



République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université de Tébessa

Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Département : Biologie appliquée.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de master.

Domaine : Sciences de la nature et de la vie.

Filière : Sciences biologiques.

Option : Microbiologie appliquée à la sante et à l'environnement.

Thème

Recherche des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi dans la viande rouge

Présenté par :

Bouazza Sara
Bouakka Nesrine

Devant le jury :

Boukoucha .M

MCB Université de Tébessa

Président

Debabza .M

MCB Université de Tébessa

Rapporteur

Smaali .S

MAA Université de Tébessa

Examineur

Date de soutenance : 31 Mai 2016

ملخص

ان البكتيريا المعوية المنتجة للبيتاكتماز ذات المجال الواسع تشكل حاليا مشكلة كبيرة للصحة العمومية في جميع أنحاء العالم بسبب الصعوبة في علاج الإصابات الراجعة للبكتيريا المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية .

الهدف من هذا العمل هو تقييم وتيرة تلوث اللحوم الحمراء المسوقة في منطقة تبسة بالبكتيريا المعوية المنتجة للبيتاكتماز ذات المجال الواسع.

العزل، التعريف، بالسلاطات و إختبار الحساسية تمت حسب الطرق المعتادة ،و البحث عن البيتاكتماز ذات المجال الواسع أجريت حسب فحص التصارع و فحص القرص المزوج.

النتائج المتحصل عليها أظهرت تنوعا نسبيا في الأصناف و الأنواع مع غلبة *Klebsiella, Serratia* فيما يخص اختبار الحساسية امكنا استخلاص ان المضادات الحيوية الاكثر فعالية بترتيب تنازلي : الكلورام فينيكول (97,5%)، فيران (95%)، أميكاسين (90%)، جونتامسين (65%)، الحمض الناليديكسيكي، سيفوكسيبتين(62,5%)، في المقابل اشد المقاومة لوحظت ضد المضادات الحيوية : تيكارسلين (92,5%)، فوسفوميسين (62,85%)، أز تريونام (52,5%)، أموكسيليونو (47,5%) فحوص الكشف أظهرت إنتاج البيتاكتماز ذات المجال الواسع لدى 23 سلالة أي 57.5% من بين 40 بكتيريا معوية.

دراستنا أظهرت إنتشار البكتيريا المعوية المنتجة للبيتاكتماز ذات المجال الواسع في اللحوم الحمراء ،مما يتطلب الرصد الصارم لإنتشار هذه البكتيريا المقاومة في مستويات مختلفة.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المعوية ،بيتاكتماز ذات المجال الواسع ،اللحوم الحمراء ،المقاومة للمضادات الحيوية.

Abstract

Extended- spectrum β -lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae, now pose a major public health problem, in the worldwide, because of the difficulty of treatment of infections due to these multiresistant bacteria.

The objective of this work is to evaluate the frequency of red meat contamination marketed in the Tebessa region by ESBL-producing enterobacteriaceae.

The isolation, identification, antibiotic susceptibility testing was performed according to standard methods, and the search for ESBL was performed according to the synergy test and double disk test. The results showed a relative diversity of genera and species, with a predominance of *Klebsiella* and *Serratia*.

As for susceptibility testing, it was found that the most active antibiotics in descending order are: chloramphenicol, furans, amikacin, gentamicin , nalidixic acid cefoxitin . In contrast, the sharpest resistance were observed against antibiotics: ticarcillin, fosfomycin , aztreonam , amoxicillin. Detection tests showed ESBL production in 23 strains or 57.5% from 40 Enterobacteriaceae.

Our study reveals the spread of ESBL-producing enterobacteriaceae in red meat, prompting the need for close monitoring of the spread of these resistant bacteria to different levels.

Key words: Enterobacteriaceae, Extended- spectrum β -lactamase, red meat, antibiotic resistance.

Résumé

Les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) posent actuellement un problème majeur de santé publique, dans le monde entier, à cause de la difficulté des thérapeutiques des infections dues à ces bactéries multirésistantes.

L'objectif de ce travail consiste à évaluer la fréquence de contamination de la viande rouge commercialisée dans la région de Tébessa, par les EBLSE.

L'isolement, l'identification, l'antibiogramme ont été réalisés selon les méthodes usuelles, et la recherche des BLSE a été effectuée selon le test de synergie et le test du double disque.

Les résultats obtenus ont montré une diversité relative des genres et des espèces, avec une prédominance de *Klebsiella* et *Serratia*. Quant à l'antibiogramme, on a pu constater que les antibiotiques les plus actifs par ordre décroissant sont : chloramphénicol (97,5%), furanes (95%), amikacine (90%), gentamycine (65%), acide nalidixique et céfoxitine (62,5%). A l'opposé, les résistances les plus marquées sont observées à l'égard des antibiotiques : ticarcilline (92,5%), fosfomycine (62,85%), aztréonam et amoxicilline (52,5%), amoxicilline/acide clavulanice, tétracycline et triméthoprime-sulfaméthoxazol (47,5%). Les tests de détection ont montré la production de BLSE chez 57,5% parmi 40 entérobactéries.

Notre étude révèle la dissémination des EBLSE dans la viande rouge, ce qui incite le besoin d'un suivi rigoureux de la diffusion de ces bactéries résistantes à différents niveaux.

Mots clés : Entérobactéries, bêta-lactamases à spectre étendu, viande rouge, résistance aux antibiotiques.

Table des matières

ملخص

Abstract

Résumé

Dédicaces

Remerciements

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des symboles

Introduction

Chapitre 01 : Revue bibliographique

I. Entérobactéries	03
1. Définition	03
2. Habitat	03
3. Paroi des entérobactéries	04
4. Caractères bactériologiques	05
4.1. Caractères morphologiques.....	05
4.2. Caractères cultureux.....	06
4.3. Caractères biochimiques.....	06
4.4. Caractères antigéniques	07
5. Principale entérobactérie	08
5.1. <i>Escherichia coli</i>	08
5.2. <i>Salmonella</i>	09
5.3. <i>Shigella</i>	10
5.4. <i>Enterobacter</i>	10
5.5. <i>Klebsiella</i>	11
5.6. <i>Serratia</i>	13
6. Mécanismes de résistance aux antibiotiques	13
II. Bêta-lactamases	
1. Beta-lactamines.....	13
1.1. Définition.....	13
1.2. Classification.....	14
1.3. Mode d'action.....	14
2. Bêta-lactamases.....	15
2.1. Définition.....	15
2.2. Classification	16
3. β -lactamases à spectre étendu	16
3.1. Définition	16
3.2. Classification.....	16

3.3. Épidémiologie	18
III. Viande rouge	19
1. Définition.....	19
2. Composition.....	19
3. Nature des germes des viandes	19
3.1. Germes saprophytes et Germes tests d'hygiène.....	19
3.2. Germes pathogènes	20
4. Sources de contamination	20

Chapitre 02 : Matériel et méthodes

I. Matériel.....	22
1. Appareillages.....	22
2. Verrerie.....	22
3. Outils.....	22
4. Réactifs et autres substances.....	22
5. Milieux de culture.....	23
II. Méthodes.....	23
1. Prélèvement.....	23
2. Préparation de la suspension mère.....	24
3. Préparation des dilutions.....	24
4. Recherche des entérobactéries totales.....	25
5. Recherche de <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i>	25
5.1. Pré-enrichissement.....	25
5.2. Enrichissement.....	25
5.3. Isolement	25
6. Examen macroscopique et microscopique	25
7. Purification	26
8. Conservation des isolats	26
9. Identification biochimique	26
10. Test de l'antibiogramme	30
11. Recherche d'une BLSE	34
11.1. Test de synergie	34
11.2. Test de double disque	35

Chapitre 03 : Résultats et discussion

1. Examen macroscopique	37
2. Examen microscopique	37
3. Identification biochimique	37
3.1. Répartition des souches isolées selon les genres	42
3.2. Répartition des souches selon les espèces	44
4. Test de sensibilité aux antibiotiques	45
5. Détection des BLSE	50
6. Fréquence des EBLSE	52
7. