAMM avec les domaines S (peptide signal), A, B, C, R (contenant les sites de fixation au ligand représentés par *) W et M (ces derniers étant séparés par le motif LPXTG).....	8
Figure 3	Les Îlots de pathogénicité de <i>S. aureus</i> comportant des gènes codant des exotoxines superantigéniques.....	11
Figure 4	Facteurs de virulence exprimés à la surface ou excrétés par <i>S. aureus</i> en fonction de la densité bactérienne.....	14
Figure 5	Utilisation des antibiotiques et acquisition des résistances par <i>S aureus</i> (Hardy et al., 2004).....	16
Figure 6	Aspect de la bordure de la zone d'inhibition autour d'un disque de pénicilline avec les aspects typiques de zone fantôme pour une souche de <i>S. aureus</i> non productrice de pénicillinase (A) et un aspect d'arrêt net de croissance avec grosses colonies pour une souche productrice de pénicillinase (B).....	18
Figure 7	Phénotype de résistance à l'érythromycine, à la lincomycine.....	22
Figure 8	Circuit d'hémodialyse avec les sites à risque (cercle rouge) de transmission d'agent pathogène.....	25
Figure 9	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) du gène <i>nuc</i> amplifié par PCR pour les souches DF1 à DF12.....	39
Figure 10	Répartition des 62 souches de <i>S. aureus</i> isolées dans les différents centres.....	40
Figure 11	Répartition des 32 personnes du staff médical des 4 centres d'hémodialyse.....	45

Figure 12	Révélation après migration sur gel d'agarose des gènes <i>nuc</i> et <i>mecA</i> amplifiés par PCR multiplex.....	47
Figure 13A	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 1 chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>lukM</i> , <i>seh</i> , <i>selm</i> et <i>tst</i>	49
Figure 13B	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 2, chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>etb</i> , <i>sed</i> , <i>selr</i> , <i>sec</i> et <i>eta</i>	50
Figure 13C	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 3, chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>sea</i> , <i>pvl</i> , <i>hly</i> et <i>selp</i>	50
Figure 13D	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 4, chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>seb</i> et <i>selq</i>	51
Figure 13E	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 5, chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>etd</i> , <i>sell</i> et <i>selo</i>	52
Figure 13F	Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiniques amplifiés par PCR multiplex 6, chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR : gènes recherchés, <i>edinA/C</i> , <i>edinB</i> et <i>selk</i>	52

Liste des tableaux

Tableau I	Principaux enzymes et toxines produits par <i>S. aureus</i>	3
Tableau II	Facteurs de virulence potentiellement impliqués dans chacune des infections graves à <i>S. aureus</i>	13
Tableau III	Enzymes inactivatrices des aminosides et phénotypes de résistance...	20
Tableau IV	Liste des antibiotiques testés.....	31
Tableau V	Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>lukM</i> , <i>seh</i> , <i>selm</i> et <i>tst</i> dans la PCR MTX 1.....	36
Tableau VI	Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>etb</i> , <i>sed</i> , <i>selr</i> , <i>sec</i> , et <i>eta</i> dans la PCR MTX 2.....	36
Tableau VII	Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>sea</i> , <i>luk-PV</i> , <i>hly</i> , et <i>selp</i> dans la PCR MTX 3.....	37
Tableau VIII	Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>seb</i> , et <i>selq</i> dans la PCR MTX 4.....	37
Tableau IX	Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>etb</i> , <i>sell</i> , <i>selo</i> dans la PCR MTX 5.....	37
Tableau X	Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>edinB</i> , <i>edinA/C</i> et <i>selk</i> dans la PCR MTX 6.....	37
Tableau XI	Condition d'amplification des gènes toxiques.....	38
Tableau XII	Démographie et caractéristiques des différentes populations d'étude (n, %).	41
Tableau XIII	Les facteurs de risque associés au portage nasal de <i>S. aureus</i> chez les HC.....	43
Tableau XIV	distribution du portage de <i>S. aureus</i> en fonction de l'âge des patients (P=0,02).	43
Tableau XV	Les facteurs de risque associés au portage nasal de <i>S. aureus</i> chez le HA.....	44
Tableau XVI	prévalence du portage nasal de <i>S. aureus</i> chez le personnel des centres d'hémodialyse.....	45
Tableau XVII	Profil de résistance aux antibiotiques des souches de <i>S. aureus</i> isolées	46
Tableau XVIII	Phénotype de résistance des 62 souches de <i>S. aureus</i>	48
Tableau XIX	Phénotype de résistance des 6 souches multiR.....	48
Tableau XX	Prévalence des gènes toxiques chez les souches de <i>S. aureus</i> multiR.....	53
Tableau XXI	Fréquence de combinaison des gènes toxiques chez les 6 souches multiR.....	53

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique
agr : accessory gene regulator
ARN : acide ribonucléique
BHI: Brain Heart Infusion
BORSA : Bordeline *S. aureus*
C: Chloramphénicol
CA-SFM: Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
DF : Dialysé de Fès
DNase : désoxyribonucléase
dNTP: dinucléotide tri phosphate
EDIN: Epidermal Cell Differentiation Inhibitor
EDTA : ethylene diamine tetra-acetic acid
EF: Facteur d'élongation
egc : enterotoxin gene cluster
EI: endocardite infectieuse
erm : erythromycin ribosome methylase
ET : exfoliatin toxin
FA: Fusidic Acid (acide fusidique)
FAME : Fatty acid modifying enzyme
FOS : Fosfomycine
FOX: Céfoxitine
GC : Guanine Cytosine
GISA : Glycopeptide Intermediate *S. aureus*
GM: Gentamicine
H₂O₂: eau oxygénée
HA : hémodialysé aiguë
HC : hémodialysé chronique
HCl : acide chlorudrique
IPM : Institut Pasteur du Maroc
K : Kanamycine
L: Lyncomycine
LPV : leucocidine de Panton et valentine
MgCl₂ : Chlorure De Magnésium
MH : Muller Hinton
MLS_B: Macrolides-Lincosamides et Streptogramines B

MODSA : MODified *S. aureus*
MSCRAMM : Microbial surface component recognizing adhesine matrix molecules
multiR : multirésistante
NET : Nétilmicine
NTED, neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease
nuc : nucléase thermostable staphylococcique
OFX: Ofloxacin
PAVM : pneumopathie acquise sous ventilation mécanique
pb : paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFGE : Pulse field gel electrophoresis
PLP : Protéine Liant la Pencilline
PLP2a : Protéine Liant la Pénicilline 2a
RA : Rifampicine
Rpm : rotation par minute
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
SAPI : *Staphylococcus aureus* Pathogeneicity Island
SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la méthicilline
SCC*mec* : Staphylococcal Chromosome Cassette
SCN : *S. aureus* à coagulase négative
se : staphylococcal enterotoxin (gène)
SE : staphylococcal enterotoxin (protéine)
SEI : staphylococcal enterotoxin like (protéine)
SERAM : secretable expanded repertoire adhesive molecules
TBE : Tris borat d'*EDTA*
TE : Tétracycline
TEC : Teicoplanine
TM : Tobramycine
Tn : Transposon
TSST-1 : toxic shock syndrom toxin 1
UFC : Unité Formant de Colonie
UV : Ultra Violet
VA : Vancomycine
VISA : Vancomycin Intermediate *S. aureus*
VRSA : Vancomycin Resistant *S. aureus*.

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Revue bibliographique

Chapitre I : <i>Staphylococcus aureus</i>	3
--	---

I. Historique et taxonomie.....	4
---------------------------------	---

II. Caractères bactériologiques et moléculaires de <i>S. aureus</i>	5
---	---

1. Caractères Bactériologiques.....	5
-------------------------------------	---

2. Génome et biologie moléculaire de <i>S. aureus</i>	5
---	---

III. Les facteurs de virulence et physiopathologies de <i>S. aureus</i>	6
---	---

1. Facteurs intervenant dans la colonisation et l'adhésion.....	7
---	---

1.1. La capsule et la paroi de <i>S. aureus</i>	7
---	---

1.2. Les protéines d'adhésion exprimées par <i>S. aureus</i>	7
--	---

2. Facteurs impliqués dans la lyse cellulaire et l'envahissement tissulaire.....	9
--	---

2.1. Facteurs de lyse cellulaire	9
--	---

2.2. Facteurs impliqués dans l'envahissement tissulaire.....	10
--	----

3. Dissémination et régulation de la virulence de <i>S. aureus</i>	12
--	----

4. Persistance dans l'organisme.....	14
--------------------------------------	----

IV. Epidémiologie de <i>S. aureus</i>	15
---	----

1. Réservoirs de <i>S. aureus</i>	15
---	----

2. Modes de transmission	15
--------------------------------	----

Chapitre II : Sensibilité de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques et les supports génétiques impliqués dans la résistance	16
--	----

I. La résistance aux bêta-lactamines	17
--	----

1. Résistance à la pénicilline par production de pénicillinase	17
--	----

2. Méthicillino-résistance par modification de cible.	18
--	----

2.1. Génétique de la résistance à la méthi cilline	18
--	----

II. Résistance aux glycopeptides	19
--	----

III. Résistance aux aminosides	20
--------------------------------------	----

IV. Résistance aux macrolides, lincosamides et aux streptogramines	21
--	----

1. Méthylation ribosomale (phénotype MLS _B).....	21
--	----

2. Efflux (phénotype MSB).....	21
--------------------------------	----

3. Résistance à l'érythromycine et à la lincomycine (phénotype MLSB constitutif).....	22
---	----

V. Autres résistances	22
Chapitre III : <i>S. aureus</i> chez les hémodialysés	24
I. L'hémodialyse.....	24
II. Processus de l'hémodialyse et les sites à risques	24
III. Epidémiologie du risque infectieux en hémodialyse	25
IV. Relation entre le portage nasal et les infections à <i>S. aureus</i> chez les hémodialysés ...	26

PARTIE PRATIQUE

Matériel et méthodes

I. Echantillonnage.....	28
1. Population d'étude.....	28
2. Questionnaire et recueil des données.....	28
II. Analyse statistique	28
III. Mode de prélèvement et recueil des échantillons.....	29
IV. Analyses microbiologiques et identification bactérienne.....	29
1. Caractère morphologique.....	29
2. Caractères biochimiques.....	30
2.1. Recherche de la catalase.....	30
2.2. Recherche de la Coagulase libre et liée	30
2.3. Recherche du gène <i>nuc</i> par PCR	30
V. Sensibilité aux antibiotiques.....	30
VI. Extraction d'ADN bactérien.....	32
VII. Confirmation de l'espèce : recherche du gène <i>nuc</i>	32
VIII. Recherche du gène <i>mecA</i> chez <i>S. aureus</i>	33
IX. Recherche de gènes codants pour les toxines staphylococciques	33
1. Gènes recherchés.....	33
2. Mélanges réactionnels pour les différentes PCR multiplex.....	35
3. Les amorces utilisées pour les différentes PCR multiplex	36
4. Programme d'amplification des différentes PCR multiplex.....	38

Résultats

I. Identification bactérienne.....	39
II. Prévalence du portage nasal de <i>S. aureus</i> chez les hémodialysés et caractéristiques des populations d'étude.....	40

1. Prévalence du portage nasal de <i>S. aureus</i> chez les hémodialysés chroniques et caractéristiques associées	41
2. Prévalence du portage nasal de <i>S. aureus</i> chez les hémodialysés aigus et caractéristiques associées à l'hémodialyse aiguë.	44
3. Prévalence du portage nasal de <i>S. aureus</i> chez le personnel des centres d'hémodialyse et caractéristiques associées.....	45
III. Sensibilité des souches de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques.....	46
IV. Habillage en gènes toxiques des souches de <i>S. aureus</i> multirésistantes.....	48

Discussion

I. Prévalence de <i>S. aureus</i>	54
II. Facteurs de risque associés au portage nasal.....	56
III. Sensibilité aux antibiotiques.....	57
IV. Etude de la virulence.....	60

Conclusion	63
-------------------------	----

Perspectives	64
---------------------------	----

Références bibliographiques	65
--	----

Introduction

L'hémodialyse est un moyen de traitement de l'insuffisance rénale chronique ou aiguë, elle demeure au Maroc la modalité classique d'épuration-extrarénale puisqu'elle est utilisée dans plus de 98 % des cas (Damoune, 2012).

C'est un acte invasif imposant un accès vasculaire itératif, soit sur fistule artério-veineuse native ou prothétique, soit sur cathéter veineux central chez les patients insuffisants rénaux. Toute séance d'hémodialyse comporte le risque de transmission d'un microorganisme pathogène à chaque niveau du processus d'épuration. De plus, le patient insuffisant rénal chronique est régulièrement hospitalisé et ses fonctions immunitaires présentent beaucoup de défaillance. Ceci explique pourquoi l'insuffisance rénale dialysée est caractérisée par une fréquence élevée de complications infectieuses (Dalrymple, 2008).

Les infections nosocomiales représentent, chez les hémodialysés, la première cause de morbidité et la deuxième cause de décès (Vandencasteele, 2009). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) étant le germe le plus souvent en cause dans les bactériémies de l'hémodialyse. Le portage nasal de *S. aureus*, présent chez 42% des hémodialysés, joue un rôle majeur dans l'essaimage cutané du germe et par conséquent dans le risque infectieux chez le dialysé (Vandencasteele, 2009).

La région nasale constitue un réservoir de *S. aureus* pour le portage cutané. De plus, l'insuffisance rénale chronique, en altérant les défenses de l'organisme, favorise elle-même le développement d'infections.

Le premier réservoir de *S. aureus* est constitué par les patients colonisés et/ou infectés, le deuxième réservoir est constitué par le personnel, il s'agit le plus souvent d'une simple colonisation, notamment au niveau des mains. Le troisième réservoir potentiel de *S. aureus* est l'environnement. En raison de l'excellente capacité de survie des staphylocoques dans ce dernier.

Les épisodes de bactériémie et de furonculose à *S. aureus* observés chez les hémodialysés et la notion de risque font que, rechercher le portage nasal de *S. aureus* tant chez les hémodialysés que chez le personnel pour la prévention des infections à ce germe dans un centre d'hémodialyse est important et nécessaire. Cette prévention nécessite une étude de la sensibilité aux antibiotiques ainsi que la virulence afin de porter un traitement particulier aux

personnes concernées. Ces études sont capitales pour le personnel qui pourrait constituer un vecteur de germes multirésistants et virulents vis-à-vis des patients.

Ainsi, l'identification d'une colonisation à *S. aureus* et plus encore à *S. aureus* résistant à la méthilicine (SARM), permet d'identifier les patients à haut risque qui pourraient bénéficier de mesures permettant de diminuer le risque d'infection.

C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à l'étude du portage et de la résistance de *S. aureus* dans les centres d'hémodialyse afin d'interrompre sa transmission et de bien traiter en cas d'infections.

Objectif du travail

Les objectifs de ce travail visent à :

- déterminer la prévalence du portage nasal de *S. aureus* chez les malades et le personnel de quatre centres d'hémodialyse de Fès,
- étudier la résistance aux antibiotiques de l'ensemble des souches isolées vis-à-vis de 18 antibiotiques antistaphylococciques,
- étudier enfin le profil en gènes toxiques chez les souches multirésistantes isolées.

Chapitre I : *Staphylococcus aureus*

S. aureus peut être responsable de trois types de syndromes : les infections suppuratives et les infections non suppuratives toxiques (toxémies staphylococciques).

- Les infections suppuratives impliquent la prolifération bactérienne, l'invasion, la destruction des tissus de l'hôte et la réponse inflammatoire.
- les infections suppuratives toxiques impliquant en plus de la colonisation et l'inflammation, l'excrétion *in situ* de toxines
- Les toxémies staphylococciques impliquent l'action à distance des toxines excrétées par l'espèce.

Le **tableau I** montre un aperçu de l'implication de quelques facteurs de virulence de *S. aureus* dans les infections staphylococciques.

Tableau I : Principaux enzymes et toxines produits par *S. aureus* (Vincenot et al., 2008)

Toxines	Mode d'action	Effets biologiques
Leucocidine	Toxine formant des pores	Lyse les neutrophiles
TSST 1	Superantigène-> : Hyper sensibilité	Activation des leucocytes. Sécrétion des interleukines (III, 2 et TNF), choc toxique.
Exfoliative toxine	Toxine formant des pores	Epidermolyse
α -toxine	Toxine formant des pores	Hémolysines et formation
β -toxine	Toxine formant des pores	de pores dans les Leucocytes
δ -toxine	Toxine formant des pores	membranes de nombreux
γ -toxine	Toxine formant des pores	types cellulaires
Entérotoxines		Intoxications alimentaires
Coagulase	Activation de la prothrombine	Formation du caillot fibrineux
Staphylokinase	Dislocation des caillots	Dissémination de micro-embolies
Nucléase, Lipase, Estérase, Hyaluronidase	Hydrolyse de leur substrat respectif (ADN, lipides, ac. Hyaluronique)	Lésions tissulaires, lésions cutanées, lésions du tissu conjonctif

I. Historique et taxonomie

Les staphylocoques ont été identifiés pour la première fois à la fin du XIX^{ème} siècle. En 1880, Pasteur a isolé ce genre bactérien, dénommé “vibrion pyogénique”, à partir de pus d’anthrax et chez un patient souffrant d’une ostéomyélite. En 1883, Sir Alexander Ogston, chirurgien anglais, donne le nom de staphylocoque pour ce genre bactérien qui ressemble à des grains rassemblés sous forme de Grappe (staphyle).

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif de la famille des micrococcaceae. Parmi les 47 espèces et sous-espèces de staphylocoques décrites, *S. aureus* est une espèce particulière. Elle s’oppose aux autres espèces d’un point de vue phénotypique et clinique. *S. aureus* produit une enzyme appelée coagulase qui le distingue de la plupart des autres espèces regroupées en staphylocoques à coagulase négatif (*S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, etc.) (Lowy, 1998). D’un point de vue clinique, *S. aureus* est l’espèce la plus pathogène et sa virulence a été reconnue dès l’ère pasteurienne.

S. aureus est une bactérie commensale et pathogène, il est responsable d’une grande variété d’infections dont l’expression clinique dépend de la capacité de l’isolat à produire des facteurs de virulence et à interagir avec l’hôte (**Figure 1**) (Lowy, 1998).

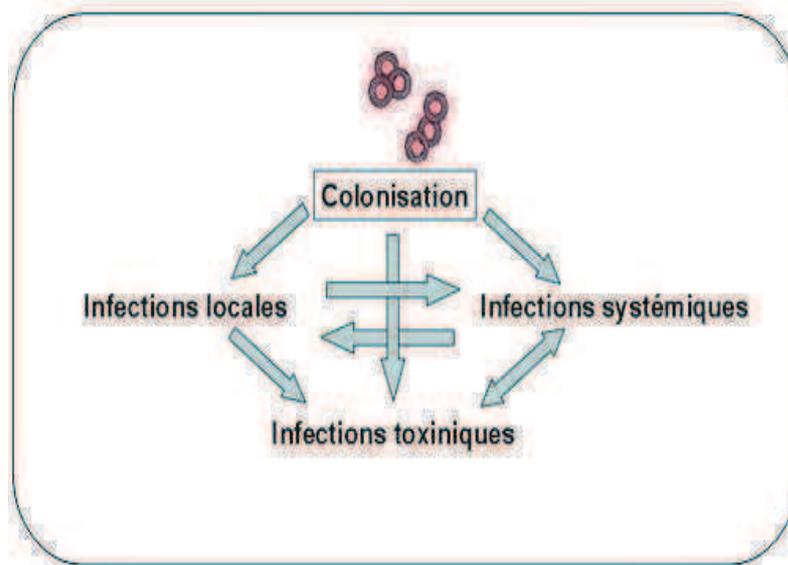


Figure 1. Multiples possibilités d’interactions entre *S. aureus* et son hôte. (Lowy, 1998).

II. Caractères bactériologiques et moléculaires de *S. aureus*

1. Caractères Bactériologiques

S. aureus cultive facilement sur les milieux usuels, à des conditions de pH et de température variables. C'est une bactérie mésophile (37 °C de croissance optimal), neutrophile (pH 7 optimal) et halophile (se développe à de fortes concentrations de NaCl jusqu'à 7%).

Après coloration de Gram, les staphylocoques apparaissent comme des cocci à Gram positif de 0,5 à 1µm de diamètre. Ils sont le plus souvent regroupés, par deux, par quatre ou en petits amas (grappes). Ils sont immobiles, non sporulés et habituellement non capsulés (Bes et Brun, 2002).

S. aureus est une bactérie aéro-anaérobies (capable de se multiplier à la surface de la peau en aérobie et dans les tissus mal oxygénés, comme les plaies profondes, en anaérobiose) ; cultivant facilement en 24 heures sur milieu ordinaire ou sélectif (Chapman). Les colonies observées sur milieu Chapman sont lisses, opaques, convexes et présentent un bord net. La pigmentation jaune à jaune-orangée n'est pas toujours apparente (Bes et Brun, 2002).

S. aureus est catalase positive, capable de fermenter le glucose sans production de gaz et il est capable de fermenter le mannitol mise en évidence sur le milieu de Chapman.

Les caractéristiques chimiques de l'espèce sont : la présence d'une coagulase libre, d'une coagulase liée formant un *clumping factor* avec le récepteur fibrinogène, de la protéine A et d'une DNase thermostable.

2. Génome et biologie moléculaire de *S. aureus*

Le génome de *S. aureus* a été séquencé pour six souches de *S. aureus* (Lindsay et Holden, 2004). Il s'agit d'un chromosome circulaire qui comprend $2,82 \times 10^6$ à $2,9 \times 10^6$ paires de bases (pb). Le contenu en GC est de 33%. 84% du génome est codant, et entre 2592 et 2748 gènes ont été identifiés. *S. aureus* contient en général un plasmide de 20 000 à 25 000 pb contenant une trentaine de gènes (Kuroda *et al.*, 2001).

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

conservées sont impliqués dans la réplication de l'ADN, la synthèse protéique, les fonctions métaboliques.

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

Des techniques d'identification moléculaire basées sur le caractère du génome de *S. aureus* sont ainsi utilisées pour leur identification. L'amplification par la PCR du gène *nuc* codant pour la thermo-nucléase du *S. aureus* a été utilisée comme test de référence à cet effet, mais elle doit être associée à d'autres tests comme celui de la coagulase ou le test de DNase (Kateete *et al.*, 2010).

III. Les facteurs de virulence et physiopathologies de *S. aureus*

Les rapports de *S. aureus* avec ses hôtes font intervenir à l'état commensal comme pathogène divers facteurs de virulence (Wertheim *et al.*, 2005). Il a été démontré que le portage nasal avait un impact significatif sur la survenue d'une infection à *S. aureus* (Corne et Marchandin, 2005) et son pouvoir pathogène est lié aux nombreux facteurs de virulence qu'il est capable de produire (Chavakis *et al.*, 2005).

Chaque isolat est constitué d'une paroi recouverte d'une capsule (éventuellement) et exprime à sa surface des protéines capables d'initier la colonisation de l'hôte (Lowy, 1998). *S. aureus* peut également produire dans le milieu extérieur des exotoxines (dont certaines sont superantigéniques), avant de se disséminer dans l'organisme (Dinges *et al.*, 2000).

1. Facteurs intervenant dans la colonisation et l'adhésion

1.1. La capsule et la paroi de *S. aureus*

Les polysaccharides capsulaires sont présents chez 90% des isolats cliniques de *S. aureus* et sont classés en 11 sérotypes (Verdier et *al.*, 2007). Les polysaccharides capsulaires permettent à *S. aureus* de mieux résister à la phagocytose (Lowy, 1998). Associés aux polysaccharides produits dans le milieu extérieur (PIA pour *polysaccharide intercellular adhesin*), les polysaccharides capsulaires majorent les propriétés d'adhésion de *S. aureus*. Comme pour les autres cocci à Gram positif, la paroi de *S. aureus* est constituée d'acides lipoteichoïques et de peptidoglycane (Lowy, 1998).

Les acides lipoteichoïques interviennent dans l'adhérence grâce à leur domaine hydrophobe et servent de molécule d'ancrage à certaines adhésines par des liaisons électrostatiques, alors que le peptidoglycane lie de manière covalente la plupart des protéines d'adhésion (Foster et Hook, 1998).

