**Thèse de Doctorat en Sciences Vétérinaire de Mme Hachemi Amina**

**Filière viande en algérie : étude de prévalence, profil d’antibiorésistance et caractérisation moléculaire des souches de staphylococcus aureus isolées dans des saucisses crues de type merguez, en Algérie**

**Alger, École Nationale Supérieure Vétérinaire : 2020**

**Résumé** :

 L’émergence et la réémergence de bactéries multi-résistantes d’origine alimentaire sont l’une des principales sources de préoccupation dans le monde. Récemment, Staphylococci spp. et Macrococcus ont reçu une attention particulière en raison de leur possible potentiel d’entérotoxinogénèse et de dissémination des gènes de résistance trouvés sur les élements génétiques mobiles. La présente étude visait à étudier tout d’abord le profil de sensibilité aux antibiotiques et la diversité à l’aide de MALDI TOF MS, des souches isolées de saucisses crues en Algérie. Toutes les souches ont été soumises à la PCR en temps réel et ont été confirmées par PCR standard pour détecter les gènes mecA/mecC. Deuxièmement, une enquête sur la consommation des Merguez a été conçue pour étudier les facteurs de risque potentiels en relation avec les comportements de consommation qui ont une relation significative avec la survenue de toxi-infections alimentaires. Aussi, pour explorer les groupes vulnérables. Troisièmement, pour évaluer l’évolution des cas et estimer les comportements d’utilisation des antibiotiques utilisés après une toxi-infection alimentaire déclarée, aussi bien pour les malades que les consommateurs hospitalisés. Au total, plus de 300 boucheries de treize (13) départements (Daira) d’Alger avec plus de 50 municipalités ont été incluses aléatoirement dans nos études pour ; collecter des échantillons de saucisses crues et distribuer 1500 questionnaires aux consommateurs de viande rouge. Nos trois études ont été menées en même temps, entre Juin 2016 et Juin 2019. Des échantillons de saucisses ont été prélevés à raison d’une fois par boucherie pour estimer la prévalence de Staphylococci spp. et le niveau de contamination par S. aureus pour arriver à évaluer la qualité des saucisses crues (Merguez) vendues à Alger, Algérie. Toutes les souches isolées ont été testées pour leur résistance aux antibiotiques. En outre, des questionnaires ont été distribués et utilisés pour collecter des informations sur divers aspects de la consommation de saucisses, des toxi-infections alimentaires et leur évolution ; également sur les habitudes de consommation et des comportements d’utilisation des antibiotiques après l’épisode maladive. Les données recueillies ont été analysées avec différentes approches statistiques, telles que le test de Chi-deux et le modèle logistique univariable Odds ratio (OR). Tous les facteurs de risque ont été analysés en étudiants leur association avec la survenue de toxi-infections alimentaires suite à la consommation des Merguez.La prévalence globale de la contamination par S. aureus dans les saucisses crues vendues était de 25.22%. Plus de 83.33% des souches ont montré une résistance à au moins un des antibiotiques testés. Les plus importants étaient pour la tétracycline (58%), suivie par la l’oxacilline (36%), la fosfomycine (33%), et la pénicilline G (25%). De plus, l’indice de multi-résistance aux antibiotiques 0.2. Aussi, et sur un>(MAR) comprend 20 profils de résistance avec MAR total de 84 souches incluses dans la deuxième étude, 73 (86.90%) souches ont été identifiées Staphylococci spp. dont S. saprophyticus(32,87%), S. aureus (28,76%), S. sciuri (10,95%), S. xylosus (8,21%), S. gallinarum (5,47%), S. vitulinus (4,10%) et S. equorum, S. lentus, S. haemolyticus, avec 2,73% suivi de S. warneri (1,36%). Le reste représentait Macrococcus caseolyticus avec 13.09% (n=11/84). Le dendrogramme MSP a révélé 4 clusters distincts selon un seuil de distance de 500. Toutes les souches de S. aureus étaient sévérement résistantes aux bêta-lactames (93.65%). L’acide fusidique (62.50%) et la doxymycine (70.83%) étaient les molécules auxquels S. saprophyticus a eu plus résistance. Les souches de M. caseolyticus ont révélés un profil de résistance contre la céfoxitine/érythromycine (63.63%) et la clindamycine/tétracycline (54.54%). Il n’y avait pas de résistance à la vancomycine. Nous avons détecté le gène mecA dans 5 souches résistantes à la méthiciline confirmées par PCR, avec une prévalence de 23.80%. Dans l’ensemble, 66.67% des isolats de S. aureus étaient positifs pour au moins un des sept gènes d'entérotoxines identifiés et 19,05% hébergeaient de deux à quatre gènes d'entérotoxines. Les prédominants étaient seb (38,09%); suivie par sea, see, seg, she avec (14,28%), et sed avec (9,52%). Aucun isolat contenant des gènes d'entérotoxine sec n'a été enregistré. Les souches de S. aureus et de M. caseolyticus isolées des saucisses crues avaient des gènes d’entérotoxine avec une prédominance de seb et see, respectivement. Non seulement S. aureus mais aussi S. haemolyticus, S. sciuri et M. caseolyticus étaient considérés comme un danger potentiel pour les consommateurs. De plus, les S. non-aureus une combinaison de gènes sea et see a été enregistrée avec 14,28% parmi les souches isolées.Pour la première enquête, sur les 440 consommateurs de viande, 22,16% ont révélé avoir une toxiinfection alimentaire après consommation de saucisse. Les facteurs de risque enregistrés étaient: la consommation hors domicile (24,30%, OR = 1,769, p = 0,040), pendant la saison estivale (24,30%, OR = 1,159) et pendant le déjeuner (26,50%, OR = 1,421). La deuxième étude a montré que sur les 504 consommateurs de saucisses, 22,15% ont révélé avoir une toxi-infection alimentaire après la consommation de saucisses, avec plus de 53,60% des consommateurs malades qui ont été hospitalisés.Les facteurs de risque: le jeune âge (89,69% OR = 1,323), les hommes (33,00%; OR = 1,275), les consommateurs vivant avec leurs familles (84,54 %; OR = 1,387) et les consommateurs avec enfants à charge (22,68%; OR = 1,62). De plus, les jeunes (p = 0,00002; 76,29%), les femmes qui ont accouché (p = 0,00001; 25,77%) et les femmes enceintes (50,52%) se sont révélées être des consommatrices vulnérables présentant des facteurs de risque élevés de RO = 0,35, OR = 2,021, et OR = 1,43, respectivement. Les consommateurs d'immunodéficience (42,27%; OR = 3,361) sont la principalecatégorie à risque. Pour le comportement d'utilisation d'antibiotiques, 52,58% (n = 51/97; p = 0,003; OR = 1,965) avaient fait recours à l’automédication et 41,24% (p = 0,008; OR = 1,87) avaient interrompu l’antibiothérapie. De même, la pratique d'automédication a été importante (71,15%; n = 37/97) avec OR = 7,45 (p = 0,00001) parmi les consommateurs qui ont eu tendance à l’hospitalisation. Malheureusement, la majorité (28,85%) a déclaré interrompre le protocole thérapeutique après avis médical avec OR = 9,96 (p = 0,0001). Nos études fournissent pour la première fois des informations sur la prévalence de la contamination par S. aureus des Merguez vendus à Alger, et la forte multi-résistance des souches de Staphylococci. Ainsi, les résultats montrent que non seulement S. aureus mais aussi Staphylococci spp. qui ont sont considérés comme un danger potentiel pour les consommateurs et met en évidence le risque de Staphylococci spp., Macrococcus caseoltyticus et les SARM ce qui représente une vraie menace pour la propagation des différents gènes de résistance et de virulence dans la communauté à travers la source alimentaire. Ce qui devrait être pris au sérieux, avec l’accent mise sur le rôle de l'homme et de l'animal en tant que réservoirs de résistance bactérienne pour réduire et prévenir la propagation des souches résistantes, une gestion et une surveillance solides de l'utilisation des antibiotiques devraient être établi. Nous pouvons conclure que la saucisse crue doit être consommée avec précaution pour les groupes vulnérables à risque (YOPI) et que l'application du système HACCP est essentielle soit dans les boucheries produisant des saucisses et / ou des abattoirs. Aussi, des programmes d'éducation et de sensibilisation du public (les personnes à risque) devraient être développés, en particulier pour les habitudes de consommation et l’usage des antibiotiques

**Abstract:**

The emergence and re-emergence of antibiotic multi-resistant foodborne bacteria are one of the most important source of concern worldwide. Recently, Staphylococci spp. and Macrococcus have received increasing attention due to their possible potential of enterotoxigenicity and dissemination of resistance genes found on mobile genetic elements. The present study aimed firstly to investigate the diversity and antimicrobial susceptibility profil of strains isolated from raw sausages in Algeria using MALDI-TOF MS. All strains were subjected to PCR real time and confirmed by PCR standard to detect the mecA/mecC genes. Secondly, a consumer sausage purchasing survey was designed to investigate potential risk factors that have a significant association with the occurrence of foodborne poisoning among sausage consumers’ behavior and its relationship with independent variables. Also, to explore vulnerable groups at risk. Thirdly, to assess the evolution of the cases and estimatebehaviors awards antibiotics use after food-borne poisoning for targeted sick/hospitalized Algerian consumersA total more than 300 butcheries from thirteen departments (Daira) of Algiers with more than 50 municipalities were included randomly in these studies to collect raw sausage samples and to distribute 1500 structured questionnaires to meat consumers. Our three studies were conducted at the same time, between June 2016 and june 2019. Sausage samples were taken once per butchery to estimate the prevalence of Staphylococci spp. and S. aureus contamination and therefore deduct the quality assessment of raw sausage (Merguez) sold in Algiers, Algeria. All isolated strains were tested for their antimicrobial resistance. Furthermore, questionnaires were distributed and used to collect information on various aspects of sausage consumption, foodborne disease and their evolution, consumption habits and antibiotics use behaviors. The data collected were analyzed with different statistical approaches, such as the Chi-square test and the odds ratio (OR) univariable logistic model. All the risk factors were analyzed by studying their association with the occurrence of consumers who claimed to have food poisoning after consuming sausage. The overall prevalence of S. aureus contamination from sausages was 25.22% (n=58/230). Over 83.33% of strains showed resistance to at least one of the antibiotics tested. The most important was for tetracycline (58%) followed by fosfomycin (33%), penicillin G (25%), and oxacillin (36%). Moreover, the multiple antibiotic resistance (MAR) index include 20 profiles with MAR >0.2. Of a total of 84 strains included in this study, 73 (86.90%) strains were identified Staphylococci spp. including S. saprophyticus (32.87%), S. aureus (28.76%), S. sciuri (10.95%), S. xylosus (8.21%), S. gallinarum (5.47%), S. vitulinus (4.10%), and S. equorum, S. lentus, S. haemolyticus, with 2.73% followed by S. warneri (1.36%). The rest represented Macrococcus caseolyticus with 13.09% (n=11/84). The MSP dendrogram revealed 4 distinct clusters according to an arbitrary cut-off at the distance level of 500. All S. aureus strains were severely resistant against B-Lactamines (93.65%). For S. saprophyticus, fusidic acid (62.50%) and doxymycin (70.83%) were the most resistance recorded. Thus, M. caseolyticus strains were revealed resistance profile against cefoxitin/erythromycin (63.63%), and clindamycin/tetracyclines (54.54%). There was no resistance to vancomycin. We have detected mecA gene in 5 methicillin-resistant strains confirmed by PCR, with prevalence of 23.80%. Overall, 66.67% of S. aureus isolates were positive for at least one of seven enterotoxins genes identified and 19.05% harboured two to four enterotoxin genes. The predominant ones were seb (38.09%); followed by sea, see, seg, she with (14.28%), and sed with (9.52%). No isolates harboured enterotoxin genes sec were enregistred. S. aureus and Macrococcus caseolyticus isolates found in Algiers raw sausage had enterotoxin genes with predominance of seb and see, respectively and demonsrate that not only S. aureus but also S. haemolyticus, S. sciuri and M. caseolyticus were considred like potential hazard for consumers.More, a combination of sea and see genes was recorded with 14.28% among strains isolates. For the first survey, out of the 440 meat consumers, 22.16% revealed having food poisoning after sausage consumption. The risk factors recorded were: Consumption outside of home (24.30%, OR=1.769, p=0.040), during the summer season (24.30%, OR=1.159) and during lunch (26.50%, OR=1.421). The second one showed that out of the 504 sausage consumers, 22.15% revealed having food-borne poisoning after sausage consumption. Over 53.60 % of sick consumers were hospitalized. The risk factors recorded were: The ages of 18 and 40 years (89.69% OR=1.323; [0.64-2.73]), males (33.00%; OR=1.275; [0.785-2.070]), consumers living with their families (84.54%; OR=1.387; [0.753-2.554]) and consumers that had children (22.68%; OR=1.62; [0.155 -0.320]) which were more affected and more likely to get food-borne diseases after sausage consumption. In addition, young (p=0.00002; 76.29%), woman giving birth (p=0.00001; 25.77%) and pregnant (50.52%) were found to be vulnerable consumers with high risk factors of OR=0.35, OR=2.021, and OR=1.43, respectively. Thus, immuno-deficience consumers (42.27%; OR=3.361) were found to be the leading risk factor recorded among vulnerable consumers. For antibiotic use behavior, out of 97 sick consumers, 52.58% (n=51/97; p=0.003; OR=1.965) had taken antibiotics by themselves, and 41.24% (p=0.008; OR=1.87) had interrupted the antibiotics treatment. Similarly, highest selfmedication were recorded among hospitalized consumers (71.15%; n=37/97) with OR= 7.45 (p=0.00001). Regrettably, the majority (28.85%) declared interrupt the therapeutic protocol after medical guidance with OR=9.96 (p=0.0001). Our studies provide for the first time informations about prevalence of S. aureus contamination in Merguez sold in Algiers, and the high multidrug resistance amongStaphylococci isolates. Thus, findings demonsrate that not only S. aureus but also Staphylococci spp. were considred like potential hazard for consumers and highlights the risk of transmission of Staphylococci spp., Macrococcus caseoltyticus and MRSA strains carying different antimicrobial resistance and virulence genes in raw sausage chain, represents a potential threat for the spread of these pathogens in the community and should be regarded emphasizing the role of the human and food animal as reservoirs of bacterial resistance to reduce and prevent the spread of resistant strains, robust management and monitoring of antibiotic use should be established. Finally, it can be concluded that raw sausage must be consumed with precaution for vulnerable groups at risk (YOPIs) and the application of the HACCP system is essential either in butcheries producing sausage and/or slaughterhouses. Therefore, public education programs should be developed, especially to areas of antibiotics use and to change certain consumption habits of Algerian consumers to ensure food safety