1.2. Les protéines d'adhésion exprimées par *S. aureus*

L'adhésion bactérienne est un processus indispensable avant toute invasion des tissus de l'hôte. Elle évite la clearance bactérienne par des phénomènes mécaniques et permet l'action secondaire des toxines. L'adhésion de *S. aureus* est médiée par des forces physico-chimiques (notamment les liaisons hydrophobes des acides lipoteichoïques) mais aussi par des liaisons spécifiques aux différentes molécules du plasma, aux cellules de l'hôte et aux éléments de la matrice extracellulaire grâce à l'expression de nombreuses adhésines (Foster et Hook, 1998).

Les adhésines de *S. aureus* font partie de la famille des MSCRAMM (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) (Foster et Hook, 1998). Ces protéines ont en commun plusieurs domaines : l'extrémité N-terminal constituée par le domaine S ; des domaines uniques ou répétés (A, B, C, D ou R, contenant le site de liaison au ligand) ; et une séquence à l'extrémité C-terminal constituée d'une région W, d'une région M (permettant l'ancrage dans la membrane cytoplasmique) encadrant un motif LPXTG (liaison covalente au peptidoglycane) (**figure 2**) (Foster et Hook, 1998).

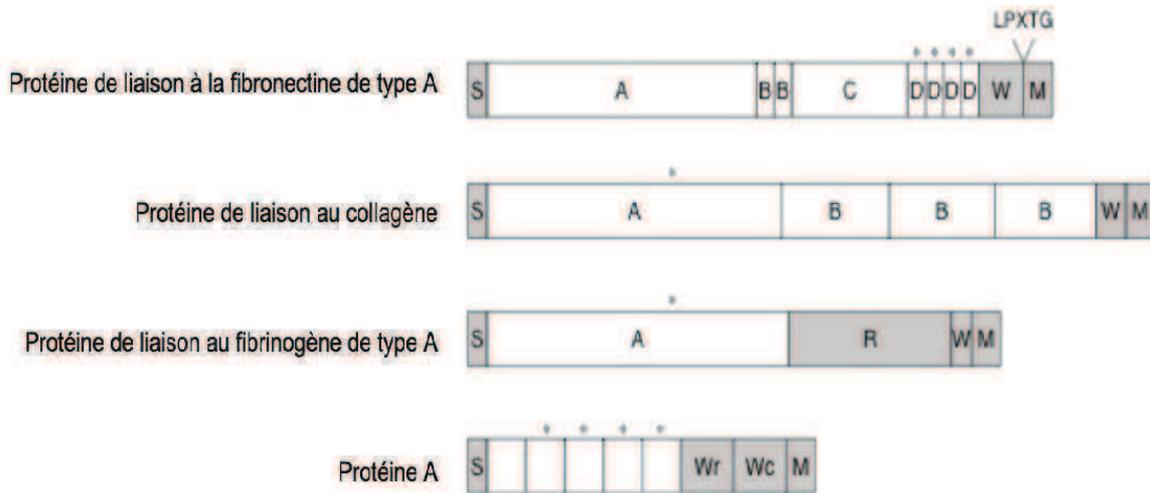


Figure 2. Structure des MSCRAMM avec les domaines S (peptide signal), A, B, C, R (contenant les sites de fixation au ligand représentés par *) W et M (ces derniers étant séparés par le motif LPXTG). D'après Foster et Hook (1998).

Les adhésines les mieux caractérisées sont celles qui reconnaissent la fibronectine, le fibrinogène, le collagène, l'élastine, la laminine et la sialoprotéine osseuse.

1.2.1. La protéine A

Elle est considérée comme une MSCRAMM car elle se lie au facteur de von Willebrand (un peptide présent au niveau de l'endothélium lésé). La protéine A peut de ce fait jouer le rôle d'une adhésine au début d'une infection intra-vasculaire. De plus, la protéine A possède deux domaines de liaison aux immunoglobulines : un fixant le fragment Fc et l'autre le fragment Fab. L'interaction protéine A-fragment Fc des immunoglobulines interfère avec l'opsonisation anticorps-dépendant tandis que l'interaction protéine A-fragment Fab entraîne une activation polyclonale des lymphocytes B.

1.2.2. 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 constitue un facteur de virulence important dans les infections osseuses et articulaires à *S. aureus* (Buckingham et al., 2004).

1.2.3. 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.

1.2.4. 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.

D'autres protéines sont impliquées dans l'adhésion, notamment les sidérophores, indispensables à la croissance des staphylocoques ; la Staphylokinase dont son action fibrinolytique, expliquant les micro-embols essaimant, est à l'origine de la constitution de métastases infectieuses (Collignon et *al.*, 1998).

Récemment, des adhésines non exprimées à la surface de *S. aureus* mais produites dans le milieu extérieur ont été décrites. Cette famille d'adhésine se nomme SERAM (secretable expanded repertoire adhesive molecules) et comprend la protéine de liaison au fibrinogène extracellulaire (Efb), la protéine de liaison à la matrice extracellulaire (Emp) et la protéine d'adhésion extracellulaire (Eap) (Chavakis et *al.*, 2005).

2. Facteurs impliqués dans la lyse cellulaire et l'envahissement tissulaire

2.1. Facteurs de lyse cellulaire

S. aureus a la capacité de lyser les cellules et les tissus de l'hôte grâce à la mise en jeu d'un grand nombre de toxines (Dinges et *al.*, 2000). De ce fait, l'alpha-toxine (ou hémolysine-alpha), la bêta-toxine, la delta-toxine la gamma-toxine (leucocidine lukE-D et M) et la leucocidine de Pantón Valentine (PVL) sont des hémolysines qui forment des pores dans la membrane des cellules endothéliales, des plaquettes, des monocytes et des hétérocytes. Ces pores conduisent à la lyse cellulaire entraînant une libération massive de médiateurs et d'enzyme de dégradation, qui sont à l'origine de lésions nécrotiques des tissus.

2.2. Facteurs impliqués dans l'envahissement tissulaire

2.2.1. Toxines superantigéniques Staphylococciques

Les superantigènes sont un groupe de molécules capables de provoquer une activation polyclonale des lymphocytes T. Vingt-et-une exotoxines superantigéniques staphylococciques ont été individualisées à ce jour (Dinges et *al.*, 2000; Holtfreter et *al.*, 2007; Thomas, et *al.*, 2007). Il s'agit de la toxine responsable du syndrome de choc toxique staphylococcique "*toxic shock syndrome toxin-1*" (TSST-1 codée par le gène *tst*) et de 20 entérotoxines (*Staphylococcal Enterotoxin* [SE] ou *Staphylococcal Enterotoxin-like* [SEI] lorsque la toxine ne possède pas de propriétés émétiques) : SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEP, SEIQ, SEIR, SEIU, SEIU2, SEIV codées respectivement par les gènes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *sep*, *selq*, *selr*, *selu*, *selu2*, *selv* (Thomas et *al.*, 2007).

Les gènes codant pour les exotoxines superantigéniques sont tous localisés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, prophages ou îlots de pathogénicité) (Holtfreter et Borker, 2005 ; Holtfreter et *al.*, 2007). Le gène *sea* et le gène *sep* ont été détectés sur le bacteriophage PhiSa3, au niveau du même locus. Le gène *see* semble lui aussi être localisé sur un phage, distinct de PhiSa3. Les gènes *sed* et *sej* sont localisés conjointement sur le plasmide pIB485 avec le gène *bla* qui code pour la pénicillinase. Le gène *selr*, récemment découvert, est localisé avec les gènes *sed* et *sej* sur le pIB485 ou seulement avec *sej* sur un autre plasmide. Les gènes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* et *selo* sont regroupés sur un opéron dénommé *egc* pour *enterotoxin gene cluster*. Cet opéron est localisé sur un îlot de pathogénicité (SaPI ; *Staphylococcus aureus Pathogenicity Islands*) dénommé SaPI3 avec deux autres groupes de gènes nommés *serin protease gene cluster* et *leucocidin gene cluster* (Holtfreter, et *al.*, 2007).

Les îlots de pathogénicité sont des segments d'ADN chromosomique de grande taille probablement d'origine phagique qui portent divers gènes de virulence dont au moins un gène codant une exotoxine superantigénique (Novick, 2003). Cinq îlots de pathogénicité ont été décrits chez *S. aureus* (**Figure 3**) (Holtfreter et Borker, 2005 ; Holtfreter et *al.*, 2007). Quatre d'entre eux appartiennent à la famille des TSST-1 *islands* et possèdent les gènes *tst* ou *seb* et sont associés à *sec*, *sel*, *seq* ou *sek*. Ces îlots de pathogénicité peuvent s'exciser et se répliquer de manière autonome. Ils possèdent tous le gène *int* à l'une de leur extrémité qui code pour une intégrase nécessaire à l'intégration des TSST-1 *islands* dans le génome de *S. aureus* (Holtfreter et Broker, 2005 ; Holtfreter et *al.*, 2007).

(A) SaPI1 – TSST-1 islands



(C) SaPI3 – enterotoxin island

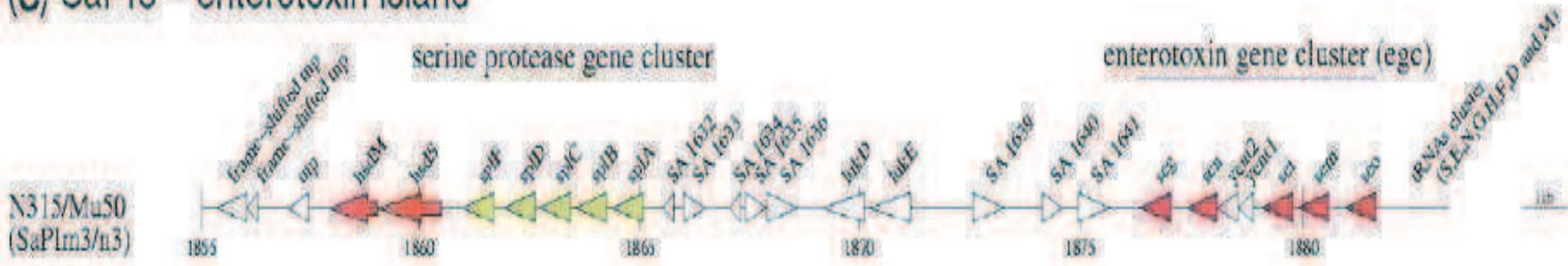


Figure 3. Les îlots de pathogénicité de *S. aureus* comportant des gènes codant des exotoxines superantigéniques. En rouge, gène codant les exotoxines superantigéniques ; en jaune, gène de sérine protéase (*spl*) ; en bleu foncé, gène d'intégrase (*int*) ; en bleu clair, gène de terminase-like ; en blanc, cadre de lecture ouverts de fonction inconnus ; *tnp*, gène de transposase ; *luk*, gène de leucocidine. D'après Holtfreter et Broker 2005.

2.2.2. Les exfoliatines produites par *S. aureus*

Quant aux exfoliatines, ce sont des sérines protéases épidermolytiques impliquées dans certaines pathologies cutanées spécifiques (Ladhani, 2001). Elles ont pour cible la desmogléine-1 qui est un des composants essentiels de l'adhésion intercellulaire au niveau de la peau et des muqueuses. Il existe trois exfoliatines : l'exfoliatine A (ETA pour *exfoliatin toxin* [ET] A), l'exfoliatine B (ETB) et l'exfoliatine D (ETD). ETA est une protéine thermostable codée par un gène localisé sur le chromosome, alors qu'ETB est thermolabile et codée par un gène localisé sur un plasmide (Ladhani, 2001).

D'autres toxines staphylococciques ont été également décrites notamment, les facteurs EDIN A, B, C (*epidermal cell differentiation inhibitors*) qui sont des toxines ADP-ribosylant les protéines G hétérotrimériques. Cependant, si leur fonction est caractérisée, leurs implications dans la virulence restent à élucider (Vincenot et al., 2008).

Le **tableau II** (page 16) donne l'état des lieux des connaissances concernant l'implication des facteurs de virulence dans les infections sévères à *S. aureus* (Ferry, 2007).

3. Dissémination et régulation de la virulence de *S. aureus*

La dissémination hématogène de *S. aureus* est liée à l'expression coordonnée des différents facteurs de virulence en fonction de la densité bactérienne (Dufour et al., 2000). Plusieurs régulateurs, dont le locus *agr* (*accessory gene regulator*) est le principal, interviennent dans ce programme séquentiel (Dufour et al., 2000). Le locus *agr* fonctionne selon un système de *quorum-sensing* à deux composants, l'un senseur appelé AgrC sensible à la concentration d'un peptide auto-inducteur, et l'autre régulateur de réponse appelé AgrA dont l'activation entraîne la production de l'effecteur du système, appelé ARNIII. Ce dernier est indispensable à la transcription et/ou à la stabilisation des ARNm des exoprotéines et réprime la production des protéines de paroi comme les adhésines. Ainsi, lorsque la densité bactérienne est faible *in vitro*, le système *agr* n'est pas activé et la synthèse des protéines d'adhésion prédomine sur la synthèse des exoprotéines (**Figure 4**). A l'inverse, lorsque la densité bactérienne augmente, la synthèse des enzymes (protéases, nucléases, lipases) et des hémolysines prédomine sur la synthèse des protéines d'adhésion permettant *in vivo* l'extension du foyer infectieux en favorisant la diffusion locale et générale de l'infection (Dufour et al., 2000).

Tableau II. Facteurs de virulence potentiellement impliqués dans chacune des infections graves à *S. aureus*. PAVM, pneumopathie acquise sous ventilation mécanique ; EI, endocardite infectieuse ; NTED, neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease ; TSST-1, toxic-shock-syndrome- toxin-1 ; SEA, staphylococcal enterotoxin A ; ETA, exfoliatin toxin A (Ferry, 2007).

Pathologies graves à <i>S. aureus</i>	Facteurs de virulence	Mécanisme d'action
Infections suppuratives		
PAVM	Acide lipoteichoïque et peptidoglycane Protéine A Protéine de liaison à la fibronectine Alpha-toxine	Recrutement et activation des cellules de l'immunité innée par interaction avec le TLR2 Production de cytokines Th-1 en interagissant avec le récepteur R1 au TNF-alpha Adhésion à l'épithélium respiratoire Lyse de l'épithélium respiratoire et destruction de la membrane alvéolo-capillaire
Infection de cathéter	Protéine de liaison au fibrinogène Protéine de liaison à la fibronectine Adhésine intercellulaire PIA	Adhésion à la fibronectine recouvrant l'interface Adhésion au fibrinogène recouvrant l'interface Persistance par production de biofilm
EI et autre infection endovasculaire	Coagulase Protéine de liaison au fibrinogène Protéine de liaison à la fibronectine Protéine A Alpha-toxine Adhésine intercellulaire PIA	Transformation du fibrinogène en fibrine par activation de la prothrombine Agrégation plaquettaire en liant le fibrinogène circulant Agrégation plaquettaire en liant la fibronectine circulante Agrégation plaquettaire en liant le facteur von Willebrand Activation de l'endothélium vasculaire Persistance par production de biofilm (valve prothétique)
Ostéite et ostéoarthrite	Protéine de liaison à la sialoprotéine osseuse Protéine de liaison au collagène Protéine de liaison au fibrinogène Protéine A Adhésine intercellulaire PIA Variants microcolonies	Adhésion au tissu osseux Adhésion au tissu osseux Adhésion au tissu osseux Arthrite par voie hématogène Persistance par production de biofilm (prothèse ou matériel d'ostéosynthèse) Persistance dans les cellules de l'hôte
Choc septique	Acide lipoteichoïque et peptidoglycane Polysaccharide capsulaire de type 5 et 8 Protéine A Protéine de liaison au fibrinogène Alpha-toxine Protéases Staphopain A et B	Activation des cellules de l'immunité innée en interagissant avec le TLR2 Résistance à la phagocytose Agrégation plaquettaire en liant le fibrinogène circulant Résistance à la phagocytose Activation endothéliales, dysfonction myocardique, apoptose Production de bradikinine favorisant une hyperperméabilité vasculaire et une vasoplégie
Pathologies toxiques		
Choc toxique staphylococcique Syndrome d'exfoliation généralisée	TSST-1, SEA, SEB, SEC-E, SEG-I, SEIJ-U ETA, ETB	Activité superantigénique avec production de cytokines Th-1 Epidermolyse
Infections émergentes		
Pneumonie nécrosante	Acide lipoteichoïque et peptidoglycane Protéine de liaison au collagène Protéine A Leucocidine de Panton-Valentine	Recrutement et activation des cellules de l'immunité innée par interaction avec le TLR2 Adhésion à la membrane basale de l'épithélium respiratoire Lyse et apoptose des polynucléaires neutrophiles, nécrose du parenchyme pulmonaire Production de cytokines Th-1 en interagissant avec le récepteur R1 auTNF-alpha
Infection grave des tissus mous et fasciite nécrosante	Leucocidine de Panton-Valentine egc	Lyse et apoptose des polynucléaires neutrophiles, nécrose des tissus mous Adhésion
Ostéomyélite grave de l'enfant	Leucocidine de Panton-Valentine	Lyse et apoptose des polynucléaires neutrophiles, abcès sous-préiosté, extension aux tissus mous
NTED	TSST-1	Activité superantigénique avec production de cytokines Th-1
Purpura fulminans et syndrome de	TSST-1, SEB, SEC Leucocidine de Panton-Valentine	Activité superantigénique avec production de cytokines Th-1 Lyse et apoptose des polynucléaires neutrophiles

Au cours d'une dissémination hématogène, *S. aureus* favorise la formation de microthrombi et de métastases septiques. Dans un premier temps, la coagulase, qui est une SERAM, transforme la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa) dans le sang circulant. Par la suite, la production d'une staphylokinase (enzyme fibrinolytique) fragmente le caillot et favorise la survenue de métastases septiques (Chavakis et al., 2005).

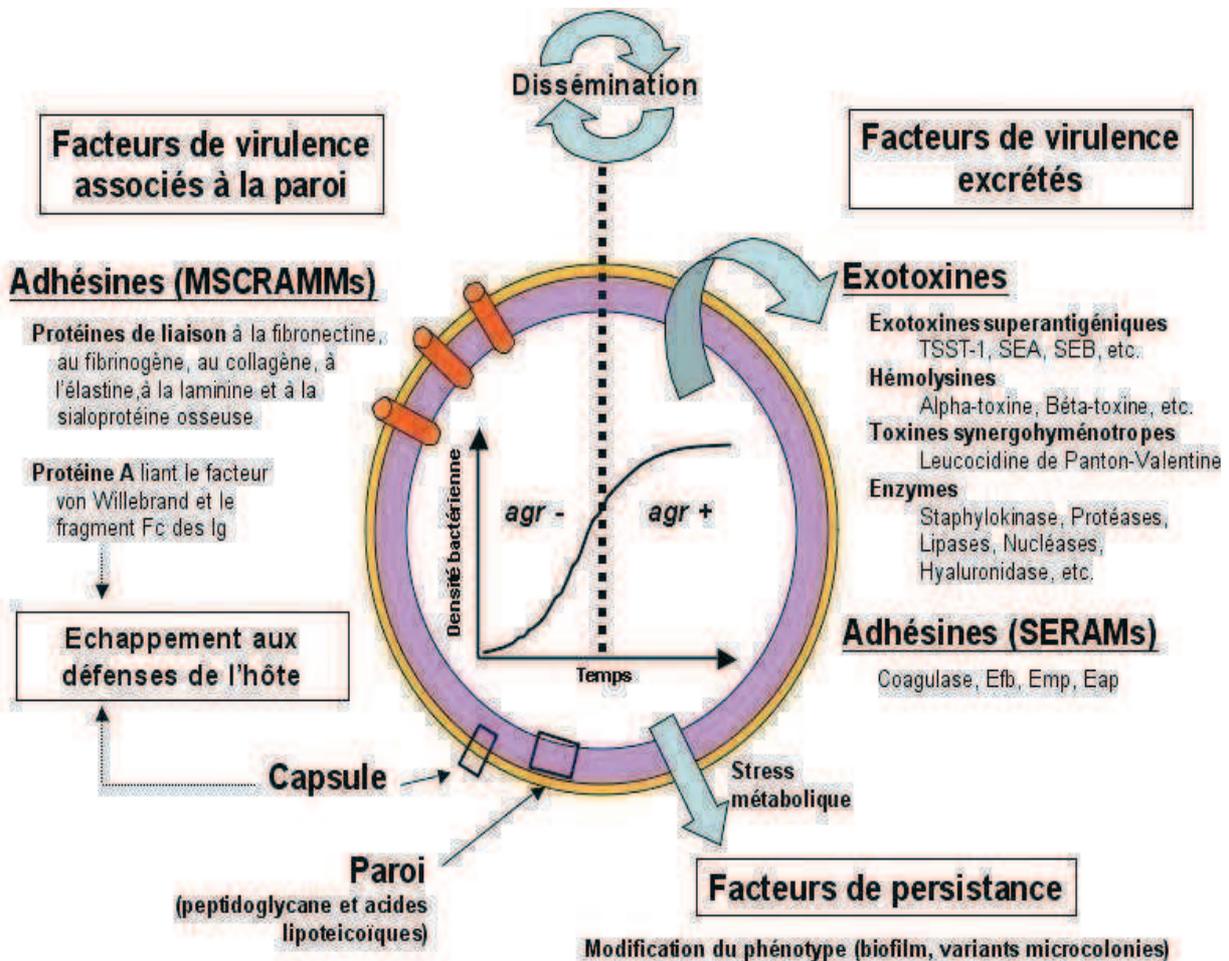


Figure 4 : Facteurs de virulence exprimés à la surface ou excrétés par *S. aureus* en fonction de la densité bactérienne (Chavakis et al., 2005).

4. Persistance dans l'organisme

Après invasion cellulaire et/ou dissémination dans l'organisme, *S. aureus* est capable de persister des mois et des années, notamment dans les os ou au contact de matériel (Plouin-Gaudon et al., 2006). La production de biofilm et/ou de variants microcolonies sont les deux principales voies d'adaptation (von Eiff et al., 2006). Les bactéries qui constituent le biofilm ralentissent leur métabolisme, réduisent leur cinétique de multiplication et peuvent entrer en phase de dormance (Yarwood, et al., 2004).

IV. Epidémiologie de *S. aureus*

1. Réservoirs de *S. aureus*

S. aureus est un germe commensal de la peau et des muqueuses (Kavakis *et al.*, 2005), mais sa niche écologique dominante est la partie antérieure du nez (Kluytmans *et al.*, 1997). L'Homme est le principal réservoir de *S. aureus*, le taux de portage nasal varie selon la population étudiée, les méthodes de prélèvement et de culture. Nouwen *et al.*, 2004 ont déterminé trois modes de portage nasal chez les individus sains :

- porteurs permanents ~ 20% (12-30%) : colonisés le plus souvent par une seule souche de *S. aureus* sur une longue période ; la charge bactérienne est importante donc la dispersion et le risque d'infection sont très élevés ;
- porteurs intermittents ~ 30% (16-70%) : colonisés par différentes souches au cours du temps ;
- non porteurs ~ 50% (16-69%).

2. Modes de transmission

La transmission de *S. aureus* est interhumaine directe ou indirecte (via l'environnement) par voie manuportée. Il existe aussi des possibilités de contamination par voie aérienne impliquant des aérosols (5 µm de diamètre) ou de particules en suspension (poussière) (Wertheim *et al.*, 2005).

Les clones hospitaliers (notamment les SARM) diffusent dans les hôpitaux du fait de la pression de sélection des antibiotiques et par manuportage via le personnel soignant (Wertheim *et al.*, 2005).

Les principaux facteurs d'acquisition de SARM hospitalier sont : l'hospitalisation prolongée (particulièrement en réanimation), et la proximité avec un patient colonisé ou infecté à SARM hospitalier ou une personne travaillant à l'hôpital (Lescure *et al.*, 2006). Les clones SARM communautaires diffusent dans la communauté par des contacts cutanés rapprochés, au sein d'une population à risque (Gonzalez *et al.*, 2008).

Chapitre II : Sensibilité de *S. aureus* aux antibiotiques et les supports génétiques impliqués dans la résistance

S. aureus a développé des résistances à quasiment tous les antibiotiques mis sur le marché dont les deux classes d'antistaphylococciques majeurs (**figure 5**). Les mécanismes impliqués comprennent la synthèse d'enzymes inactivatrices, la modification de la cible des antibiotiques et des systèmes d'efflux qui diminuent la concentration de l'antibiotique dans la bactérie.

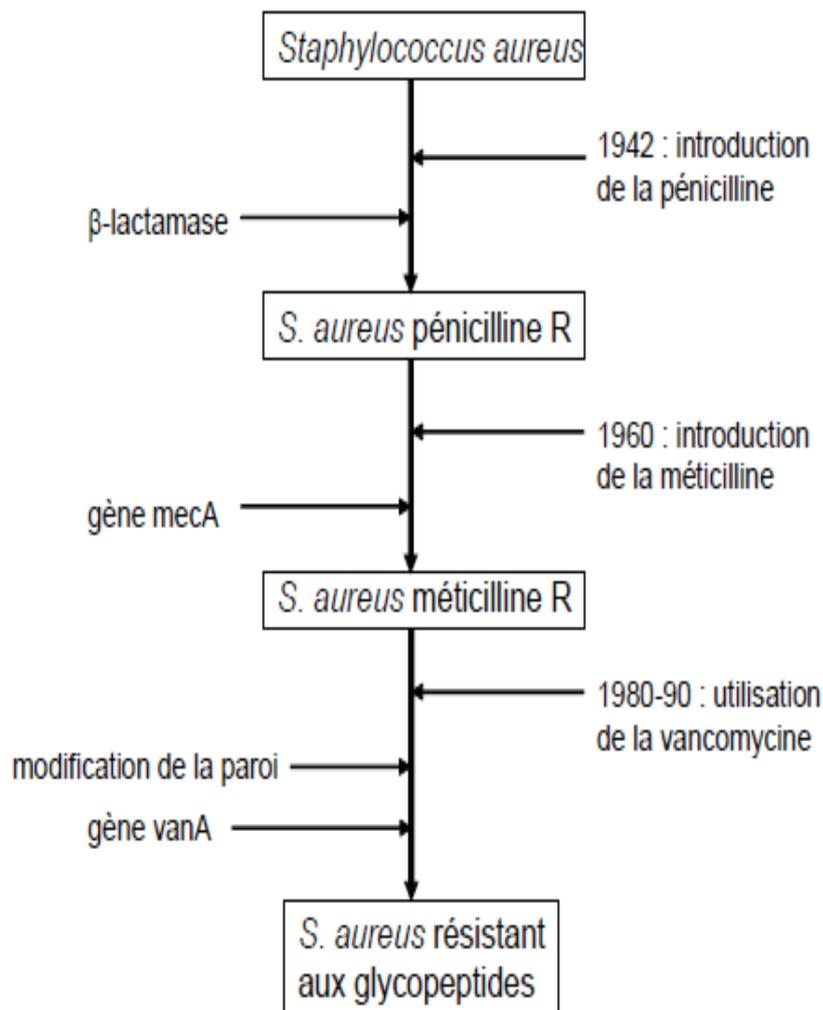


Figure 5 : Utilisation des antibiotiques et acquisition des résistances par *S aureus* (Hardy et al., 2004).

Les antistaphylococciques les plus utilisés appartiennent aux familles suivantes : les bêta-lactamines (l'oxacilline du groupe des pénicillines M), les glycopeptides (vancomycine ou teicoplanine) en cas de résistance ou d'intolérance à cette première classe, les aminosides (gentamicine), permettent d'obtenir une bactéricidie rapide en association à l'une des deux

classes précédentes, et les Fluoroquinolones. D'autres antibiotiques sont également utilisés : les streptogramines (pristinamycine), les macrolides, les lincosamides, le cotrimoxazole, la rifampicine, l'acide fusidique et la fosfomycine. Ces trois dernières molécules sont données en association du fait des fréquences élevées de mutations (Daurel et Leclercq, 2008).

Plus récemment, de nouveaux antibiotiques sont venus renforcer l'arsenal thérapeutique : une oxazolidinone, le linézolide, un lipopeptide, la daptomycine et une glycylicycline, la tigécycline. Les conditions techniques générales pour les méthodes de dilution et de diffusion en milieu gélosé sont référencées dans les recommandations du Comité d'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Daurel et Leclercq, 2008).

I. La résistance aux bêta-lactamines

Les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes), présentent une parenté structurale avec le dipeptide D-Ala-D-Ala constitutif de la paroi, ce qui leur permet d'inhiber l'action des enzymes associées à la synthèse du peptidoglycane. Actuellement, 80 % à 95 % des souches de *S. aureus* sont résistants aux bêta-lactamines rendant leurs indications obsolètes. Deux mécanismes de résistance sont décrits, la production de pénicillinase et la modification de la cible des bêta-lactamines (Felten et *al.*, 2002).

1. Résistance à la pénicilline par production de pénicillinase

L'expression de la pénicillinase plasmidique est inductible par les bêta-lactamines, elle se traduit par une large dispersion des CMI de la pénicilline et de l'amoxicilline. L'interprétation de l'antibiogramme peut ainsi être difficile pour des CMI limites. Par la méthode de diffusion en gélose, la détection de cette résistance se fait en utilisant un disque de pénicilline G chargé à 6µg (CA SFM, 2011).

➤ Les souches sensibles à la pénicilline ont un diamètre d'inhibition largement supérieur à 29 mm, et la zone d'inhibition présente une bordure floue faite de colonies s'amenuisant et devenant transparentes, réalisant une « zone fantôme » (**figure 6A**).

➤ Les souches résistantes à la pénicilline G ont un diamètre variable (souvent inférieur à 25 mm). La zone fantôme est remplacée par des colonies opaques de grande taille, réalisant une bordure nette avec parfois des colonies « squatters » occupant la zone d'inhibition (**figure 6B**). Cet aspect est caractéristique de la présence d'une pénicillinase sans qu'aucun

test additionnel ne soit nécessaire. La présence de pénicillinase pourrait être vérifiée par un test à la nitrocefine (méthode enzymatique) en prenant les colonies induites par une pénicilline (colonies en bordure de disque).

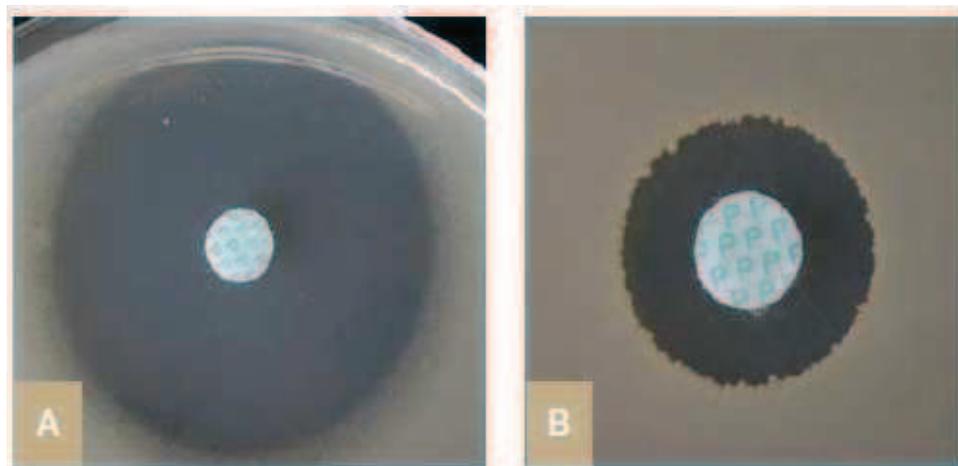


Figure 6 – Aspect de la bordure de la zone d’inhibition autour d’un disque de pénicilline avec les aspects typiques de zone fantôme pour une souche de *S. aureus* non productrice de pénicillinase (A) et un aspect d’arrêt net de croissance avec grosses colonies pour une souche productrice de pénicillinase (B)

2. Méthicillino-résistance par modification de cible.

Le principal mécanisme de résistance à la méthicilline est lié à la modification de la cible des bêta-lactamines, le PLP (Protéines liant les pénicillines). Cette résistance est due à la production d’une PLP additionnelle, la PLP2a (ou PLP2’), qui se surajoute aux PLP «normales». En présence de bêta-lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes), les PLP sont inhibées, sauf la PLP2a. Cette protéine a une faible affinité pour les bêta-lactamines, contrairement aux autres PLP, et elle est capable de réaliser à elle seule la polymérisation de la paroi bactérienne.

La résistance peut être homogène (exprimée par toutes les souches) ou hétérogènes (exprimée par une proportion de colonies filles issues d’une colonie mère exprimant la résistance) (Felten et *al.*, 2002).

2.1. Génétique de la résistance à la méthicilline

Le gène qui code pour la PLP2a est le gène *mecA* (Chambers, 1997). Il est transporté dans un élément génétique appelé « Staphylococcal Chromosomal Cassette *mec* » (SCC*mec*) (Katayama et *al.*, 2000). SCC*mec* est un fragment de 21-67 kb qui s’intègre dans un site

unique proche de l'origine de réplication du chromosome de *S. aureus*. Il véhicule des copies de plasmides intégrées responsables de la résistance à des antibiotiques autres que les bêta-lactamines. Par analogie avec les îlots de pathogénicité, il peut être considéré comme un îlot de résistance aux antibiotiques. Pour se déplacer, SCC*mec* contient 2 gènes spécifiques qui codent pour des récombinases (*ccrA* et *ccrB*) et tout récemment le *ccrC* (Chongtrakool et al., 2006).

Le complexe génétique *mec* comprend le gène de résistance proprement dit et un système complexe de régulation avec deux systèmes répresseurs/anti-répresseurs de la transcription, *mecI/mecR1* et *blaI/blaR1* (Rosato et al., 2003). Le système *mecI/mecR1* exerce une inhibition plus forte que *blaI/blaR1*. Si le système *mecI/mecR1* est fonctionnel, la transcription du gène *mecA* est très fortement inhibée et la souche apparaît sensible avec les techniques usuelles d'antibiogramme. Toutefois, grâce au système *blaI/blaR1*, la méthicilline sera lentement inductrice de la résistance. En pratique clinique, la majorité des souches actuelles ont un système *mecI/mecR1* non fonctionnel et la transcription du gène *mecA* est sous la dépendance de *blaI/blaR1* : dans ce cas la résistance est rapidement inductible par les bêta-lactamines. Des gènes auxiliaires appelés *femA*, *femB*, *femC*, *femD* sont également impliqués dans l'expression de la résistance à haut niveau chez les souches présentant une résistance hétérogène à la méthicilline (Berger-Bachi, 1994).

Actuellement, sept grandes classes de SCC*mec* ont été décrites (type I à VII) sur la base des différents complexes *ccr* (types 1 à 8) et des classes du complexe *mec* (A et B) (Hiramatsu et al., 2001, Chongtrakool et al., 2006 ; Heusser et al., 2007 ; Oliveira et al., 2006). Le type I a été retrouvé dans les premières souches de SARM dans les années 60. Les types II et III caractérisent les souches de SARM isolées actuellement et disséminées dans le monde. Le type IV a été décrit dans les nouvelles souches émergentes de SARM dites communautaires.

Le diagnostic des SARM repose sur la détection du gène *mecA*. L'expression d'une PLP2a peut aussi être recherchée à l'aide de kits commercialisés. Selon les recommandations du CA-SFM, la détection de la résistance peut se faire en utilisant des disques de la céfoxitine ou le moxalactam qui ne nécessite pas de conditions particulières (CA SFM, 2011).

II. Résistance aux glycopeptides

La cible des glycopeptides (vancomycine et la teicoplanine) est le résidu D-ala-D-ala du peptidoglycane. Le mécanisme de résistance à la vancomycine est lié à un épaissement de

la paroi bactérienne qui piège les glycopeptides dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique où le peptidoglycane est synthétisé (Hiramatsu, 2001). La base génétique de la résistance n'est pas encore comprise. Elle n'est pas liée au gène *mecA* (Walsh et Howe, 2002).

Les souches exprimant une résistance de haut niveau à la vancomycine (VRSA) hébergent le gène *vanA* présent habituellement chez les entérocoques résistants aux glycopeptides (Chang *et al.*, 2003 ; Daurel et Leclercq, 2008).

III. Résistance aux aminosides

Les aminosides (kanamycine, tobramycine, gentamicine,...) inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Ils exercent une activité bactéricide rapide qui justifie leur association aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi (oxacilline et vancomycine) pour le traitement des infections graves. Le principal mécanisme de résistance aux aminosides est lié à des modifications de la cible ribosomale par des enzymes codées par des gènes plasmidiques ou transposables (CA SFM, 2011). On distingue trois phénotypes de résistance chez *S. aureus* :

- une résistance de haut niveau à la kanamycine et l'amikacine (phénotype K)
- une résistance de haut niveau à la kanamycine, à l'amikacine et à la tobramycine (phénotype KT)
- une résistance de haut niveau à la kanamycine, à l'amikacine, à la tobramycine et à la gentamicine (phénotype KTG).

Tableau III : Enzymes inactivatrices des aminosides et phénotypes de résistance (Daurel et Leclercq, 2008).

Phénotype ¹	Acronyme du phénotype	Enzyme	Conséquences sur la synergie avec les bêta-lactamines ou les glycopeptides
Kanamycine	K	Aminoside phosphotransférase 3' type III [APH(3')-III]	Pas de synergie avec kanamycine et amikacine
Kanamycine-tobramycine	KT	Aminoside nucléotidyltransférase 4'-4" type I [ANT(4')-(4")-I]	Pas de synergie avec kanamycine, tobramycine et amikacine
Kanamycine-tobramycine-gentamicine	KTG	Aminoside acétyltransférase 6'-phosphotransférase 2" [AAC(6')-APH(2")]	Pas de synergie avec kanamycine, gentamicine, netilmicine, tobramycine, amikacine

IV. Résistance aux macrolides, lincosamides et aux streptogramines

Les macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS) appartiennent au même groupe du fait d'un mode d'action proche (inhibition de la synthèse protéique par fixation sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome bactérien) et d'une résistance fréquemment croisée entre ces antibiotiques. Cependant, ces antibiotiques sont à considérer classe par classe :

- ✓ Les macrolides comprennent : Erythromycine, Clarithromycine, Spiramycine, etc. ;
- ✓ Les lincosamides sont composés de la lincomycine et de la clindamycine ;
- ✓ Les streptogramines sont une association des deux composés, le composé A (pristinamycine IA ou dalfopristine) et le composé B (pristinamycine IIA ou quinupristine). Leur place dans l'arsenal thérapeutique antistaphylococcique est d'autant plus importante qu'ils sont une alternative en cas d'allergie aux pénicillines.

Contrairement aux streptogramines, les macrolides et les lincosamides ne sont pas bactéricides pour *S. aureus* (Daurel et Leclercq, 2008). Plusieurs mécanismes sont décrits dans la résistance aux MLS :

1. Méthylation ribosomale (phénotype MLS_B)

Ce mécanisme de résistance est le plus fréquent (Leclercq, 2002). Il est lié à la modification du ribosome due à la méthylation de l'adénine 2058 de l'ARN ribosomal 23S. Ce groupement méthyle empêche alors toute fixation de l'antibiotique sur sa cible. Cette base étant un site de fixation commun aux macrolides, lincosamides et streptogramines B, la résistance affectera ces trois groupes. Les gènes codant une méthylase sont nommés *erm* (*erythromycin ribosome methylase*). Chez *S. aureus*, les deux principaux gènes identifiés sont *erm(A)* et *erm(C)*.

2. Efflux (phénotype MSB)

C'est le deuxième mécanisme de résistance aux macrolides le plus important chez *S. aureus*. La présence d'une pompe ATP-dépendante codée par le gène plasmidique *msrA* va conférer une résistance par efflux aux macrolides ainsi qu'aux streptogramines B (Leclercq, 2002).

3. Résistance à l'érythromycine et à la lincomycine (phénotype MLS_B constitutif)

Seule la pristinamycine dans ce cas est active, mais la modification de l'activité bactéricide fait discuter son utilisation.

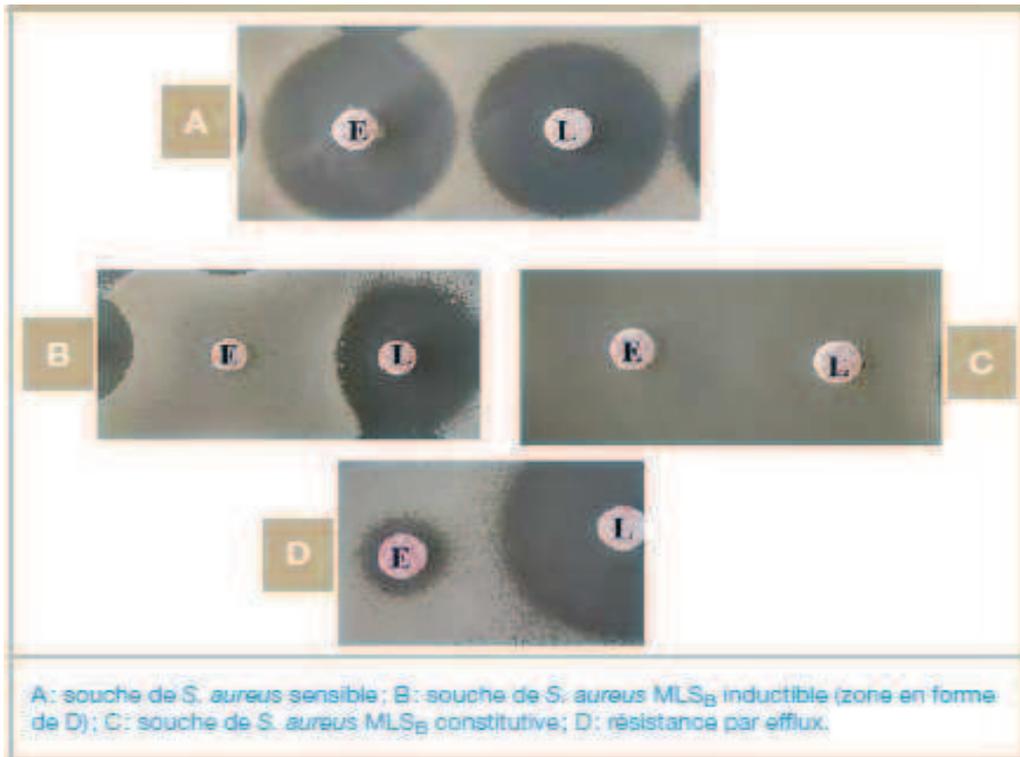


Figure 7 : Phénotype de résistance à l'érythromycine (E), à la lincomycine (L) (Daurel et Leclercq, 2008).

D'autres phénotypes ont été rapportés notamment la résistance isolée à la lincomycine à l'érythromycine et à la pristinamycine.

V. Autres résistances

La rifampicine inhibe l'ARN polymérase ADN dépendante, bloquant ainsi la transcription. Elle est bactéricide, les mutations au sein du gène *rpoB* codant la chaîne bêta de l'ARN polymérase sont responsables du phénotype de résistance à cet antibiotique.

Les fluoroquinolones (Ofloxacin, Péfloxacin, Ciprofloxacine,...) inhibent la croissance bactérienne par arrêt de la croissance. La résistance aux fluoroquinolones est due à une modification de la cible, soit la topo-isomérase IV par mutation des gènes chromosomiques

grlA ou *grlB* soit les sous-unités de la gyrase par une mutation au sein des gènes *gyrA* ou *gyrB*, ou à un système d'efflux grâce à une protéine transmembranaire codée par le gène chromosomique *norA* (Quincampoix et Mainardi, 2001).

Les glycylicyclines dont la tigécycline est le seul représentant de cette sous-classe dérivée des tétracyclines. Cet antibiotique à spectre large est actif contre les souches de staphylocoques hébergeant les classiques mécanismes de résistance aux tétracyclines par protection du ribosome ou efflux actif (Rodloff et *al.*, 2008).

L'association sulfamides et triméthoprim, en raison de leur activité anti-folique, interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques et des protéines. L'association de ces deux molécules est synergique. Cette synergie est maintenue en cas de résistance isolée aux sulfamides, mais pas en cas de résistance isolée au triméthoprim. Chez *S. aureus*, la résistance aux sulfamides est fréquente, souvent par modification de la cible. La résistance au triméthoprim est elle aussi due à une modification de la cible.

La résistance à la fosfomycine est due à la sélection de mutants au niveau du système de transport de la molécule dans la bactérie (gènes *glpT* et *uhp*). La résistance à l'acide fucidique, inhibe la synthèse protéique en interférant avec une GTPase (facteur d'élongation G [EF-G]), empêchant la progression de la chaîne polypeptidique au niveau du ribosome (Daurel et Leclercq, 2008).

Chapitre III : *S. aureus* chez les hémodialysés

I. L'hémodialyse

L'hémodialyse est un moyen de traitement de l'insuffisance rénale. Sa préconisation dépend du statut de chaque patient insuffisant rénal. En effet, l'insuffisance rénale chronique correspond à une altération progressive et permanente des fonctions rénales. Longtemps silencieuse, elle induit pourtant des lésions anatomiques irréversibles qui, au stade terminal, mettent la vie de la personne en danger. L'hémodialyse permet donc un traitement par épuration extra-rénale, chez les insuffisants rénaux chroniques qui sont privés de toute fonction rénale, leur permettant ainsi d'avoir une survie prolongée.

L'hémodialyse est un acte invasif et impose un accès vasculaire itératif, soit sur fistule artério-veineuse native ou prothétique, soit sur cathéter veineux central. De plus, les fonctions immunitaires du patient insuffisant rénal chronique sont altérées :

- par l'insuffisance rénale elle-même qui altère directement ou indirectement les fonctions neutrophile et lymphocytaire ;
- par l'épuration extra-rénale qui induit la libération de cytokines possédant des effets déprimeurs sur le système immunitaire.

Ceci explique pourquoi l'insuffisance rénale dialysée est caractérisée par une fréquence élevée de complications infectieuses et une mauvaise réponse à la vaccination au sein d'une population particulièrement âgée et aux comorbidités nombreuses (diabète, cardiovasculaires, hémopathies, cancers...) (REIN, 2008).

II. Processus de l'hémodialyse et les sites à risques

Le principe repose sur le passage du sang dans un circuit extracorporel au contact d'un liquide de dialyse et au travers d'une membrane semi-perméable. L'épuration est réalisée par osmose et nécessite l'existence d'un accès vasculaire sur fistule artério-veineuse, pontages synthétiques artério-veineux, ou cathéters centraux.

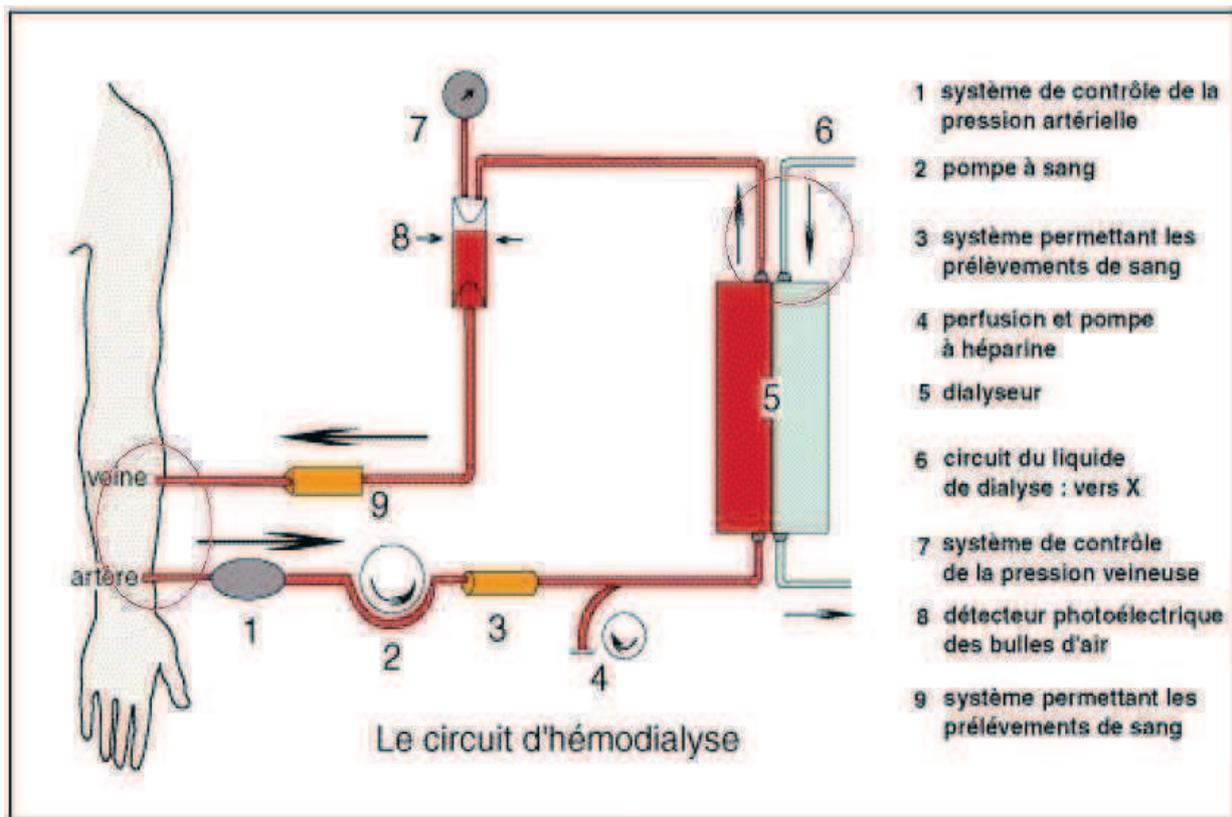


Figure 8 : Circuit d'hémodialyse avec les sites à risque (cercle rouge) de transmission d'agent pathogène.

Toute séance d'hémodialyse comporte le risque de transmission d'un micro-organisme pathogène à chaque niveau du processus (**figure 8**) d'épuration notamment : eau de dialyse, solutions concentrées, générateur, lignes et accès vasculaires (REIN, 2008).

III. Épidémiologie du risque infectieux en hémodialyse

Les infections bactériennes que l'on observe chez les patients dialysés peuvent être de tous types (infections du site d'insertion, tennellites, bactériémies, péritonites, infections métastatiques ostéoarticulaires, endocardites...). Mais en hémodialyse, deux d'entre elles sont d'une importance prédominante en termes de morbidité et mortalité et font l'objet prioritairement de surveillance épidémiologique. Ce sont les infections sur accès vasculaires (IAV) et les bactériémies (BAC) considérées comme des indicateurs de la qualité des soins (DIALIN, 2008).

En hémodialyse chronique, les infections bactériennes représentent la seconde cause de mortalité après les accidents cardiovasculaires, et restent un enjeu de santé publique

(Vandecasteele, 2009). Les bactériémies restent la première cause de décès par infection suivies par les infections de site d'accès (Ayzac, 2009). *S. aureus* est le pathogène le plus fréquent, responsable de 27 à 39% des bactériémies chez les patients dialysés (Dalrymple, 2008).

Dans les infections des accès vasculaires, Les principaux micro-organismes en cause sont en majorité (Dalrymple, 2008) :

- des cocci à Gram positif dans 77,7 % des cas avec 33,2 % liées *S. aureus* (dont 8,9% de SARM), et 29,7 % à *S. epidermidis*,
- les bacilles à Gram négatif : les entérobactéries représentent 10,4 % (*E. coli* : 2,5 % de même que *E. cloacae* et *P. mirabilis*) et *Pseudomonas aeruginosa* 4,5 %.

Pour les Bactériémies, Les germes en cause sont (Ayzac, 2009) :

- des cocci à Gram positif : 61.1% avec 31% de *S. aureus* (5,3% de SARM) et 14.2% de *S. epidermidis*,
- des entérobactéries : 30,1% dont *E. coli* est représenté dans 14,2% et *Enterobacter cloacae* dans 2,6%.

Les risques d'infections virales sont cliniquement représentés par trois virus hématogènes que sont le virus de l'hépatite B (VHB), de l'hépatite C (VHC) et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (REIN, 2008).

Les patients hémodialysés tout comme les patients atteints de diabète ont un risque accru de portage intermittent ou persistant de *S. aureus* dès le début de la dialyse. En plus, les hémodialysés porteurs de *S. aureus* ont de 1,8 jusqu'à 4,7 fois plus de risque de contracter des infections vasculaires et de bactériémies par rapport aux non-porteurs (Wertheim et al., 2005).

IV. Relation entre le portage nasal et les infections à *S. aureus* chez les hémodialysés

L'association entre portage nasal à *S. aureus* et les infections staphylococciques a été décrite pour la première fois par Danbolt en 1931, qui avait étudié les furonculoses. Une étude (Stefaan et al., 2009) a confirmé ce travail, mettant en évidence un génotype identique de la souche responsable de l'infection cutanée et de celle présente au niveau nasal.

En général, les patients hémodialysés ont un portage nasal de *S. aureus* qui varie entre 32 à 82 % (Stefaan et al., 2009). La majorité des patients dialysés portent la même souche sur les mains et dans le nez. Par ailleurs, ces souches sont souvent les mêmes que ceux qui

proviennent des infections successives. Comme dans le cas de la population générale, la majorité des infections à *S. aureus* chez les patients hémodialysés doivent donc être considérées comme des auto-infections (Stefaan et *al.*, 2009).

Des études de cohortes ont démontré que l'âge, le sexe masculin, l'alcool, le cancer, le diabète, l'insuffisance rénale terminale et la dialyse sont des facteurs de gravité d'infections communautaires à *S. aureus* nécessitant une prise en charge en milieu hospitalier. Ces facteurs ont aussi été identifiés comme des déterminants du portage nasal dans les études cas-témoins et transversales (Kluytmans et *al.*, 1997).



PARTIE PRATIQUE



Matériel et méthodes

I. Echantillonnage

1. Population d'étude

La population d'étude était constituée de personnels médicaux et patients de quatre centres d'hémodialyse de Fès. Ces quatre centres étaient composés de deux cliniques privées, du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II (CHU) et de l'hôpital provincial Al Ghassani de Fès. Les patients et le personnel consentants ont été recensés entre janvier et mars 2012. À l'inscription, tous les patients et personnel ont rempli un questionnaire de santé (**annexe 2**) établi par l'Institut Pasteur du Maroc (IPM), et ont subi ensuite le prélèvement nasal. En plus de remplir le questionnaire, les dossiers médicaux des patients sous dialyse ont été revus (toute fois si cela était possible) pour plus d'informations sur la prescription d'antibiotiques, la présence de cathéters ou de fistules intraveineuses, et les antécédentes affections médicales.

2. Questionnaire et recueil des données

Le questionnaire comprenait des questions relatives à l'identité (Nom et Prénom, l'âge, le sexe et l'adresse). Certains facteurs de comorbidités ont été également inclus notamment les hépatites virales C et B (HVC et HVB), l'infection à VIH, tabagisme chronique, l'hospitalisation récente, le diabète et l'antibiothérapie récente ou d'autres antécédents médicaux. Le questionnaire spécifique des patients dialysés comportait également des questions sur le type de dialyse (chronique ou aiguë), la durée de la dialyse, et la méthode de dialyse : cathéter (en général fémoral) ou fistule intraveineuse (Annexe 2, questionnaire d'enquête).

II. Analyse statistique

L'étude statistique a été réalisée en collaboration avec le laboratoire d'épidémiologie, de la recherche clinique et santé communautaire du CHU Hassan II de Fès. Les analyses ont été faites en utilisant le logiciel SPSS statistics version 17.0.

L'analyse des variables qualitatives a été effectuée par les tests non paramétriques : test de chi 2 de Pearson, la correction de Yates et le test de Fisher exacte. Une différence est jugée statistiquement significative si la valeur de p (la probabilité qu'un événement quelconque soit le simple fait du hasard) qui correspond à ces tests est inférieure à 0,05.

Pour les variables quantitatives, le test de Student (T) a été utilisé. Une différence est jugée statistiquement significative si la valeur de p qui correspond à ces tests est inférieure à 0,05.

III. Mode de prélèvement et recueil des échantillons

Les prélèvements ont été effectués par des écouvillons stériles. Le même écouvillon a été utilisé pour les deux narines. Le prélèvement a été réalisé en enfonçant l'écouvillon sec d'au moins 1 cm dans les narines et en le vrillant au moins 3 fois.

Immédiatement après les prélèvements, les écouvillons ont été acheminés directement au laboratoire à la température ambiante et mise en culture sur le milieu Chapman.

IV. Analyses microbiologiques et identification bactérienne

Le portage de *S. aureus* a été recherché par étalement des écouvillons nasaux sur milieu de culture Chapman. Les colonies fermentant le mannitol ont été suspectées comme *S. aureus*.

L'identification bactérienne a été basée sur les critères suivants : l'état frais, la coloration de Gram, la recherche de catalase, la fermentation du mannitol, les tests d'agglutination (Slidex staph[®] plus « bioMérieux, France »), le test de coagulation du plasma de lapin, la galerie API Staph et la recherche du gène *nuc*. Les souches identifiées ont été conservées à -20°C.

Un isolat bactérien n'est identifié comme *S. aureus* que si les conditions suivantes sont remplies : fermentation du mannitol sur milieu Chapman, cocci Gram positif, catalase positif, coagulase libre et liée positives et l'amplification du gène *nuc* positive.

1. Caractère morphologique

N'ont été retenus que les isolats dont la taille des colonies varie entre 0,8 à 1 mm après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, avec un contour lisse, légèrement convexe sur milieu Chapman. Les colonies ont été reconnues par leur pigmentation (couleur jaune à jaune-orange). La coloration de Gram a été effectuée pour chaque isolat présentant l'aspect caractéristique des Staphylocoques. En plus des caractères morphologiques, l'identification a aussi été effectuée sur la base de quelques caractères biochimiques (Frney et al., 2007).

2. Caractères biochimiques

2.1. Recherche de la catalase

Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques (qui sont catalases négatifs). Quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sont déposées sur une lame. A partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures sur milieu MH, quelques colonies sont prélevées et ajoutées au H₂O₂ sur la lame. Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles d'air (oxygène) dans les 5 secondes qui s'en suivent.

2.2. Recherche de la Coagulase libre et liée

Cette recherche a été faite en utilisant deux tests :

- Le test de Slidex[®] Staph plus pour la recherche de la coagulase liée (**annexe 5**), test rapide d'agglutination sur plaquette permettant la détection simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène, de la protéine A et des polysaccharides capsulaires de *S. aureus*.
- Le test de plasma de lapin pour la recherche de la coagulase libre (**annexe 6**) tout en respectant les recommandations des producteurs.

En cas de discordance de positivité entre la coagulase libre et la coagulase liée, d'autres caractères biochimiques ont été recherchés en utilisant la galerie API 20 Staph (**annexe 4**).

2.3. Recherche du gène *nuc* par PCR

Le gène de la nucléase thermostable (gène *nuc*) a été amplifié par PCR pour toute souche exprimant les caractères morphologiques et biochimiques de *S. aureus*.

V. Sensibilité aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion de disques (Bio-Rad, France), en milieu gélosé MH selon les recommandations décrites par le CA-SFM, 2011. Un inoculum de 0,5 McFarland correspondant à 10⁸ UFC/ml a été préparé pour chaque souche bactérienne et le milieu MH a étéensemencé par écouvillonnage ; après 18-24 heures d'incubation à 37°C, la lecture et l'interprétation des antibiogrammes ont été faites. Une

souche de référence du laboratoire de bactériologie de l'IPM, sensible à l'ensemble des antibiotiques testés a été utilisée comme témoin pour l'ensemble des antibiogrammes réalisés.

Le tableau IV montre les différentes familles d'antibiotique utilisé. Au total, 18 antibiotiques ont été utilisés.

Tableau IV : Liste des antibiotiques testés

Antibiotiques			
FAMILLES	NOM	SYMBOLE	charge de disque
Fusidamine	Fusidic Acid (acide fusidique)	FA	10µg
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30 µg
	Teicoplanine	TEC	30 µg
Fluoroquinolones	Péfloxacine	PEF	5 µg
Glycylcylines	Tigécycline	TGC	15 µg
Phenicolés	Chloramphénicol	C	30 µg
Les rifamycines	Rifampicine	RA	30 µg
Aminosides	Kanamycine	K	30 UI
	Tobramycine	TM	10 µg
	Gentamicine	GEN	15 µg
Macrolides	Erythromycine	E	15 UI
Streptogramines	Pristinamycine	PT	15 µg
Lincosamides	Lyncomycine	L	15 µg
Acides fosfoniques	Fosfomycine	FOS	50 µg
Bêta-lactamines	Pénicilline	P	6 µg
	Cefoxitine	FOX	30 µg
	Moxalactam	MOX	30 µg
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30 UI

La lecture interprétative des antibiogrammes a été faite selon les recommandations du CA-SFM (2011). Les diamètres d'inhibition ont été mesurés manuellement à l'aide d'une règle graduée et/ou d'un compas.

La recherche de la résistance à la méthicilline a été effectuée par la méthode de diffusion du disque de céfoxitine et du moxalactam. Un diamètre d'inhibition autour du disque de la céfoxitine de moins de 27 mm témoigne de la suspicion de la présence d'un SARM. La recherche du gène responsable de cette résistance (gène *mecA*) a été réalisée par PCR pour toute souche présentant une sensibilité diminuée à la céfoxitine.

VI. Extraction d'ADN bactérien

L'extraction de l'ADN bactérien a été faite par la technique de choc thermique : à partir d'une culture fraîche de 18 à 24 heures à 37°C sur gélose ordinaire, quelques colonies sont mises en suspension dans 500 µl de l'eau ultra-pure (eau de biologie moléculaire, dépourvue de DNase et ARNase) et portées à l'ébullition (100°C) pendant 10 min puis transférer directement dans la glace (0°C) pendant 5 min. 300µl du surnageant sont ensuite récupérés après une centrifugation de 14500t/min pendant 10 min. Le surnageant contenant l'ADN a été conservé à -20 °C.

VII. Confirmation de l'espèce : recherche du gène *nuc*

Une souche de *S. aureus* n'est définitivement retenue que s'elle possède le gène de la thermo-nucléase (gène *nuc*) dans son génome.

Les réactions de PCR classique sont réalisées dans un volume réactionnel d'amplification de 50 µl contenant en concentration finale du tampon de la Taq PCR 1X concentré ; 1,5 mM de MgCl₂ ; 100 µM de dNTP ; 1 Unité de *Taq* DNA polymérase (Invitrogen) ; 0,4 µM des deux amorces (**Tn1** : 5'GAC TAT TAT TGG ATC AC CTG 3' et **Tn2** : 5'GCC TTG ACG AAC TAA AGC TTC 3') et 2µl d'ADN bactérien extrait par choc thermique. La taille du fragment amplifiée est de 218 pb.

Le protocole d'amplification comprenait : premier cycle avec 5 min à 94°C, 30 cycles de 3 phases (1 min à 94°C, 1 min à 54°C, 1 min à 72°C) et une étape d'élongation de 7 min à 72°C. Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% avec du bromure d'éthidium (0,5µg/ml). Les photos de gels ont été prises sous UV par l'appareil « Gel Doc ».

Pour chaque réaction de PCR une souche de référence (souche D11) a été utilisée comme témoin positif (la souche possède le gène *nuc*) ; la réaction comprenait également un contrôle négatif.

VIII. Recherche du gène *mecA* chez *S. aureus*

Pour les souches dont les diamètres d'inhibitions autour du disque de la céfoxitine sont moins de 27 mm, une PCR multiplex a été réalisée pour rechercher simultanément les gènes *mecA* et *nuc*. La PCR multiplex recherchant simultanément un fragment de 310 pb spécifique au gène *mecA*, et d'un fragment de 218 pb du gène *nuc* (sa recherche a joué un rôle de témoin interne d'amplification et d'identification) a été réalisée en utilisant les deux couples d'amorces déjà décrites (**Tn1** et **Tn2**) (Chesneau et al., 1993) et (**PCSAmecA1** ; **PCSAmecA2**) (Vannuffel et al., 1995).

Les réactions de PCR multiplex sont réalisées dans un volume réactionnel d'amplification de 50 µl contenant en concentration finale du tampon de la Taq PCR 1X concentré ; 1,5 mM de MgCl₂ ; 100 µM de dNTP ; 1 Unité de *Taq* DNA polymérase (Invitrogen) ; 0,4 µM de chacune des amorces (**PCSAmecA1** : 5' TG GCT ATC GTG TCA CAATCG 3', **PCSAmecA2** : 5' CTG GAA CTT GTT GAG CAG AG 3', **Tn1** : 5'GACTATTATTGGATCACCTG 3' et **Tn2** : 5'GCC TTG ACG AAC TAA AGC TTC 3') et 2µl d'ADN bactérien extrait par choc thermique de toute souche suspectieuse de SARM. Pour le protocole d'amplification, il est le même que celui utilisé pour la recherche du gène *nuc* (Cf. recherche du gène *nuc*).

Pour chaque réaction de PCR multiplex une souche de référence (souche D11) a été utilisée comme témoin positif (la souche possède le gène *nuc* et le gène *mecA* à la fois) ; la réaction comprenait également un contrôle négatif.

IX. Recherche de gènes codants pour les toxines staphylococciques

1. Gènes recherchés

Les gènes des entérotoxines staphylococciques (SE) A, B, C, D, H et R (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seh*, et *selr*), des entérotoxines staphylococciques *like* (SIE) K, L, M, O, P, et Q (*selk*, *sell*, *selm*, *selo*, *selp* et *selq*), de la toxine TSST-1 (*tst*), des toxines inhibitrices de la différenciation des cellules épidermiques (EDIN) A, B et C (*edinA*, *edinB* et *edinC*), des exfoliatines ou épidermolysines A, B et C (*eta*, *atb* et *etd*), des leucotoxines M et de Pantone-Valentine (*lukM* et *lukPV*) et de l'hémolysine bêta (*hlyB*) ont été recherchés par des PCR multiplex.

Les entérotoxines au même titre que la TSST-1 sont des superantigènes. La détection des gènes codant pour le SEIM et le SEIO (*selm* et *selo*) signale aussi habituellement la présence des gènes codant pour le SEG, SEI et le SEIN (*seg*, *sei* et *seln*) car ces gènes sont portés par un même élément génétique (le locus *egc* pour *enterotoxin gene cluster*) (Hu et al., 2008). De même, la détection du gène SED (*sed*) signale habituellement la présence du gène codant pour le SEJ (*sej*) car ils sont souvent portés par un même plasmide (Omoe et al., 2003).

La détermination du profil des gènes toxiques des souches de *S. aureus* multirésistantes a été effectuée suite à six réactions de PCR multiplex :

- ✓ PCR multiplex N°1 pour la recherche des gènes : *lukM/seh/selm/tst* en utilisant comme témoin positif les ADN des souches de *S. aureus* du laboratoire de bactériologie de l'IPM : la souche SA61 (*slem/tst/lukM*), SA26 (*seh*).
- ✓ PCR multiplex N°2 pour la recherche des gènes : *etb/sed/selr/sec/eta* en utilisant comme témoin positif les ADN des souches de *S. aureus* du laboratoire de bactériologie possédant les gènes *etb*, *sed*, *selr*, *sec* et le gène *eta*.
- ✓ PCR multiplex N°3 pour la recherche des gènes : *sea/luk-PV/hlb/selp*, en utilisant comme témoin positif les ADN des souches de *S. aureus* du laboratoire de bactériologie positives pour les différents gènes.
- ✓ PCR multiplex N°4 pour la recherche des gènes *seb/selq*, en utilisant comme témoin positif l'ADN des souches de *S. aureus* du laboratoire de bactériologie, positives pour chaque gène recherché.
- ✓ PCR multiplex N°5 pour la recherche des gènes *etd/sell/selo* en utilisant comme témoin positif les ADN des souches de *S. aureus* du laboratoire de bactériologie positives pour les gènes recherchés.
- ✓ PCR multiplex N°6 pour la recherche des gènes *edinA/edinB/edinC/selk* en utilisant comme témoin positif les ADN des souches de *S. aureus* du laboratoire de bactériologie positives pour les différents gènes.

2. Mélanges réactionnels pour les différentes PCR multiplex

Le mélange d'amplification est spécifique pour chacune des six PCR multiplex. La concentration des différents constituants était variable d'une PCR à l'autre :

Pour les PCR multiplex N°1, N°5 et N°6, les mélanges réactionnels ont été réalisés dans un volume final de 40 μ l. Mais en concentration finale, les réactifs nécessaires étaient différents de :

- ✓ 1X du tampon Taq PCR ; 5mM de MgCl₂ ; 0,125mM de dNTP ; 2 Unités de Taq DNA polymérase (Invitrogen) ; 0,187 μ M de chaque amorce et 2 μ l d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°1.
- ✓ 2X du tampon Taq PCR ; 3,75mM de MgCl₂ ; 0,125mM de dNTP ; 1,5 Unités de Taq DNA polymérase (Invitrogen) ; 0,187 μ M de chaque amorce et 2 μ l d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°5.
- ✓ 1X du tampon Taq PCR ; 5mM de MgCl₂ ; 0,125mM de dNTP ; 2 Unités de Taq DNA polymérase (Invitrogen) ; 0,075 μ M de chaque amorce et 2 μ l d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°6.

Alors que pour les PCR N°2, N°3 et N°4, les mélanges réactionnels ont été réalisés dans un volume final de 50 μ l. Mais en concentration finale, les différents réactifs étaient différents :

- ✓ 1X du tampon Taq PCR ; 5mM de MgCl₂ ; 0,125mM de dNTP ; 2 Unités de Taq DNA polymérase (Invitrogen) ; 0,15 μ M de chaque amorce et 2 μ l d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°2.
- ✓ 2X du tampon Taq PCR ; 4 mM de MgCl₂ ; 0,1mM de dNTP ; 2 Unités de Taq DNA polymérase (Invitrogen) ; 0,15 μ M de chaque amorce et 2 μ l d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°3.
- ✓ 2X du tampon Taq PCR ; 3mM de MgCl₂ ; 0,1mM de dNTP ; 2 Unités de Taq DNA polymérase (Invitrogen) ; 0,15 μ M de chaque amorce et 2 μ l d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°4.

3. Les amorces utilisées pour les différentes PCR multiplex

Les amorces utilisées ont été déjà décrites (Holtfreter et *al.*, 2007). Elles sont également utilisées par le centre national de référence (CNR) de Lyon en France.

Les tableaux V à X montrent respectivement les amorces utilisées dans les PCR multiplex 1 (MTX1), PCR MTX2, PCR MTX3, PCR MTX4, PCR MTX5 et la PCR MTX6 ; le nom des gènes et les toxines recherchées ainsi que la taille des amplifiats sont aussi indiqués.

Tableau V : Amorces utilisées pour la détection des gènes *lukM*, *seh*, *selm* et *tst* dans la PCR MTX 1

Toxines	Gènes	Nom amorce	Séquence (5' → 3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
LukM	<i>lukM</i>	luk-M 1	TGGATGTTACCTATGCAACCTAC	23n	780
		luk-M2	GTTCGTTTCCATATAATGAATCACTAC	27n	
SEH	<i>seh</i>	seh 1	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	24n	376
		seh 2	CATCTACCCAAACATTAGGACC	22n	
SEIM	<i>selm</i>	selm1	CTATTAATCTTTGGGTTAATGGAGAAC	27n	300
		selm 2	TTCAGTTTCGACAGTTTTGTTGTCAT	26n	
TSST -1	<i>tst</i>	tst 1	TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT	30n	180
		tst2	TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT	30n	

Tableau VI : Amorces utilisées pour la détection des gènes *etb*, *sed*, *selr*, *sec*, et *eta* dans la PCR MTX 2

Toxines	Gènes	Nom amorce	Séquence (5' → 3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
ETB	<i>etb</i>	etb-1	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	23n	612
		etb-2	AGTGAACCTTATCTTTCTATTGAAAAACACTC	31n	
SED	<i>sed</i>	sed-1	GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG	30n	492
		sed-2	GCTGTATTTTTCCTCCGAGAGT	22n	
SER	<i>selr</i>	ser-1	AGCGGTAATAGCAGAAAATG	20n	363
		ser-2	TCTTGTACCGTAACCGTTTT	20n	
SEC	<i>sec</i>	sec1	CTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACATG	30n	275
		sec-2	CATATCATACAAAAAGTATTGCCGT	26n	
ETA	<i>eta</i>	eta-1	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	23n	190
		eta-2	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTTCATCAAC	30n	

Tableau VI I : Amorces utilisées pour la détection des gènes *sea*, *luk-PV*, *hlb*, et *selp* dans la PCR MTX 3

Toxines	Gènes	Nom amorce	Séquence (5'→3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
SEA	<i>sea</i>	sea-1	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	26n	560
		sea-2	CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC	28n	
PVL	<i>lukSV-PV</i>	pvl-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	31n	433
		pvl-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	27n	
HLB	<i>hlb</i>	hlb-1	GTGCACTTACTGACAATAGTGC	22n	309
		hlb-2	GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	23n	
SEIP	<i>selp</i>	selp-1	GAATTGCAGGGAAGCTGCT	18n	182
		selp-2	GGCGGTGTCTTTTGAAC	17n	

Tableau VIII : Amorces utilisées pour la détection des gènes *seb*, et *selq* dans la PCR MTX 4

Toxines	Gènes	Nom amorce	Séquence (5'→3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
SEB	<i>seb</i>	seb-1	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA	27n	404
		seb-2	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	21n	
SEIQ	<i>selq</i>	selq-1	ACCTGAAAAGCTTCAAGGA	19n	204
		selq-2	CGCCAACGTAATTCCAC	17n	

Tableau IX : Amorces utilisées pour la détection des gènes *etb*, *sell*, *selo* dans la PCR MTX 5

Toxines	Gènes	Nom amorce	Séquence (5'→3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
ETD	<i>etd</i>	etd-1	CAAACATATCATGTATCAAGGATGG	24n	358
		etd-2	CCAGAATTTCCCGACTCAG	19n	
SEIL	<i>sell</i>	sell-1	GCGATGTGTAGGTCCAGGAAAC	20n	235
		sell-2	CATATATAGTACGAGAGTTAGAACCATA	28n	
SEIO	<i>selo</i>	selo-1	AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTA	26n	180
		selo-2	ATCTTTAAATTCAGCAGATATTCCATCTAAC	31n	

Tableau X : Amorces utilisées pour la détection des gènes *edinB*, *edinA/C* et *selk* dans la PCR MTX 6

Toxine	Gène	Nom amorce	Séquence (5'→3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
EDIN	<i>edinB</i>	edinB-1	GACTTAGTTGAAGCTACTAAATGGGG	26n	560
		edinB-2	CAGCATATTCTGTCCCTCTAGG	22n	
	<i>edinA/C</i>	edinA/B-1	GATTTAGATGAGGCAACTAAATGGGG	28n	
		edinA/B-2	CAGCGTATTCTGTGCCCTCTAGG	22n	
SEIK	<i>selk</i>	selk1	ATGCCAGCGCTCAAGGC	17n	134
		selk-2	AGATTCATTGAAAATTGTAGTTGATTAGCT	31n	
		selK-3	TGCCAGCGCTCAAGGTG	17n	

Pour chaque réaction de PCR multiplex, l'ADN des souches de contrôle est inclus comme témoin positif. Pour les témoins négatifs des réactions, l'ADN est remplacé par l'eau de biologie moléculaire (eau ultra pure, libre de DNase et de RNase).

4. Programme d'amplification des différentes PCR multiplex

Le programme de PCR était le même pour les six PCR multiplex. Les conditions d'amplification sont résumées dans le **tableau XI**.

Tableau XI : Condition d'amplification des gènes toxiques

N° PCR multiplex	Nombre de cycle	Température en °C	Durée
PCR MTX1	1	94	5 mn
PCR MTX2	25	94	30 secs
PCR MTX3			
PCR MTX4			
PCR MTX5			
PCR MTX6	1	72	10 mn

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% avec du bromure d'éthidium (0,5µg/ml). Le voltage de la migration était de 120V/45min. Les photos des gels ont été prises sous UV par l'appareil « Gel Doc ».



Résultats

I. Identification bactérienne

Sur les 175 prélèvements nasaux effectués (**Annexe 10**) entre janvier et mars de l'an 2012, au sein de quatre centres hémodialysés de Fès, et en se basant sur les critères d'identifications de *S. aureus* dont la recherche du gène *nuc* (**figure 9**), 62 isolats ont été identifiés comme *S. aureus* soit 36,43% (des exemples de résultat positifs des différents tests sont représentés dans l'**annexe 5, 6, 7 et 8**). Les souches ont été nommées DF1 à DF62 (avec DF : Dialysé de Fès, l'**annexe 9** montre les 62 souches avec leurs caractéristiques). La répartition des 62 souches de *S. aureus* isolées dans les différents centres est représentée dans la **figure 10**.

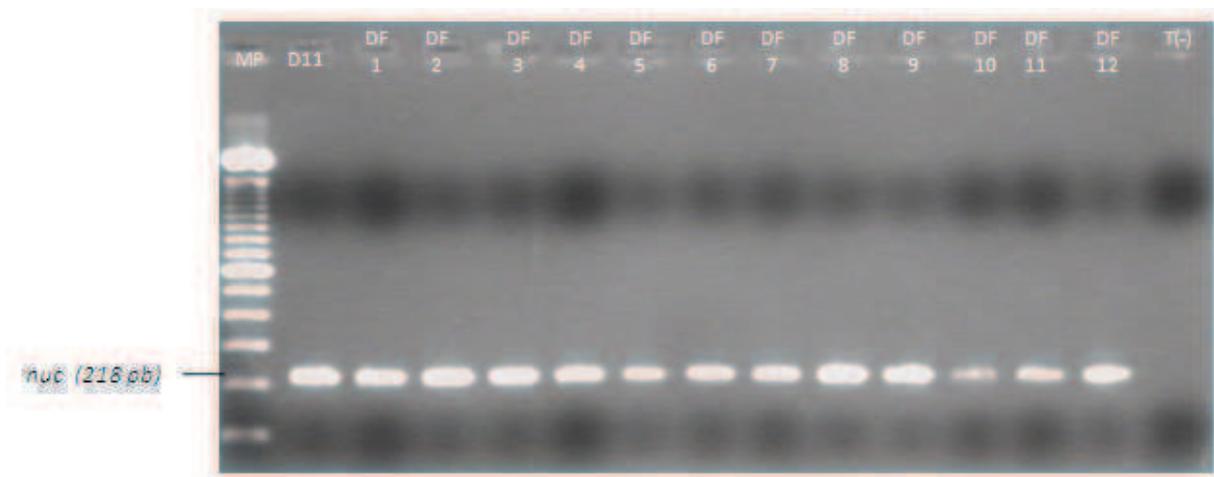


Figure 9 : Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) du gène *nuc* amplifié par PCR pour les souches DF1 à DF12.

MP : Marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder Invitrogen),
D11 : ADN d'une souche de *S. aureus* : contrôle positif pour le gène *nuc*,
T(-) : contrôle négatif.

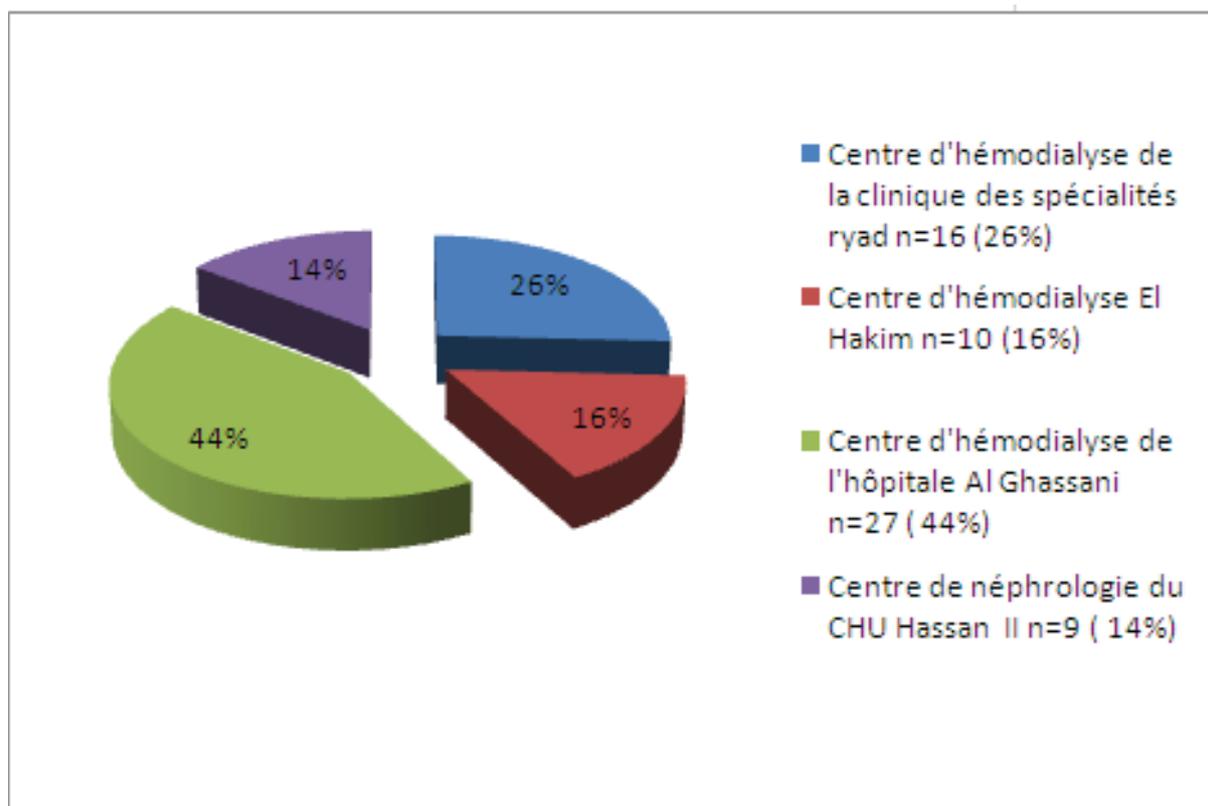


Figure 10 : Répartition des 62 souches de *S. aureus* isolées dans les différents centres.

II. Prévalence du portage nasal de *S. aureus* chez les hémodialysés et caractéristiques des populations d'étude

Les informations recueillies à partir des questionnaires de l'enquête nous ont permis de dresser un tableau résumant les caractéristiques démographiques de notre population d'étude (**Tableau XII**).

En tout, 175 prélèvements nasaux ont été effectués dans les quatre centres d'hémodialyse dont 131 effectués chez les dialysés chroniques (HC), 12 chez les dialysés aigus (HA) et 32 parmi le personnel médical.

Tableau XII: Démographie et caractéristiques des différentes populations d'étude (n, %)

Caractéristique (n=175)	Personnel (n= 32)	Dialysés aiguës (n=12)	Dialysés chroniques (n=131)
Sexe :			
Homme	9 (28,13%)	6 (50%)	70 (53,44%)
Femme	23 (71,87%)	6 (50%)	61 (46,56%)
Moyenne d'âge (en année)	31,87± 10,36	40,41 ± 23,69	51,45 ± 14,38
Diabète :			
Type 1	Néant	1 (8,33%)	11 (8,39%)
Type 2	Néant	Néant	3 (2,29%)
Moyenne de la durée de dialyse (en mois)	Néant	1,67 ± 3,45	71,27 ± 52,24
Présence de Cathéter	Néant	12 (100%)	5 (3,81%)
Sous traitement d'antibiotique	1 (3,12%)	1 (8,33%)	14 (10,68%)
Hospitalisation dans les 12 derniers mois	Néant	9 (75%)	21 (16,03%)
Durée moyenne d'hospitalisation en jour	Néant	8,11± 8,13	14 ±14,16
Patient présentant :			
HVC	Néant	Néant	2 (1,53%)
HVB	Néant	Néant	2 (1,53%)
HIV	Néant	Néant	1 (0,76%)
Tuberculose	Néant	Néant	3 (2,29%)
Affection urinaire	Néant	1 (8,33%)	2 (1,52%)
Angine chronique	Néant	Néant	3 (2,29%)
Tabagisme chronique	Néant	Néant	10 (7,63%)

Type1 : diabète insulino-dépendant, Type 2 : diabète non insulino-dépendant. HCV : hépatite virale C, HVB : hépatite virale B, HIV : infection par le virus du SIDA.

Parmi les 62 souches de *S. aureus*, cinquante ont été isolées chez les hémodialysés chroniques (n=131), six chez les hémodialysés aiguës (n=12) et six ont été isolés chez le corps médical (n=32).

1. Prévalence du portage nasal de *S. aureus* chez les hémodialysés chroniques et caractéristiques associées

Sur les 131 patients hémodialysés chroniques, 50 (38,16%) ont été identifiés porteurs de *S. aureus* dont 62% des hommes et 38% femme, le sex-ratio des patients est de 1,25. La moyenne d'âge des patients porteurs est de 46,66 ± 13,49ans. La durée moyenne d'hémodialyse était de 72,96±52,15 mois (**tableau XIII**).

Aucune différence significative n'a été observée chez les deux groupes de patients (porteurs et non-porteurs) selon le sexe, la durée de l'hémodialyse (72,96 mois contre 70,23),

l'hospitalisation dans les 12 derniers mois, l'antibiothérapie récente, présence de cathéter, le tabagisme chronique le diabète de type 1, les infections à HIV, HVC, HVB, et antibiothérapie récente ($P > 0,05$). Néanmoins, une différence hautement significative a été observée pour le portage de *S. aureus* selon l'âge des patients ($P = 0,002$) (**tableau XIII**).

En se basant sur l'âge, les patients hémodialysés chroniques ont été catégorisés en 3 classes, la première représentée par la population relativement jeune (l'âge se situe entre 18 et 35 ans), la seconde formée d'une population adulte (l'âge varie entre 36 et 50 ans) et enfin la troisième représentant les personnes âgées (l'âge entre 51 et 83 ans) (**tableau XIV**). Le test de Chi 2 de Pearson non paramétrique appliqué à notre étude a donné une relation de dépendance quant au comportement du portage de *S. aureus* selon les trois tranches d'âges. En effet le test a donné une différence hautement significative ($P = 0,02$), rejetant ainsi l'hypothèse nulle d'indépendance. En comparant les pourcentages de portage dans les trois tranches d'âges, nous avons remarqué que la population relativement jeune était plus colonisée suivie par la population adulte et les vieilles personnes étaient les moins colonisées par *S. aureus*.

Tableau XIII : Les facteurs de risque associés au portage nasal de *S. aureus* chez les HC.

Hémodialysés chroniques (n=131)	Porteurs de <i>S. aureus</i> (n=50)	Non-porteurs de <i>S. aureus</i> (n=81)	P
Sexe :			0,1
Homme	31 (62%)	39 (51,85%)	
Femme	19 (38%)	42 (48,14%)	
Moyenne de la durée de la dialyse (mois)	72,96 ± 52,15	70,23 ± 52,60	0,7
Moyenne d'âge	46,66 ± 13,49	54,41 ± 14,20	0,002
Hospitalisation dans les 12 derniers mois	9 (18%)	12 (14,81%)	0,6
Durée moyenne d'hospitalisation dans les 12 derniers mois (en jour)	15,67 ± 18,93	10,75 ± 8,96	0,4
Diabète :			0,2
Type1	5 (10%)	6 (7,40%)	
Type2	Néant	3 (3,70%)	
Présence de cathéter	1 (2%)	4 (4,93%)	0,6
Sous traitement d'antibiotique	5 (10%)	9 (11,11%)	0,8
Tabagisme chronique	5 (10%)	5 (6,17%)	0,6
HVB	1 (2%)	Néant	0,3
HVC	2 (4%)	Néant	0,1
HIV positif	1 (2%)	Néant	0,3

P : degré de significativité

Tableau XIV: Distribution du portage de *S. aureus* en fonction de l'âge des patients (P=0,02)

Tranche d'âge (ans)	Nombre de patients (n=131)	Portage de <i>S. aureus</i> (n, %)	Degré de significativité P
18-35	20	12 (60)	0,02
36-50	45	20 (44)	
51-83	66	18 (27)	

P : degré de significativité

2. Prévalence du portage nasal de *S. aureus* chez les hémodialysés aiguës et caractéristiques associées à l'hémodialyse aiguë.

Parmi les 12 patients en hémodialyse aiguës, six ont été identifiés porteurs de *S. aureus* soit 50%. La moyenne d'âge des patients porteurs était de $37 \pm 26,94$ ans. La durée moyenne d'hémodialyse de ces patients était de $0,94 \pm 1,54$ mois. Chez les hommes, le portage nasal du *S. aureus* est de 16,67% (un patient), il est de 83,33% (cinq patients) chez les femmes, le sex-ratio des patients était de 1. Cette population était caractérisée par la présence d'un cathéter (en générale fémoral) de dialyse.

Le tableau XV montre les résultats de l'analyse des facteurs de risque potentiels pour le portage nasal de *S. aureus* chez les patients en hémodialyse aiguë. Aucune association significative avec portage de *S. aureus* n'a été observée avec les éléments suivants : le diabète de type 1, l'hospitalisation, le sexe et l'antibiothérapie récente.

Tableau XV : Les facteurs de risque associés au portage nasal de *S. aureus* chez le HA

Hémodialysés aiguës (n=12)	Porteurs de <i>S. aureus</i> (n=6)	Non-porteurs de <i>S. aureus</i> (n=6)	P
Sexe :			0,08
Homme	1 (16,67%)	5 (87,71%)	
Femme	5 (83,33%)	1 (14,28%)	
Durée moyenne de la présence de cathéter (en jour)	$4,66 \pm 5,53$	$3,83 \pm 2,63$	0,7
Moyenne de la durée de la dialyse (mois)	$0,94 \pm 1,54$	$2,41 \pm 4,76$	0,4
Moyenne d'âge	$37,83 \pm 26,94$	$43 \pm 22,20$	0,7
Hospitalisation dans les 12 derniers mois	5 (83,33%)	4 (71,42%)	1
Durée moyenne d'hospitalisation dans les 12 derniers mois (en jour)	$9,6 \pm 9,31$	$6,25 \pm 7,22$	
Diabète :			
Type1	1 (16,67%)	Néant	1
Type2	Néant	Néant	
Antibiothérapie récente	1 (16,67%)	Néant	1
Présence de cathéter	6 (100%)	6 (100%)	

P : degré de significativité

3. Prévalence du portage nasal de *S. aureus* chez le personnel des centres d'hémodialyse et caractéristiques associées

Durant notre étude, 32 personnels représentant le staff technique des 4 centres (figure 11), ont été soumis à la recherche du *S. aureus* nasal. Six parmi eux (18,75%) hébergent ce germe. La moyenne d'âge des porteurs est de $29,67 \pm 6$ ans. Chez les hommes, le portage nasal du *S. aureus* est de 33,33% (n=2), il est de 66,66% (n=4) chez les femmes, le sex-ratio est de 0,39. Le tableau XVI montre la prévalence du portage nasal de *S. aureus* chez cette catégorie de personnels.

Tableau XVI : prévalence du portage nasal de *S. aureus* chez le personnel des centres d'hémodialyse

Personnel (n=32)	Porteurs de <i>S. aureus</i> (n=6)	Non-porteurs de <i>S. aureus</i> (n=26)	P
Sexe :			1
Homme	2 (33,33%)	7 (26,93%)	
Femme	4 (66,67%)	19 (73,07%)	
Moyenne d'âge	$29,67 \pm 6$	$32,38 \pm 11,15$	0,5

P : degré de significativité

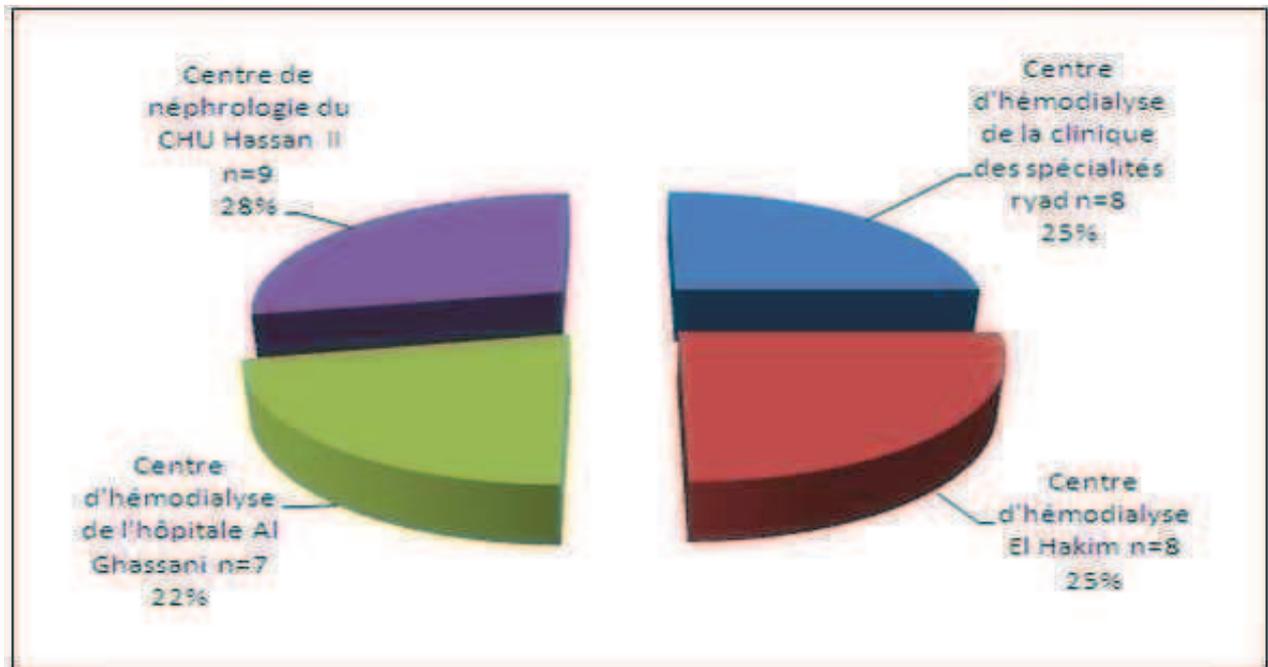


Figure 11 : Répartition des 32 personnes du staff médical des 4 centres d'hémodialyse.

III. Sensibilité des souches de *S. aureus* aux antibiotiques

La sensibilité des 62 souches de *S. aureus* vis-à-vis des 18 antibiotiques testés est décrite dans le tableau XVII. Parmi les souches étudiées, sept (11, 29%) ont présenté le phénotype sauvage avec une sensibilité à l'ensemble des antibiotiques testés. Deux de ces souches ont été isolées chez les hémodialysés aiguës et les cinq autres chez les hémodialysés chroniques. Quarante-trois de nos souches (69,35%) ont montré une résistance isolée à la pénicilline G.

Tableau XVII : Profil de résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées

Antibiotiques	<i>S. aureus</i> : N = 62		
	Nombre de souches isolées qui sont		Taux de résistance (%)
	S	R/I	
Pénicilline G	11	51	82,26
Lincomycine	61	1	1,61
Erythromycine	61	1	1,61
Pristinamycine	62	0	0
Kanamycine	61	1	1,61
Tobramycine	61	1	1,61
Tigécycline	62	0	0
Péfloxacin	60	2	3,23
Acide fusidique	59	3	4,84
Gentamicine	62	0	0
Chloramphénicol	60	2	3,23
Tétracycline	52	10	16,13
Céfoxitine	61	1	1,61*
Rifampicine	59	3	4,84
Fosfomycine	62	0	0
Vancomycine	62	0	0
Teicoplanine	62	0	0
Moxalactam	61	1	1,61*

S : Sensible, **R** : Résistant, **I** : Intermédiaire

(*) : Souches de *S. aureus* exprimant une zone d'inhibition autour de la céfoxitine <27mm (diamètre D=24mm) et du moxalactam < 24mm (diamètre D=23mm). La souche en question possède le gène *mecA*.

Les souches bactériennes ont exprimé un bon niveau de sensibilité aux macrolides et aux antibiotiques apparentés avec 98,36 % pour l'érythromycine et la lincomycine et 100% pour la pristinamycine. Les aminosides restent également très actifs sur ces souches, néanmoins, une (1,64%) parmi elle a exprimé le phénotype K et une autre le phénotype KT.

Un faible taux de résistance a été observé pour la péfloxacin et pour le chloramphénicol avec 3,23 % chacun. Par ailleurs, toutes les souches étudiées étaient sensibles aux glycopeptides (teicoplanine et vancomycine) et à la fosfomycine.

Cependant, une souche (1,64%) a exprimé une inhibition de moins de 27 mm autour du disque de la céfoxitine et moins de 24 mm autour du moxalactam, elle a été suspectée comme un SARM (*S. aureus* résistant à la méthilicine). En se basant sur la recherche du gène *mecA* par PCR, elle a été confirmée comme résistante à la méthicilline par possession de ce gène (figure 12).

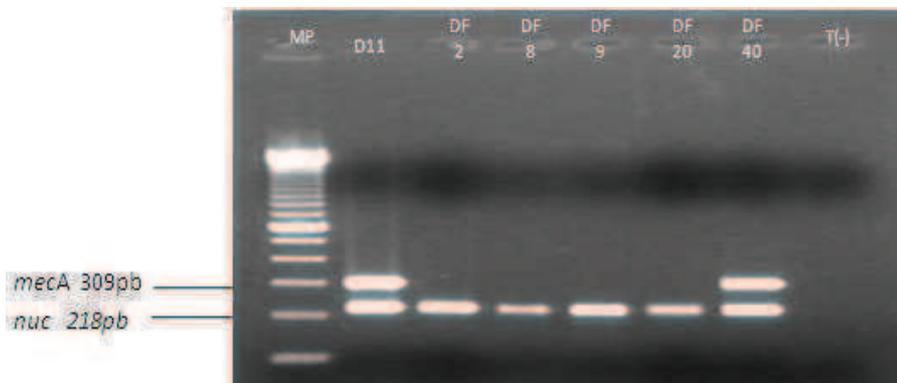


Figure 12 : Révélation après migration sur gel d’agarose des gènes *nuc* et *mecA* amplifiés par PCR multiplex.

MP : Marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder Invitrogen) ;

D11 : ADN d’une souche de *S. aureus* : contrôle positif pour les gènes *nuc* et *mecA* ;

T(-) : control négatif ;

DF 40 : ADN de la souche de *S. aureus* ayant présenté une diminution de diamètre d’inhibition vis-à-vis de la céfoxitine et le moxalactam, et se trouvant positive pour les gènes *mecA* et *nuc* ;

DF2, DF8, DF9 et DF 20 : ADN des souches de *S. aureus* isolées positives pour le gène *nuc* et négatives pour le gène *mecA*.

En fin, nos souches ont montré un taux de résistance assez élevé vis-à-vis de trois antibiotiques : tétracycline, rifampicine et l’acide fusidique, avec un taux de résistance de 16,13% pour la tétracycline et 4,83 % pour l’acide fusidique et la rifampicine.

Le tableau XVIII montre les profils de résistance aux antibiotiques des 62 souches isolées lors de notre travail, ils sont dominés par le phénotype « Pénicilline G » (43/62) suivi par le phénotype « pénicilline G – Tétracycline » (3/62). On observe cependant des associations de

résistance assez variées, avec six souches classées multirésistantes (multiR). Ces souches présentent un phénotype de résistance à au moins trois antibiotiques (tableau XIX).

Nous remarquons que les souches isolées chez les hémodialysés aigus présentaient seulement le phénotype « pénicilline » (4/6) ou le phénotype sauvage (2/6). Contrairement chez les souches isolées des hémodialysés chroniques, le taux de résistance est assez élevé avec des profils de résistance très variés. Notons que toutes les souches multiR isolées lors de ce travail, sont originaires de ces patients (hémodialysés chronique).

Quant aux souches identifiées chez le personnel technique, elles sont résistantes à la pénicilline, une parmi elle est en plus résistante à la rifampicine.

Tableau XVIII : Phénotype de résistance des 62 souches de *S. aureus*

Phénotype de résistance	Nombre de souches
(Sauvage)	7
(P)	43
(P-RA)	2
(P-TE)	3
(K-TM)	1
(FA-TE)	1
(P-C-TE)	2
(PEF-FA-TE)	1
(L-E-PEF-TE)	1
(K-FA-TE-RA)	1
(P-TE-FOX-MOX)	1

P : Pénicilline G, K : Kanamycine, TM : Tobramycine, TE : Tétracycline, E : Erythromycine, L : Lincomycine, C : Chloramphénicol, PEF : Péfloxacine, FOX : Céfoxitine, FA : Acide fusidique, RA Rifampicine, MOX : Moxalactam.

Tableau XIX : phénotype de résistance des 6 souches multiR

Souches multiR	Phénotype de résistance
DF2	P-C-TE
DF8	K-FA-TE-RA
DF9	L-E-PEF-TE
DF20	P-C-TE
DF40	P-TE-FOX-MOX
DF54	PEF-FA-TE

IV. Habillage en gènes toxiques des souches de *S. aureus* multirésistantes

Les six PCR multiplex ont révélé la présence de 11 gènes toxiques parmi les 21 recherchés chez les six souches multiR. Il s'agit des gènes des entérotoxines staphylococciques (SE) A, B, C, D, H et R (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seh* et *selr*), des gènes des entérotoxines staphylococciques like K, L, M, O (*selk*, *sell*, *selm* et *selo*) et du gène de la leucocidine M (*lukM*).

Les figures 13A, B, C, D, E et F montrent le profil de migration sur gel d'agarose des différents gènes amplifiés chez les 6 souches multiR (DF2, DF8, DF9, DF20, DF40 et DF54) par des PCR multiplex.

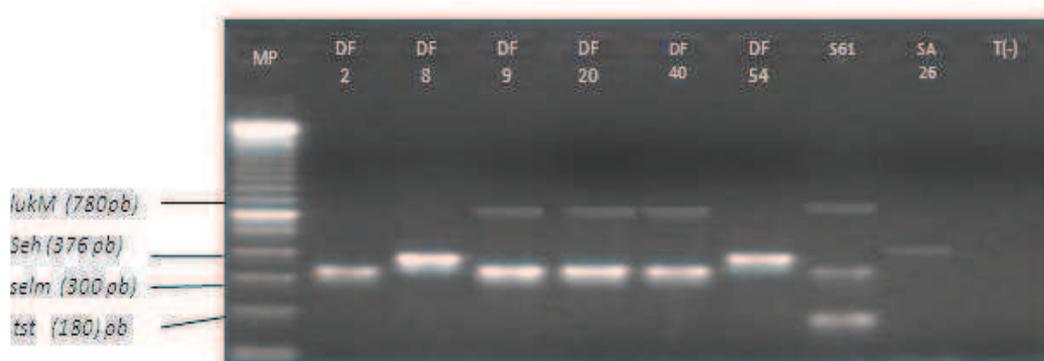


Figure 13A : Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiques amplifiés par PCR multiplex 1 chez les souches de *S. aureus* multiR : gènes recherchés, *lukM*, *seh*, *selm* et *tst*.

MP : Marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder, Invitrogen) ;

DF9, DF20 et DF40 souches positives pour les gènes *selm* et *lukM* ;

DF8, et DF54 souches positives pour le gène *seh* ;

S61 : ADN d'une souche positive pour les gènes *lukM*, *selm* et *tst* : contrôle positif ;

SA26 : ADN d'une souche positive pour le gène *seh* : contrôle positif ;

T(-) : contrôle négatif.

La PCR multiplex 1 révèle la présence de 3 gènes répartis entre les 6 souches multiR. Il s'agit des gènes d'entérotoxine staphylococcique M et H (*selm* et *seh*) et le gène de la leucocidine M (*lukM*).

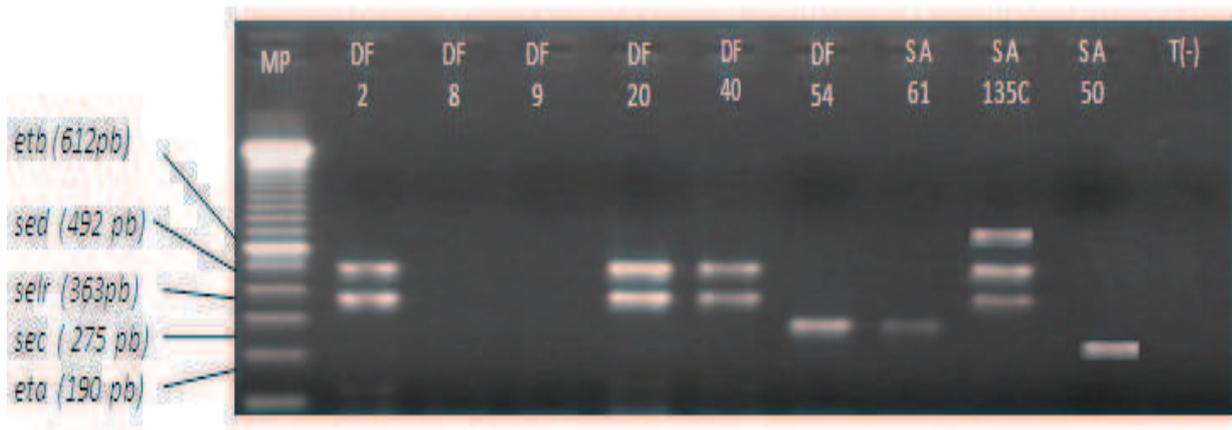


Figure 13B : Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiques amplifiés par PCR multiplex 2, chez les souches de *S. aureus* multiR : gènes recherchés, *etb*, *sed*, *selr*, *sec* et *eta*.

MP : Marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder, Invitrogen),

DF2, DF20 et DF40 souches positives pour les gènes *sed* et *selr* ;

DF54 souche positive pour le gène *sec* ;

SA135 : ADN d'une souche positive pour les gènes *selr*, *sed* et *etb* : contrôle positif ;

SA61 : ADN d'une souche positive pour le gène *sec* : contrôle positif ;

SA50 : ADN d'une souche positive pour le gène *eta* : contrôle positif ;

T(-) : contrôle négatif.

La PCR multiplex 2 révèle la présence de 3 gènes parmi les 5 recherchés. Il s'agit des gènes des entérotoxines staphylococciques C, D et R (*sec*, *sed* et *selr*). Les trois gènes sont répartis entre les souches DF2, DF20, DF40 et DF54.



Figure 13C : Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiques amplifiés par PCR multiplex 3, chez les souches de *S. aureus* multiR : gènes recherchés, *sea*, *pvl*, *hlb* et *selp*.

MP : Marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder, Invitrogen) ;
 DF8 et DF54 : souches positives pour le gène *sea* ;
 SA30B : ADN d'une souche positive pour les gènes *sea*, *pvl* et *hly* : contrôle positif ;
 SA59 : ADN d'une souche positive pour le gène *selp* : contrôle positif ;
 T(-) : contrôle négatif.

La PCR multiplex 3 révèle la présence d'un seul gène parmi les 4 recherchés. Il s'agit du gène de l'entérotoxine staphylococcique A (*sea*). Le gène est porté par les souches DF8, et DF54.



Figure 13D : Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiques amplifiés par PCR multiplex 4, chez les souches de *S. aureus* multiR : gènes recherchés, *seb* et *selq*.

MP : Marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder, Invitrogen) ;
 DF8 souche positive pour le gène *selq* ;
 SA30B : ADN d'une souche positive pour le gène *selq* : contrôle positif ;
 SA96 : ADN d'une souche positive pour le gène *seb* : contrôle positif ;
 T(-) : control négatif.

La PCR multiplex 4 révèle la présence d'un seul gène parmi les 2 recherchés. Il s'agit du gène de l'entérotoxine staphylococcique like Q (*selq*). Le gène est porté par la souche DF8.

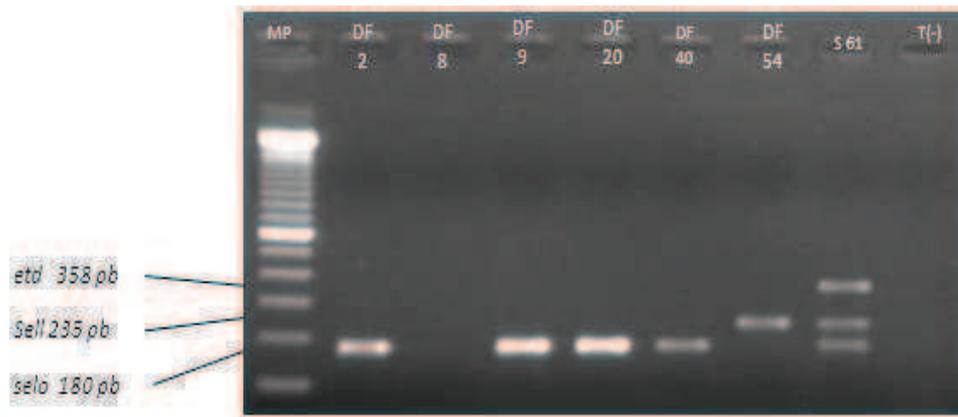


Figure 13E : Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiques amplifiés par PCR multiplex 5, chez les souches de *S. aureus* multiR : gènes recherchés, *etd*, *sell* et *selo*.

MP : Marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder, Invitrogen) ;

DF2, DF9, DF20 et DF40 : souches positives pour le gène *selo* ;

DF54 : souche positive pour le gène *sell* ;

S61 : ADN d'une souche positive pour les gènes *etd*, *sell* et *selo* : contrôle positif ;

T(-) : contrôle négatif.

La PCR multiplex 5 révèle la présence de 2 gènes parmi les 3 recherchés. Il s'agit des gènes des entérotoxines staphylococciques like L et O (*selo* et *sell*). Ils sont portés respectivement par les souches DF2 et DF54.

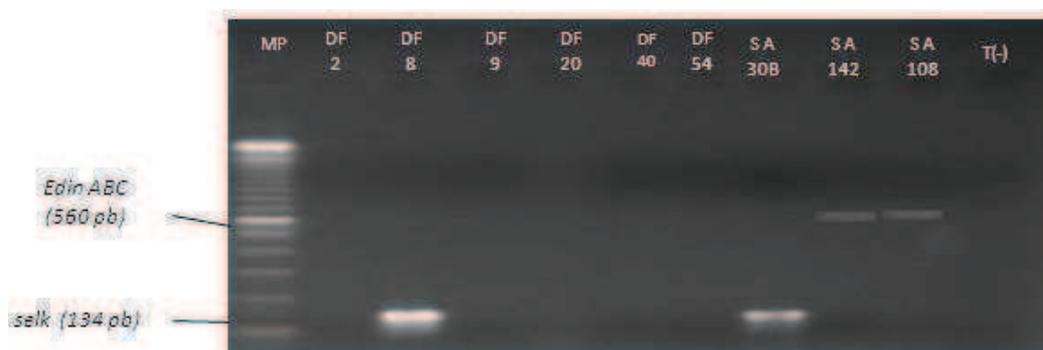


Figure 13F : Révélation après migration sur gel d'agarose (1,5%) des gènes toxiques amplifiés par PCR multiplex 6, chez les souches de *S. aureus* multiR : gènes recherchés, *edinA/C*, *edinB* et *selk*.

MP : Marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder, Invitrogen) ;

DF8 : souche positive pour le gène *selk* ;

SA30B : ADN d'une souche positive pour le gène *selk* : contrôle positif ;
 SA108 : ADN d'une souche positive pour le gène *edinA/C* : contrôle positif ;
 SA142 : ADN d'une souche positive pour le gène *edinB* : contrôle positif ;
 T(-) : contrôle négatif.

La PCR multiplex 6 révèle la présence d'un seul gène parmi les 3 recherchés. Il s'agit du gène de l'entérotoxine staphylococcique *like K (selk)* porté par la souche DF8.

La fréquence de la présence des gènes toxiques amplifiés est assez variée selon les souches multiR (tableau XX). Les gènes des entérotoxines staphylococciques *like M* et *O (selo et selm)* sont les plus fréquents.

Tableau XX : Prévalence des gènes toxiques chez les souches de *S. aureus* multiR.

Gènes toxiques	Nombre de souche multiR (n=6)
<i>selm</i>	4
<i>selo</i>	4
<i>sed</i>	3
<i>lukM</i>	3
<i>selr</i>	2
<i>seh</i>	2
<i>sea</i>	2
<i>selk</i>	1
<i>seb</i>	1
<i>sell</i>	1
<i>sec</i>	1

Par ailleurs, chacune des six souches multiR véhicule trois à cinq gènes toxiques. Les fréquences de combinaison des gènes toxiques sont représentées dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Profil en gènes toxiques chez les 6 souches multiR

Souches multiR	Gènes toxiques
DF9	<i>selm, selo, lukM</i>
DF2	<i>selm, selo, sed, selr</i>
DF8	<i>seh, selk, sea, seb</i>
DF54	<i>seh, sell, sec, sea</i>
DF20	<i>selm, selo, sed, selr, lukM</i>
DF40	<i>selm, selo, sed, selr, lukM</i>



Discussion

I. Prévalence de *S. aureus*

Une meilleure compréhension de la prévalence, et la microbiologie de la colonisation des souches de *S. aureus* est essentielle pour guider les efforts visant à réduire la propagation de souches résistantes aux antibiotiques. De ce fait, notre étude avait donc pour objectif de (1) déterminer la prévalence et les facteurs de risque des patients pour le portage nasal de *S. aureus*, (2) définir la sensibilité aux antibiotiques de l'ensemble des souches de *S. aureus* identifiées et enfin (3) de définir le portage des gènes toxiques des souches multirésistantes chez les différentes populations d'études.

Le portage nasal de *S. aureus* joue un rôle important dans l'épidémiologie et la pathogenèse des infections chez les malades hémodialysés. Le passage de la colonisation de staphylocoque de la muqueuse nasale vers la circulation sanguine est considéré comme la source potentielle d'invasion bactérienne chez ces patients qui nécessitent un abord vasculaire pour des périodes prolongées. De plus, le pouvoir pathogène et le caractère commensal font de ce germe, un agent à transmission facile aussi bien en milieu intra- qu'extrahospitalier (Von et *al.*, 2001).

Au cours de notre travail, parmi les 175 écouvillons nasaux recueillis chez les différentes populations d'étude, 62 ont été confirmés porteurs de *S. aureus*. Les germes isolés de ces écouvillons et qui ont été écartés de notre étude, ont montré une discordance d'identification (par exemple, non fermentation du mannitol, catalase négative, une des deux caogulases testées négative ou une absence du gène *nuc*), ils n'ont donc pas répondu aux critères d'inclusion des souches à étudier. Les souches de *S. aureus* de notre étude étaient originaires de quatre centres d'hémodialyse de Fès. La répartition des différents centres d'hémodialyse sur le territoire de la ville de Fès, nous laisse supposer que nos souches de *S. aureus* représentent les souches qui circulent chez les dialysés de cette ville.

Ce résultat nous laisse supposer, qu'il y aurait des personnes non porteurs de *S. aureus* ou bien des personnes qui le porte de façon intermittente, comme le confirme d'autres travaux publiés dans le même sens. De ce fait, Souly et son équipe en travaillant sur l'épidémiologie et la prévention du portage nasal du *S. aureus* chez l'hémodialysé (Souly et *al.*, 2011), ont conclu qu'il y avait trois catégories de population quant au portage nasal de *S. aureus* : des porteurs permanents, porteurs intermittents et des non-porteurs de *S. aureus*. Notre étude ne nous permet pas de conclure sur ces catégories, néanmoins nous pouvons tout de même situer nos résultats entre les porteurs permanents et/ou les porteurs intermittents de *S. aureus*.

Avec un taux global de 36,43 % (toute population confondue), les différentes populations de notre étude ont cependant montré des taux de portage très différents. Il est de 38,16 % (50/131) chez les hémodialysés chroniques, 50% (6/12) chez les hémodialysés aiguës et de 18,75% (6/32) chez le staff médical des différents centres. La très grande variabilité des effectifs des différents échantillons ne nous permet pas de faire une comparaison aisée entre les trois populations. Mais néanmoins, nous pouvons constater que, selon qu'il s'agit d'hémodialysés chroniques ou aiguës, le portage de *S. aureus* est assez élevé par rapport à celui du personnel médical. Ceci nous laisse incriminer le facteur hémodialyse comme responsable de cette augmentation du portage de *S. aureus*. Cette hypothèse a été déjà confirmée dans divers travaux publiés antérieurement (Nouwen *et al.*, 2004).

Chez le personnel hospitalier de notre étude, le taux de portage est de 18,75%. Ce taux est inférieur à celui décrit pour le portage dans la population générale, 27% (Wertheim, *et al.*, 2005). Mais selon Waldvogel *et al.*, (1995), le personnel hospitalier médical et paramédical présente un taux de portage nasal de *S. aureus* plus important que la population générale. Toutefois, notre étude a montré que le personnel avait un taux de portage bien en dessous de la population générale. Nous pouvons expliquer cette différence par le fait que le personnel des différents centres respecterait les normes d'hygiène et/ou les réglementations en vigueur relatives à l'hygiène.

Notre avons axé notre travail sur les hémodialysés chroniques, chez qui le taux de portage nasal de *S. aureus* est de 38,16 %. Ce taux est comparable à celui rapporté par Montagnac *et al.*, (1995) dans un hôpital de Troyes (France), avec un taux de portage 38,75% chez 80 patients hémodialysés.

Ternois *et al.*, (1993) et Maria Koziol-Montewka *et al.*, (2006), ont publié des taux de portage nasal de *S. aureus* de 31,4% et 27,9%. Ces taux restent inférieurs à celui de notre population. D'autres équipes ont rapporté des taux plus élevés : 44% à Rabat -Maroc- (Souly *et al.*, 2011), 55% en Espagne (Pena *et al.*, 2004), 58% en Belgique (Boelaert, *et al.*, 1995), et 84,7% à Cocody-Abidjan -Côte-d'Ivoire-(Edoh *et al.*, 2003).

Nous constatons que le taux de portage nasal change selon les différentes études et les différents pays. Ceci est en rapport avec le recrutement des malades. En effet, la variabilité dans le portage de *S. aureus* peut être expliquée par le fait qu'il fait intervenir des facteurs liés à l'hôte, des facteurs bactériens et des facteurs environnementaux (Peacock *et al.*, 2001).

De nombreux déterminants de l'hôte ont été suspectés : le type HLA, la race, le sexe, l'âge, des facteurs hormonaux, des altérations anatomiques nasales, une activité bactéricide des sécrétions nasales, des récepteurs sur les cellules épithéliales, une immunité locale liée aux IgA (Weidenmaier *et al.*, 2004).

De plus, d'autres travaux ont rapporté que les patients hémodialysés avaient un portage de *S. aureus* accru et pouvaient avoir un taux de portage qui variaient entre 27% jusqu'à 82% (Herwaldt, 1998). Cette augmentation et la variabilité dans le taux de portage de *S. aureus* chez les hémodialysés tient compte également de certains facteurs de prédispositions notamment l'immunodéficience et la présence de matériel prothétique (Peacock *et al.*, 2001). Par ailleurs, les patients traités par hémodialyse ont des contacts fréquents et directs avec l'environnement hospitalier, un autre facteur contribuant à l'acquisition de *S. aureus* (Chow et Yu, 1989). Le mode de prélèvement nasal, les conditions de culture bactérienne peuvent également être une cause de variation dans les résultats (Nouwen *et al.*, 2004).

II. Facteurs de risque associés au portage nasal

En analysant les facteurs de risque associés au portage de *S. aureus* chez les dialysés chroniques, notre étude n'a révélé aucune différence significative entre les porteurs et les non-porteurs de *S. aureus* selon la durée de l'hémodialyse, le diabète et l'hospitalisation récente ($P > 0,05$). Certains auteurs n'ont également pas trouvé la durée de l'hémodialyse comme facteur de risque (Souly *et al.*, 2011) tandis que d'autres l'ont incriminé (Watanakunakorn, *et al.*, 1992). Ghasemian *et al.*, (2010) n'ont également pas considéré le diabète comme un facteur de risque de portage nasal de *S. aureus* lors d'une étude réalisée en Iran sur les hémodialysés.

Le tabagisme chronique, les infections à HIV, HVC, et HVB et les antécédentes affections urinaires chez les patients n'ont pas été des facteurs d'augmentation quant au risque de portage de *S. aureus*. Alors que la plupart des travaux récemment publiés confirme un risque accru de portage nasal de *S. aureus* avec ces différents facteurs (Alexander *et al.*, 2011). Nous pouvons expliquer ce résultat par le fait que les effectifs des patients présentant ces différents facteurs de risque n'étaient pas assez représentatifs. De plus les informations relatives à ces facteurs de risque n'étaient pas toujours accessibles.

Notre étude a montré une différence hautement significative quand au portage de *S. aureus* selon l'âge ($P = 0,002$), la moyenne d'âge des patients non-porteurs étaient

supérieure à celle des porteurs. En plus, lorsque nous avons catégorisé nos patients en : jeunes, adultes et personnes âgées, nos résultats ont montré que les patients relativement jeunes (moins de 35 ans) sont plus colonisés par rapport aux deux autres catégories. Et que les adultes (âge entre 35 et 50 ans) sont plus colonisés que les personnes âgées. Ces résultats doivent être confirmés par des effectifs plus élevés. Nos résultats sont en accord avec d'autres, montrant que l'âge était un facteur de risque important dans la colonisation nasale de *S. aureus* (Wertheim et al., 2005).

Dans notre étude, le portage nasal de *S. aureus* selon le sexe n'avait pas une différence significative. Mais néanmoins le sexe masculin avait plus de tendance à être colonisé par *S. aureus* que chez le sexe féminin. Les publications qui vont dans ce sens divergent, Alexander et al., (2011) ont trouvé les mêmes résultats que les nôtres, alors que Souly et al., (2010) ont conclu sur le portage accru chez les femmes. Nous ne pouvons donc pas conclure que le portage nasal de cette bactérie est lié au sexe puisque les études divergent selon les pays et le temps.

III. Sensibilité aux antibiotiques

L'ensemble des souches de *S. aureus* isolées ont exprimé une sensibilité variable vis-à-vis des 18 antibiotiques testés. Ainsi, la résistance à la pénicilline G est de 82,26%. Les souches sensibles doivent être confirmées par le test chromogénique de détection de la pénicillinase par la nitrocéfinaïse. Souly et ses collaborateurs en travaillant sur des souches de *S. aureus* isolées chez les hémodialysés du centre hospitalier universitaire Ibn Sina de Rabat (Maroc) ont rapporté que ce taux de résistance était de 88,88%. Toutefois, ce taux avoisine celui trouvé par Koziol-Montewka et al., (2005), travaillant sur des souches de *S. aureus* isolées chez des hémodialysés en Pologne, avec un taux de 81,8%. En fait, dans les années quarante, la pénicilline était l'antibiotique de choix pour traiter les infections à *S. aureus* ; cependant cette sensibilité à la pénicilline a été de courte durée suite à l'apparition de souches résistantes productrices de bêta-lactamases. En effet depuis la fin des années 1960, plus de 80% des isolats de staphylocoques communautaires et nosocomiales étaient résistants à la pénicilline. Et actuellement cette résistance continue d'avoir de l'ampleur à l'échelle internationale. Alors, sa préconisation dans une thérapie quelconque chez les Staphylocoques, doit obligatoirement passer par un antibiogramme standard selon les recommandations en vigueur.

Le support génétique de cette résistance a été décrit par Pinho et *al.*, (2001). Le gène *bla* qui code pour la pénicillinase appartient à un transposon, localisé le plus souvent sur un large plasmide, le pIB485. Ce plasmide porte également les gènes de virulence *sed*, *sej* et *selr*, localisés conjointement avec le gène *bla* (Holtfreter, et *al.*, 2007).

Parmi les six souches multiR de notre étude, trois (3) sont positives pour le gène *sed*, et sont résistantes à la pénicilline, les trois autres ne possédant pas ce gène sont sensibles à la pénicilline. Ce résultat nous laisse supposer que, la résistance à la pénicilline des trois souches est liée à l'expression d'une pénicillinase codée par le gène *bla*. Toutefois, ce résultat doit être confirmé par la recherche de la pénicillinase chez les six souches par un test enzymatique comme celui de la nitocéfinaise.

Nous avons noté une résistance assez importante à la tétracycline, un antibiotique assez utilisé au Maroc, elle a été exprimé chez 10 souches (16,13%), isolées uniquement chez les hémodialysés chroniques. Ce taux de résistance reste toutefois très à inférieur à celui rapporté par Koziol-Montewka et *al.*, (2005) en Pologne qui ont trouvé un taux de 63,6% de résistance à la tétracycline.

Quatre autres antibiotiques : la rifampicine (RA), le chloramphénicol (C), la péfloxacine (PEF) et l'acide fusidique (FA), également utilisés activement au Maroc, sont plus au moins actifs avec 95,16 % pour le RA ainsi que la FA et 96, 77% pour le C et le PEF. Ces données font défaut dans la plupart des pays africains. Toutefois, dans une étude réalisée en Iran (Ghasemian et *al.*, 2010), sur 84 patients hémodialysés, toutes les souches de *S. aureus* étaient sensibles à la Rifampicine. Toutes ces résistances ont été développées chez les hémodialysés chroniques à l'exception d'une seule personne du staff médical qui héberge une souche de *S. aureus* résistante à la rifampicine et à la pénicilline. Cette résistance élevée chez les patients hémodialysés chroniques peut être justifiée par le fait qu'ils font très souvent recours à des antibiothérapies. Vu que les infections bactériennes représentent une des causes majeures de la morbidité en hémodialyse, le recours à l'antibiothérapie est très souvent sollicité. De plus, cette remarquable résistance peut être la conséquence de la consommation de plus en plus importante de ces antibiotiques ou même de leur utilisation de façon inappropriée, sachant que ces antibiotiques peuvent développer des résistances chez *S. aureus* s'ils sont utilisés en monothérapie, notamment l'acide fusidique (Darley et MacGowan, 2004).

Par ailleurs, Les macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS) appartiennent au même groupe du fait d'un mode d'action proche et d'une résistance fréquemment croisée

entre ces antibiotiques. Cependant, la résistance à ces trois classes par une méthylation ribosomale, reconnue comme le mécanisme de résistance le plus fréquent (Leclercq, 2002), a été trouvé dans notre travail sous la forme du phénotype MLSB constitutive. En effet, le phénotype de résistance MLSB défini par une résistance simultanée à l'érythromycine et la lincomycine, a été identifié chez une seule souche (1,61%) qui est aussi résistante à la péfloxaciline et à la tétracycline.

Durant notre travail, deux souches de *S. aureus* isolées ont montré chacune une des deux phénotypes de résistance aux aminosides impliquant deux enzymes inactivatrices : Le phénotype K dû à la présence d'une aminoside O-phosphotransférase « APH(3')-III » et le phénotype KT dû à la présence d'une aminoside O-nucléotidyltransférase « ANT(4')-I ». Le phénotype KT que nous avons obtenu est rare, car il correspond à une résistance isolée à la tobramycine alors la souche reste sensible à la gentamycine et à la kanamycine. En effet, ce profil correspond à une faible production de l'enzyme « ANT(4')-I » par la souche en question qui demeure ainsi résistante seulement à la tobramycine (Daurel et Leclercq, 2008). Les deux phénotypes ont été trouvés chez des souches de dialysés chroniques. Ni le personnel ni les dialysés aiguës n'ont de telles souches.

Tout au long de notre travail, un intérêt particulier a été porté pour la recherche des souches résistantes à la méthicilline. En effet, les souches de *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM) sont en augmentation régulière et posent des problèmes thérapeutiques vu l'émergence des souches multirésistantes. Les souches de SARM sont de plus en plus isolées à partir de malades ne présentant pas de facteurs de risques habituels. Certaines ont pour origine l'hôpital, d'autres apparaissent d'origine communautaire. Ces dernières ont acquis des propriétés leur conférant un potentiel épidémique. La dissémination intercontinentale de certains clones a été confirmée (Nour et *al.*, 2004). Notre étude a relevé un seul cas de SARM parmi les 62 cas (1,61%). Ce taux de résistance est en accord avec d'autres travaux. Maria et ses collaborateurs avaient rapporté un seul cas de SARM chez des hémodialysés de la Pologne (Maria et *al.*, 2005). Ce taux reste toutefois inférieur à la plupart des travaux rapportés dans la littérature. Il était de 12,5% à Rabat -Maroc- (Souly et *al.*, 2011) ; 36,9% en Iran (Ghasemian et *al.*, 2010); 12% en Allemagne (Lederer et *al.*, 2007) et de 4% à New York (Alexander et *al.*, 2011).

La souche SARM a été isolée chez un patient en hémodialyse chronique de sexe masculin, tuberculeux, âgé de 32 ans, et avait présenté une résistance simultanée à la

pénicilline et la tétracycline. Il n'avait pas été hospitalisé dans les 12 mois précédant l'isolement du germe. Le profil de résistance de la souche (P-TE-FOX) était très différent de ceux rapportés chez les souches SARM communautaires ou hospitaliers (Daurel et Leclercq, 2008). En effet, il a été rapporté que, la résistance à la méthicilline est associée dans environ 90% des cas de SARM hospitaliers à la résistance aux fluoroquinolones et au phénotype de résistance aux aminosides kanamycine-tobramycine (KT). En revanche, les SARM communautaires ne sont résistants, outre à la méthicilline, qu'à la kanamycine, à l'acide fusidique et souvent aux tétracyclines (Daurel et Leclercq, 2008). De plus, notre souche ne possède ni le gène de PVL ni l'un des gènes des épidermolysines qui sont souvent associés aux SARM communautaire (Nour et *al.*, 2004).

Partant de ces données, nous pouvons dire que le SARM isolé est plus proche d'un SARM nosocomial. A ce point, Elazhari et ses collaborateurs travaillant sur le statut de telles souches et d'autres auteurs les ont appelées germes « évadés des hôpitaux » (Elazhari et *al.*, 2009 ; Eguia et Chambers, 2003) De plus le germe en question a été isolé dans un centre situé au sein d'un hôpital. Donc, nous pouvons suspecter une transmission croisée entre les différents services de la structure hospitalière, qui serait à l'origine de ce SARM. Toutefois une étude épidémiologique poussée est nécessaire.

Enfin, notons que toutes nos souches sont sensibles aux glycopeptides, à la fosfomycine, à la gentamicine, à la pristnamycine ainsi qu'à la tigécycline.

Il faut toutefois rappeler que, les tests de résistance aux antibiotiques par la méthode de diffusion forment la méthode de caractérisation phénotypique la plus simple des bactéries. Cependant, cette méthode utilisée en routine de bactériologie clinique a un pouvoir discriminatif faible. De ce fait, la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) comme complément à la méthode de diffusion sur gélose est souvent nécessaire.

IV. Etude de la virulence

Outre les nombreuses résistances que cette bactérie peut présenter vis-à-vis des antibiotiques, il peut être étonnant de constater combien cette dernière est également armée pour annihiler bon nombre des défenses que son hôte pourrait lui opposer. C'est en fait une véritable ingénierie dont dispose *S. aureus* pour répondre aux périls d'un hôte hostile qui lui oppose anticorps, phagocytose ou cytotoxicité. L'émergence de souches particulièrement virulentes dans la communauté illustre le brassage génétique de ces dernières via l'homme et

ses activités. Ces parades se distribuent en plusieurs groupes de toxines distinctes aux activités cytolitiques, protéolytiques, superantigéniques ou ADP-ribosylantes. Le plus souvent, chaque groupe de toxines contient plusieurs sérotypes, ce qui pourrait permettre à la bactérie d'échapper aux premières lignes de défense de l'hôte. L'importance de ces données nous a conduit à définir 21 gènes toxiques chez les *S. aureus* multirésistants isolés dans notre étude. Rappelons que nous avons pu identifier six germes multirésistants, tous isolés chez les hémodialysés chroniques.

Notre étude a rapporté que les gènes toxiques *selm* et *selo* sont les plus fréquents. Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Holtfreter et ses coéquipiers (2007) et par Elazhari et *al.*, (2011). En effet, ces deux gènes sont connus pour être dans un même opéron qui est le «*egc*», lui-même localisé dans l'îlot de pathogénicité SaPI de type 1 γ SA β avec 5 à 6 autres gènes de toxines (Hu et *al.*, 2008), comme décrit plus haut (cf. chapitre I).

Les souches qui portent ces deux gènes *selo* et *selm*, abritent parfois les gènes *sed* et *selr*. Ces deux derniers sont en général portés par le plasmide pIB485 indépendant de l'îlot de pathogénicité SaPI (Holtfreter et *al.*, 2007). Rappelons que ce plasmide porte également le gène *bla* qui code pour la pénicillinase, comme nous l'avons constaté dans notre étude chez trois souches.

Les gènes *tst* et le *seb* sont connus pour caractériser les îlots de pathogénicité de la famille des TSST-1 *islands* chez *S. aureus* et sont associés aux gènes *sec*, *sell*, *selq* ou *selk* (Holtfreter et *al.*, 2007). Durant notre étude, nous avons trouvé un profil toxinique en accord avec les données de Holtfreter et ses coéquipiers. Ce profil a été identifié chez une souche, isolée chez un patient de 60 ans de sexe masculin, portant les gènes, *seb*, *sea*, *selk* et *seh*. En effet, l'association entre le gène *seb* et *selk* est caractéristique de l'îlot de pathogénicité SAPI3. Le gène *sea* est porté par le bactériophage PhiSa3 (Holtfreter et *al.*, 2007). Quant au gène *seh*, nous avons constaté que sa présence est associée à une résistance à l'acide fusidique, nous supposons qu'il est localisé sur une région chromosomique mobile (Elazhari et *al.*, 2011; Diep et *al.*, 2006). Nous pourrions dire que notre souche possède l'îlot de pathogénicité SaPI 3, le phage PhiSa3 et l'élément chromosomique mobile véhiculant le gène *seh*.

Par ailleurs, une autre souche, isolée chez un patient de sexe féminin âgé de 66 ans, de profil de résistance « PEF-FA-TE », porte les gènes *sec*, *sea*, *sell* et le *seh*. Dans la littérature, nous trouvons que les gènes *sec* et *sell* sont localisés avec le gène *tst* sur l'îlot de

pathogénicité SaPI_{m1}/SaPI_{n1} (Hu et al., 2008 ; Kuroda et al., 2001 ; Holtfreter et al., 2007). L'explication la plus plausible que nous pouvons avancer afin d'expliquer ce profil, est que la souche a probablement gardé l'élément génétique mobile (SaPI_{m1}/SaPI_{n1}) mais a perdu le gène *tst*. Quant aux gènes *sea* et *seh*, ils sont portés respectivement par le phage PhiSa3 et l'élément chromosomique mobile comme décrit précédemment.

Quant au gène *lukM*, une leucocidine à activiter synergohyménotrope, il a été isolé chez trois souches dont deux possèdent en plus les gènes *selm*, *selo*, *sed*, *selr* et la troisième véhicule les gènes *selm* et *selo*. Or dans la littérature, le gène *lukM* est d'origine bovine et est porté par un élément génétique mobile (Kaneko et al., 1997). Sa présence chez les souches de nos patients peut être expliquée par le fait que ces patients ont probablement été en contact avec les animaux en question, induisant ainsi un transfert de souches bovines à l'Homme, ou tout simplement un transfert de l'élément génétique mobile des souches bovines aux souches humaines, et par plusieurs autres mécanismes, les souches *lukM* (+) ont pu coloniser nos trois patients dialysés

Enfin, aucune de nos souches multirésistantes n'héberge l'un des gènes des exfoliatines, ou des épidermolysines, de l'hémolysine, de la leucocidine de Panton et valentine ni des facteurs des EDIN A, B, C.

A la lumière de toutes ces données, et en tenant compte de l'hémodialyse comme étant un facteur de risque important dans la colonisation nasal de *S. aureus*, c'est le subtil équilibre entre les défenses de l'hôte « immunocompétent » et la capacité de *S. aureus* à exprimer ses facteurs de virulence, en fonction des conditions de l'environnement, qui vont déterminer le succès ou l'éradication de l'infection. Ces études peuvent donc ouvrir la voie à une prophylaxie ou à une thérapie antibactérienne adaptée selon le statut de chaque patient.

Conclusion

L'hémodialyse aussi bien chronique qu'aiguë nécessite le recours à des manœuvres invasives plusieurs fois par semaine avec un risque d'infections. Notre étude réalisée dans 4 centres d'hémodialyse de Fès a permis le dépistage des patients hémodialysés et le personnel hospitalier pour le risque des infections à *S. aureus*. Ce dépistage permettra de mettre en œuvre des directives d'hygiène individuelles et collectives, ainsi que la surveillance clinique et bactériologique, du portage nasal de *S. aureus*, à long terme dans les différentes unités d'hémodialyse.

Notre travail, nous a révélé un taux de prévalence de portage nasal de *S. aureus* de 38,16 % (50/131) chez les hémodialysés chroniques, de 50% (6/12) chez les hémodialysés aigus et de 18,75% (6/32) chez le personnel médical des différents centres d'hémodialyse étudiés. Le jeune âge a été le facteur de risque dans la colonisation par rapport aux autres âges.

Le taux de résistance des souches de *S. aureus* isolées était variable en fonction des molécules considérées. Il était assez élevé pour les cyclines (16,13%) relativement faible pour le rifampicine, les aminosides, les macrolides et molécules apparentées ainsi qu'aux fluoroquinolones (<5%). Durant notre étude nous avons isolé six souches de *S. aureus* résistantes à au moins trois antibiotiques (souches multirésistantes), et étaient toutes isolées chez les patients hémodialysés chroniques.

La prévalence des souches résistantes à la méthicilline a été de 1, 61% (une souche). Cette prévalence reste faible par rapport à ceux rapportés à l'échelle mondiale. Cela n'empêche pas une surveillance régulière de l'état de sensibilité des souches de *S. aureus* isolées en hémodialyse afin de limiter la diffusion des souches résistantes aux seins de chaque centre.

L'étude de la virulence des germes multirésistants a révélé 11 gènes de toxines répartis en différents profils entre les souches. Chaque souche abritait au moins trois gènes toxiques.

Enfin, notons que la multirésistance aux agents anti-infectieux n'est pas en elle-même un facteur de virulence supplémentaire chez *S. aureus*. Mais les infections à ce genre de souche présentent fréquemment une plus importante gravité liée au terrain, à l'inefficacité d'un traitement probabiliste initial ou au choix thérapeutique souvent restreint. Par ce biais, la létalité des infections à *S. aureus* multirésistantes est significativement plus élevée que celle

d'infections identiques à germes sensibles. La connaissance et la surveillance du profil de sensibilité et de virulence de telles souches de *S. aureus* sont primordiales dans la prise en charge des infections générées par cette espèce bactérienne, ainsi que la maîtrise de leur diffusion clonale. Chaque centre d'hémodialyse doit donc réaliser une évaluation périodique de la sensibilité des isolats de *S. aureus* aux antibiotiques actuellement utilisés.

Perspectives

Perspectives proches

- ✓ Afin de mieux caractériser l'ensemble des souches de *S. aureus* isolées, nous envisageons de déterminer le profil toxinique de la totalité des isolats.
- ✓ Pour confirmer l'existence réelle de souches sensibles à la pénicilline, nous pensons faire un test de détection de la pénicillinase.
- ✓ Dans le but de catégoriser nos souches, nous pensons faire un typage moléculaire par *agr typing*.

Perspectives lointaines

- ✓ Nous pensons faire une étude épidémiologique sur la clonalité des souches de SARM. dans la région de Fès, pour cela, nous envisageons d'élargir les échantillons d'étude.
- ✓ Les souches SARM isolées vont être typées par le PFGE, le MLST et le *spa typing*.
- ✓ D'autre part, nous pensons analyser l'environnement génétique des gènes toxiques et la cassette chromosomique responsable de la résistance à la méthicilline.

Références bibliographiques

- **Alexander E.L.**, Morgan D.J., Kesh S., Weisenberg S.A., Zaleskas J.M., Kaltsas A., Chevalier J.M., Silberzweig J., Barrón Y., Mediavilla J.R., Kreiswirth B.N., Rhee K.Y. (2011). Prevalence, persistence, and microbiology of *Staphylococcus aureus* nasal carriage among hemodialysis outpatients at a major New York Hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70(1):37-44.
- **Ayzac L.**, Bérnard M., Girard R., Hannoun J., Kuentz F., Marc J.M., Moreau-Gaudry X., Roche C., Tressières B., Uzan M. (2009). Dialin: Infection surveillance network for haemodialysis patients. First results. *Nephrol Ther*, 5:41-51.
- **Berger-Bachi B.** (1994). Expression of resistance to methicillin. *Trends Microbiol* 2, 389-393.
- **Bes M., and Brun Y.** (2002). *Staphylococcus* : actualités taxonomiques et identification. *Rev Fr Lab*, 23-30.
- **Buckingham S.C.**, McDougal L.K., Cathey L.D. (2004) Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. *Pediatr Infect Dis*, 23:619-624.
- **CA SFM (2011)**. Recommandations du Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie : <http://www.sfm.asso.fr/>
- **Centers for Disease Control and Prevention.** (1999). Four pediatric deaths from community-acquired *Staphylococcus aureus* – Minnesota and North Dakota, *Morb Mortal Wkly Rep*;48:707-710.
- **Chambers H.F.** (1997). Methicillin-resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol* 10:781-791.
- **Chang S.**, Sievert D.M., Hageman J.C., Boulton M.L., Tenover F.C., Downes F.P., Shah S, Rudrik J.T., Pupp G.R., Brown W.J., Cardo D., Fridkin S.K. (2003). Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med* 348, 1342-1347.
- **Chavakis T.**, Wiechmann K., Preissner K.T., Herrmann M. (2005). *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: The role of bacterial secreted expanded repertoire adhesive molecules (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* 94(2): 278-85.
- **Chesneau O.**, Allignet J., El Solh N. (1993) Thermonuclease gene as a target nucleotide sequence for specific recognition of *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Probes* 7(4): 301-10.
- **Chongtrakool P.**, Ito T., Ma X., Kondo Y., Trakulsomboon S., Tiensasitorn C., Jamklang M., Chavalit S., Song J.H., Hiramatsu K. (2006). Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* element. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1001–1012.
- **Chow J. W. and Yu V. L.** (1989). *S. aureus* nasal carriage in hemodialysis patients. Its role in infection and approaches to prophylaxis. *Arch. Intern. Med.* 149:1258–1262.
- **Collignon P.**, Gorbett I., Vickery A. (1998). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *Lancet*, 352:146-147. Community Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol Parasitol* 2:107. doi:10.4172/2155-9597.1000107.
- **Corne P.**, Marchandin H., Jonquet O., Campos J., Bañuls A.L. (2005). Molecular evidence that nasal carriage of *Staphylococcus aureus* plays a role in respiratory tract infections of critically ill patients. *J Clin Microbiol* 43(7): 3491-3.
- **Dalrymple L.S.**, Go A.S. (2008). Epidemiology of Acute Infections among Patients with Chronic. *Kidney Disease Clin J Am Soc Nephrol*, 3: 1487–1493.
- **Darley E.S.R. and MacGowan A.P.** (2004). Antibiotic treatment of gram positive bone and joint infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:928-935.
- **Daurel C. et Leclercq R.** (2008). *Revue francophone des laboratoires*. n°407 //81- 89.

- **Dinges M.M.**, Orwin P.M., Schlievert P.M. (2000). Exotoxins of *S. aureus*. Clin Microbiol Rev 13, 16-34.
- **Dufour P.**, Gillet Y., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Floret D., Etienne J., Richet H. (2002). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. Clin Infect Dis 35(7): 819-24.
- **Edoh V.**, Gadou D., Tia H., Gnonsahe D. (2003). Epidemiology and prevention of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in patients and staff at the Cococoy Hemodialysis Center in Abidjan, Ivory Coast. Med Trop (Mars) 63(6):590-2.
- **Eguia J.M. and Chambers H.F.** (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and potential virulence factors. Curr Infect Dis Reports 5(6):459-66.
- **Elazhari M.**, Saile R., Dersi N., Timinouni M., Elmalki A., Zriouil S. B., Hassar M., Zerouali K. (2009). Activité de 16 Antibiotiques vis-à-vis des *S. aureus* Communautaires à Casablanca (Maroc) et Prévalence des Souches Résistantes à la Méthicilline“.European Journal of Scientific Research ISSN 1450-216X Vol.30 N°.1 , pp.128-137.
- **Elazhari M.**, Elhabchi D., Zerouali K., Dersi N., Elmalki A., Hassar M., Saile R. and Timinouni M. (2011). Prevalence and Distribution of Superantigen Toxin Genes in Clinical
- **Essmann F.**, Bantel H., Totzke G., Engels I.H., Sinha B., Schulze-Osthoff K., Jänicke R.U. (2003). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced cell death: predominant ant necrosis despite apoptotic caspase activation. Cell Death Differ 10(11):1260-72.
- **Felten A.**, Grandry B., Lagrange P.H., Casin I. (2002). Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-Screen latex agglutination test. J Clin Microbiol 40:2766-2771.
- **Fitzgerald J.R.**, Sturdevant D.E., Mackie S.M., Gill S.R., Musser J.M. (2001). Evolutionary genomics of *S. aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. Proc Natl Acad Sci USA 98, 8821-8826.
- **Foster T. J. et Hook M.**, (1998). Surface protein adhesins of *S. aureus*. Trends Microbiol. 6:484-488.
- **Ghasemian R.**, Najafi N., Makhloogh A., Khademloo M. (2010). Frequency of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial resistance pattern in patients on hemodialysis. Iran J Kidney Dis 4(3):218-22.
- **Hardy K.J.**, Oppenheim B.A., Gossain S, Gao F., Hawkey P.M.A. (2006). Study of the relationship between environmental contamination with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and patients' acquisition of MRSA. Infect Control Hosp Epidemiol ; 27:127-132.
- **Herwaldt L.A.** (1998). Reduction of *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in dialysis patients. J Hosp Infect 40 Suppl B : S13-23.
- **Heusser R.**, Ender M., berger-bachi B., McCallum N. (2007). Mosaic *Staphylococcal* Cassette Chromosome *mec* containing two recombinase loci and new *mec* complex, B2. Antimicrob Agents Chemother 50:390–393.
- **Hiramatsu K.** (2001). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect Dis 1, 147-155.
- **Holden M.T.**, Feil E.J., Lindsay J.A. (2004). Complete genomes of two clinical *S. aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proc Natl Acad Sci U SA 101, 9786-9791.
- **Holtfreter S.**, Grumann D., Schmutde M., Nguyen H.T., Eichler P., Strommenger, B., Kopron K., Kolata J., Giedrys-Kalemba S., Steinmetz I., Witte W., Broker B.M. (2007). Clonal distribution of superantigène genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 45, 3669-2680.
- **Holtfreter, S. et Broker B. M.** (2005). *Staphylococcal* superantigens: do they play a role in sepsis? Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 53(1): 13-27.

- **Hu D.L.**, Omoe K., Inoue F., Kasai T., Yasujima M. (2008). Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol* 57: 1106-12.
- **Kaneko J.**, Muramoto K., Kamio Y. (1997). Gene *LukF-LukPV* like component of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with *lukM*. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:541-4.
- **Katayama Y.**, Ito T., Hiramatsu K. (2000) A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec* encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1549-1555.
- **Kateete D.P.**, Kimani C.N., Katabazi F.A., Okeng A., Okee M.S., Nanteza A., Joloba M.L., Najjuka F.C. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9:23.
- **Kluytmans J.**, van Belkum A., Verbrugh H. (1997). Nasal carriage of *S. aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10, 505-520.
- **Koziol-Montewka M.**, Szczepanik A., Baranowicz I., Jozwiak L., Ksiazek A., Kaczor D. (2006). The investigation of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci nasal carriage among patients undergoing haemodialysis. *Microbiol Res* 161:281–7.
- **Kuroda M.**, Ohta T., Uchiyama I. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *S. aureus*. *Lancet* 357, 1225-1240.
- **Ladhani S.** (2001). Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clin Microbiol Infect* 7(6): 301-7.
- **Leclercq R.** (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 15:482-92.
- **Lederer S.R.**, Riedelsdorf G., Schiffl H. (2007). Nasal carriage of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: The prevalence, patients at risk and the effect of elimination on outcomes among outclinic hemodialysis patients. *Eur J Med Res* 12(7):284–288.
- **Lindsay J.A. and Holden M. T.** (2004). *Staphylococcus aureus*: superbug, superbug, super genome? *Trends microbial* 12, 378-385.
- **Lowy F.D.** (1998). *S. aureus* infections. *N Engl J Med* 339, 520-532.
- **Montagnac R.**, Eloy C., Schillinger F., Croix L.C., Milcent T (1995). Étude itérative de la prévalence du portage nasal de *Staphylococcus aureus* chez l'hémodialysé. *Presse Med* 24(23):1075–7.
- **Nour M.**, Mastouri M., Ben Nejma M. (2005). Le staphylocoque doré résistant à la méthicilline : émergence et bases moléculaires de la résistance. *Pathol Biol.* 53(6): 334-40.
- **Nouwen J.L.**, Ott A., Kluytmans-Vandenberg M.F., Boelens H.A., Hofman A., van Belkum A., Verbrugh H.A. (2004): Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: Derivation and validation of a “culture rule.” *Clin Infect Dis* 39: 806-811.
- **Novick R. P.** (2003). Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 49(2): 93-105.
- **Ogston A.** (1882). *Micrococcus* poisoning. *J Anat* 17, 24-58.
- **Oliveira D.C.**, Milheirico C., de Lencastre H. (2006). Redefining a structural variant of staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Agents Chemother* 50:3457–3459.
- **Pasteur L.** (1877). A propos de deux malades soignés à l'hôpital Saint-Louis pour pustule maligne.
- **Peacock S.J.**, Mandal S., Bowler I.C. (2002). Preventing *Staphylococcus aureus* infection in the renal unit. *Q. J. Med.* 95, 405–410.
- **Pena C.**, Fernandez-Sabe N., Dominguez M.A., Pujol M., Martinez-Castelao A., Ayats J. (2004). *Staphylococcus aureus* nasal carriage in patients on haemodialysis: role of cutaneous colonization. *J Hosp Infect* 58:20–7.

- **Pinho M.G., Filipe S.R., de Lencastre H., Tomasz A. (2001).** Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183(22):6525-31.
- **Plouin-Gaudon I., Clement S., Huggler E., Chaponnier C., François P., Lew D., Schrenzel J., Vaudaux .P, Lacroix J.S. (2006).** Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *Rhinology*. 44(4):249-54.
- **Proft T. et Fraser J. D. (2003).** Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* 133(3):299-306.
- **Quincampoix J.C. et Mainardi J.L. (2001)** Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation* 10, 267-275.
- **REIN (Registre Epidémiologie Information Néphrologie) Rapport Rein 2009 – Synthèse.** *Néphrologie & Thérapeutique* 5(1S1) : 3-4.
- **Réseau DIALIN, données 2008.**
- **Rodloff A.C., Leclercq R., Debbia E.A., Canton R., Oppenheim B.A., Dowzicky M.J. (2008).** Comparative analysis of antimicrobial susceptibility among organisms from France, Germany, Italy, Spain and the UK as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. *Clin Microbiol Infect* 14:307-14.
- **Rosato A.E., Kreiswirth B.N., Craig W.A., et al. (2003).** *mecA-blaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1460-1463.
- **Souly K., Ait el kadi M., Lahmadi K., Biougnach H., Boughaidi A., Zouhdi M., Benasila S., Elyoussefi Z., Bouattar T., Zbiti N., Skalli Z., Rhou H., Ouzeddoun N., Bayahia R., Benamar L. (2011).** Epidemiology and prevention of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in hemodialyzed patients. *Médecine et maladies infectieuses* 41 :469–474.
- **Stefaan J., Vandecasteele, Johan R., Boelaert., An S., De Vriese. (2009).** *Staphylococcus aureus* Infections in Hemodialysis: What a Nephrologist Should Know. *Clin J Am Soc Nephrol* 4: 1388–1400.
- **Ternois I., Geffroy S., Brun Y., Lemeland J.F., Etienne I., Fleurette J. (1993).** Évaluation du portage de *Staphylococcus aureus* chez les maladies et le personnel d'un centre d'hémodialyse en vue de la prévention des infections. *Pathol Biol* 41(4):428–33.
- **Thomas D., Chou S., Dauwalder O., Lina G. (2007).** Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy* 93: 24-41.
- **Vandecasteele S.J., Boelaert J.R., De Vriese A.S. (2009).** *Staphylococcus aureus* infections in hemodialysis: what a nephrologist should know. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4(8):1388-1400.
- **VandenBergh M.F., Yzerman E.P., van Belkum A., Boelens H.A., Sijmons M., Verbrugh H.A. (1999).** Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: Redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol* 37: 3133-3140.
- **Vannuffel P., Gigi J, Ezzedine H (1995).** Specific Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Species by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 33(11): 2864-7.
- **Verdier I., Durand G, best M., Taylor K. L., Lina G., Vandenesch F., Fattom A. I., et Etienne J. (2007).** Identification of the capsulaire polyssacharides in *S. aureus* clinical isolates by bPCR and Agglutination Testd. *J Clin Microbiol* 45 :725-729.
- **Vincenot F., Saleh M., Prévost G. (2008).** Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires - décembre 2008 - n°407 // 61-69.*
- **von Eiff C., Becker K., Machka K., Stammer H., Peters G.(2001).** Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344(1): 11-6.
- **Waldvogel F.A., Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (2000).** *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In *Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 2069–2092.
- **Walsh T.R. and Howe R.A. (2002).** The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 56, 657-675.
- **Watanakunakorn C., Brandt J., Durkin P., Santore S., Bota B., Stahl C.J. (1992)** The efficacy of mupirocin ointment and chlorhexidine body scrubs in the eradication of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among patients undergoing long-term hemodialysis. *Am J Infect Control* 20(3):138-41.

- **Weidenmaier C.**, Kokai-Kun J.F., Kristian S.A., Chanturiya T., Kalbacher H., Gross M., Nicholson G., Neumeister B., Mond J.J., Peschel A. (2004). Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med.* 10(3):243-5.
- **Wertheim H. F.**, Melles D. C., Vos M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H.A., Nouwen J.L. (2005). The role of nasal carriage in *S. aureus* infections. *Lancet infect Dis* (12): 1511-6.
- **Yarwood J. M.**, Bartels D. J., Volper E.M., Greenberg E.P. (2004). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186(6): 1838-50.
- **Ferry T.**, (2007). Thèse : Rôle des exotoxines superantigéniques dans le choc septique à *S. aureus*. Université Claude Bernard –Lyon 1. N° d'ordre 177
- **Vincenot F.**, Saleh M., Prévost G., (2008) : Revue francophone des laboratoires - décembre N°407 // 61:69
- **Lescure F. X.**, Locher G. et al., (2006). "community-acquired infection with healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of home nursing care." *Infect Control Hosp Epidemiol* 27(11): 1213-8.
- **Gonzalez B. E.**, Rueda A. M. et al., (2006). "Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as the cause of healthcare-associated infection." *Infect Control Hosp Epidemiol* 27(10): 1051-6.

Annexes

Annexe 1

Les Définitions

➤ **Hémodialysé chronique**

Ce sont des patients atteints d'insuffisance rénale chronique et bénéficiant d'un traitement par hémodialyse à long terme.

➤ **Hémodialysé aigu**

Ce sont des patients atteints d'insuffisance rénale non terminale et bénéficiant d'un traitement par hémodialyse qui est en général de court terme.

➤ **Personnel d'un centre d'hémodialyse**

Il s'agit du staff médical qui veille sur les patients hémodialysés lors de la séance de dialyse.

➤ **Portage nasal de *S. aureus***

Il s'agit de la présence de *S. aureus* dans les fosses nasales.

Annexe 3

Liste des milieux de culture et solutions utilisés.

Gélose Muller-Hinton

Composition

- infusion de viande de bœuf.....300,0 ml
- peptone de caséine.....17,5 g
- amidon de maïs.....1,5 g
- agar.....17,0 g
- pH = 7,4

Préparation

38 g par litre. Stérilisation à l'autoclave. Pour préparer ce milieu il faut peser 38g de poudre et la mélanger dans 1L d'eau. Il faut homogénéiser puis chauffer en agitant. Il faut porter à ébullition pendant environ une minute. Ensuite il faut stériliser la gélose à l'autoclave durant 15 minutes à 116°C.

Milieu Chapman

Composition :

- Peptone10,0 g
- Extrait de viande de boeuf1,0 g
- Mannitol..... 10,0 g
- Chlorure de sodium 75,0 g
- Rouge de phénol..... 25 mg
- Agar 15,0 g
- pH = 7,4

Préparation :

111 g par litre. Autoclavage classique

Bouillon cœur-cervelle (BHI)

Composition :

- protéose-peptone..... 10,0 g
- infusion de cervelle de veau.....12,5 g
- infusion de cœur de bœuf5,0 g
- glucose2,0 g
- chlorure de sodium.....5,0 g
- hydrogénophosphate de sodium.....2,5 g
- pH = 7,4

Préparation :

37 g par litre. Stérilisation classique.

TBE 0,5X

Tris HCL.....0,045M

Acide borique.....0,045M

EDTA.....0,001M

pH=8,3

Bromure d'éthidium 10 mg/ml (BET)

- Ajouter 1g de BET à 100 ml d'eau distillée.
 - Laisser dissoudre sous agitation et couvrir le flacon avec du papier aluminium.
 - Stocker à température ambiante.
 - C'est un produit mutagène, travailler avec des gants et un masque.
-

Annexe 4

API Staph

Principe :

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

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

Technique :

- **Préparation de la galerie :**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum :**

Réaliser une pré-culture sur gélose Columbia au sang

Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule API Staph Medium, d'opacité égale à 0,5 Mcfarland.

- **Inoculation de la galerie :**

- ✓ Introduire la suspension dans les tubes de la galerie en évitant la formation de bulles.
- ✓ Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine.
- ✓ Incuber 24 heures à 37°C

Lecture :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture. Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de résultats.

Identification :

- **Avec le tableau d'identification :**

Comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau ;

- **Avec le catalogue analytique :**

Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre 7 chiffres qui sert de code d'identification.

- **Avec un logiciel d'identification.**

Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	Témoin positif	Rouge	Jaune
FRU	D-fructose	Acidification à partir du carbohydre		
MNE	D-mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-tréhalose			
MAN	D-mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-melibiose			
NIT	Nitrate de potassium		Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 10 mn
			Incolore/rose	Rouge
PAL	β -naphtyl ac.phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 mn	
			Jaune	Violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			Incolore/ rose	Violet/rose
RAF	Raffinose	Acidification à partir du carbohydre	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Saccharose			
MDG	α -méthyl-D- glucosamine			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet

Annexe 5

Protocole du test SLIDEX® Staph plus

Grâce à un triple système de détection, SLIDEX STAPH PLUS permet d'identifier avec une sécurité optimale le *S. aureus*,

Objet

Décrire la réalisation d'un test d'agglutination au latex pour l'identification de *S. aureus*

Principe

Le réactif Slidex® Staph plus (BioMérieux) permet la recherche simultanée sur les colonies :

- du facteur d'affinité pour le fibrinogène (clumping factor)
- de la protéine A.
- d'un antigène de groupe lié aux structures périphériques spécifiques de *S. aureus*.

Référence

Fiche technique (bioMérieux, France).

Moyens utilisés



Kit Slidex® Staph plus (bioMérieux, 1X50 tests : réf. 73 115)

Modalités :

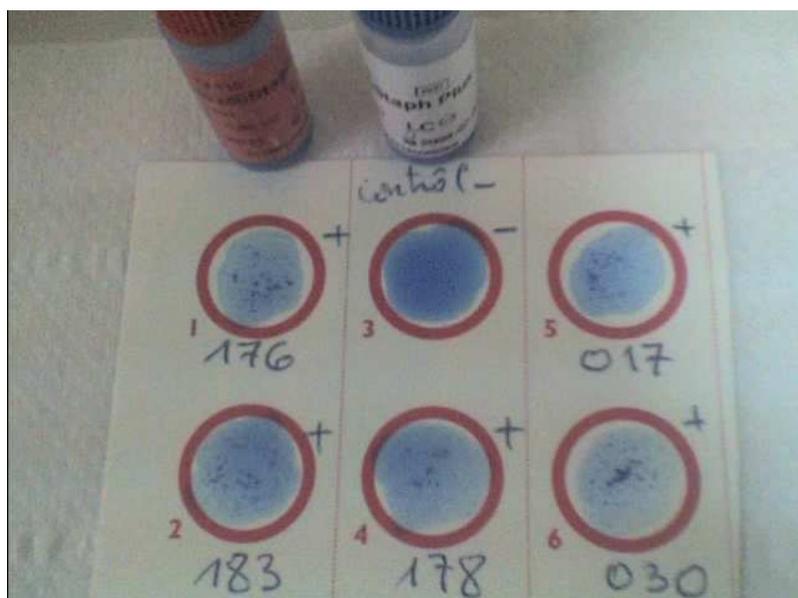
- Bien homogénéiser le réactif test (latex sensibilisé)
- Déposer une goutte de réactif test dans un cercle de la carte d'agglutination
- Déposer une goutte de témoin négatif sur un autre cercle
- Prélever 1 à 3 colonies suspecte (cocci Gram + et catalase +) avec une ôse.
- Ajouter les colonies dans les deux réactifs
- Homogénéiser en effectuant un mouvement de rotation de la carte

Interprétation

Absence d'agglutination : test négatif

Présence d'une agglutination en moi de 30 secondes : test positif

Exemple de résultat :



Annexe 6

Recherche de la coagulase libre staphylococcique

- **Objet**

Le test de coagulase est constitué par le plasma de lapin lyophilisé contenant l'EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) utilisé pour la détection de l'enzyme coagulase produit par *S. aureus*

- **Principe :**

La coagulase produit par *S. aureus* agit sur le fibrinogène en le transformant en fibrine. La réaction se fait sans calcium qui est chélaté par l'EDTA

- **Référence**

Fiche technique (LIOFILCHEM, Italie).

Le plasma de lapin lyophilisé est commercialisé par LIOFICHEM sous la référence 88030.

- **Matériel et méthodes**

Reprendre le plasma de lapin dans 4 ml de la solution physiologique.

Repiqué quelques colonies dans le BHI (Réf. 20095) à partir d'un milieu ordinaire de 24 heure et incubé à 37 °C pendant 4 à 6 heures.

Après incubation, ajouté 500µl de plasma et 500 µl de culture dans le BHI dans un tube stérile et incubé à 37 °C pour 1-2-4-8-24 heures.

- **Interprétation du résultat**

Un résultat positif se présente par la formation caillot dans les prochaines heures qui suivent l'incubation.

- **Exemple de résultat**



Résultats positif (en haut) et négatif (en bas) du test de coagulase

Annexe 7

Coloration de Gram

La **coloration de Gram** doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mit au point le protocole en 1884. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

- **Référence**

Fiche technique (bioMérieux), Réf. 55542

- **Méthodologie**

Réalisation du frottis

Elle nécessite d'avoir un frottis fixé, soit

1. par l'alcool durant 5 minutes (et rinçage à l'eau),
2. plus classiquement en effectuant une fixation simple à l'eau et à la flamme.

Réalisation de la coloration

Voici succinctement les différentes étapes de cette coloration :

1. Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau.
2. Mordançage au lugol: étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau. On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.
3. Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone): verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau.
4. Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée, puis sécher la lame
5. Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100.

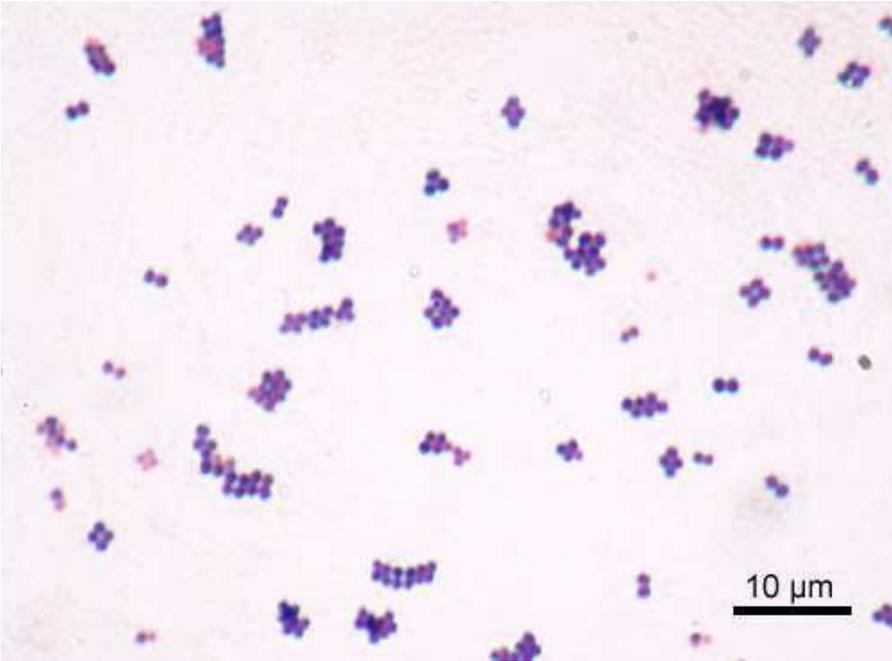
Les étapes 1 et 2 colorent en violet le contenu de la bactérie. Le violet de gentiane se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries. Le lugol permet de fixer cette coloration interne.

L'étape 3 (alcool) sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites « Gram négatives ».

L'étape 4 est une contre-coloration ayant pour but de donner aux bactéries Gram négatives précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries à Gram positif restées violettes seront évidemment insensibles à cette contre-coloration plus pâle que le violet imprégnant leur cytoplasme. La coloration de Gram permet de différencier la paroi bactérienne et de scinder les bactéries en deux grand groupes:

- Gram+ qui ont une paroi de peptidoglycanes épaisse.
- Gram- qui ont une paroi de peptidoglycanes fine, mais ont en plus une membrane externe lipidique.

Exemple de coloration (Cas d'une coloration de Gram positif) :



Annexe 8

Exemple de résultats positifs pour le test catalase et la fermentation du mannitol sur Chapman:



Test catalase



Croissance de S. aureus sur milieu Chapman

Boite jaune (colonie fermentant le mannitol), boîte rouge milieu d'origine

Annexe 9 : Liste 62 souches de *S. aureus* isolées et quelques caractéristiques

Code	Sexe	Statut	Diabétique	FAV	Présence de cathéter	Hospitalisation dans les 12 derniers mois	Sous ttt d'ATB	Phénotypes de résistance
DF1	F	HC	non	oui	non	non	non	P
DF2	F	HC	non	oui	non	non	non	P-C-TE
DF3	F	HC	non	oui	non	non	non	P-RA
DF4	F	HC	non	oui	non	non	non	P
DF5	M	HC	non	oui	non	oui	non	P
DF6	M	HC	non	oui	non	non	non	P
DF7	M	HC	non	oui	non	non	non	P
DF8	M	HC	non	oui	non	non	non	KAN-FA-TE-RA
DF9	M	HC	non	non	KTF	non	non	L-E-PEF-TE
DF10	M	HC	Type 1	oui	non	non	non	P
DF11	M	HA	non	non	KTF	oui	non	P
DF12	F	HA	non	non	KTF	non	pas d'info	Néant
DF13	F	HA	non	non	KTF	oui	oui	Néant
DF14	F	HA	Type 1	non	KTF	oui	pas d'info	P
DF15	F	HA	non	non	KTF	oui	non	P
DF16	F	HA	non	non	KTF	oui	pas d'info	P
DF17	M	HC	Type 1	oui	non	oui	non	P
DF18	M	Persl	non	non	non	non	non	P
DF19	F	Persl	non	non	non	non	non	P-RA
DF20	F	HC	non	oui	non	oui	oui	P-C-TE
DF21	M	HC	non	oui	non	non	non	P
DF22	M	HC	non	oui	non	oui	non	P
DF23	M	HC	non	oui	non	oui	non	P
DF24	M	HC	non	oui	non	non	oui	Néant
DF25	M	HC	Type 1	oui	non	non	non	P
DF26	F	HC	non	oui	non	non	oui	P
DF27	F	HC	non	oui	non	non	non	P
DF28	F	HC	non	oui	non	non	non	Néant
DF29	F	HC	non	oui	non	non	non	FA-TE
DF30	F	HC	non	oui	non	non	non	P-TE
DF31	F	HC	Type 1	oui	non	oui	non	P
DF32	F	Persl	non	non	non	non	non	P
DF33	F	Persl	non	non	non	non	non	P
DF34	M	HC	non	oui	non	non	non	P
DF35	M	HC	non	oui	non	non	non	P
DF36	M	HC	non	oui	non	non	oui	P
DF37	M	HC	non	oui	non	non	non	P
DF38	M	HC	non	oui	non	non	non	P
DF39	M	Persl	non	oui	non	non	non	P
DF40	M	HC	non	oui	non	non	non	P-TE-FOX-MOX
DF41	M	HC	non	oui	non	non	non	p
DF42	M	HC	non	oui	non	non	non	p
DF43	M	HC	non	oui	non	non	non	p
DF44	M	HC	non	oui	non	non	non	p
DF45	M	HC	non	oui	non	non	non	p
DF46	M	HC	non	oui	non	oui	non	p
DF47	M	HC	non	oui	non	non	non	p
DF48	M	HC	non	oui	non	non	non	Néant
DF49	M	HC	non	oui	non	non	non	p
DF50	M	HC	non	oui	non	non	non	Néant
DF51	M	HC	non	oui	non	non	non	P
DF52	F	HC	non	oui	non	non	non	P-TE
DF53	F	HC	non	oui	non	non	non	P
DF54	F	HC	non	oui	non	non	non	PEF-FA-TE
DF55	F	HC	non	oui	non	non	non	Néant
DF56	F	HC	non	oui	non	oui	non	P
DF57	F	HC	non	oui	non	non	oui	P
DF58	F	HC	non	oui	non	non	non	P-TE
DF59	F	Persl	non	non	non	non	non	P
DF60	M	HC	Type 1	oui	non	non	non	P
DF61	M	HC	non	oui	non	non	non	P
DF62	F	HC	non	oui	non	oui	non	P

Fav: fistule artério-veineuse

F: Femme, M: Homme, HC: Hémodialysé chronique, HA: Hémodialysé aigu, Persl: Personnel médical, KTF: Cathéter fémoral

Annexe 10

Nombre d'échantillon prélevé par centre d'hémodialyse

Statut \ Centre	Centre de néphrologie CHU Hassan II de Fès	Centre d'hémodialyse Hôpital AlGhassani	Centre d'hémodialyse ElHakim de Fès	Centre d'hémodialyse de la clinique des spécialisés Ryad de Fès
Hémodialysé chronique	4	62	33	32
Hémodialysé aiguë	11	0	0	1
Personnel médical	9	7	8	8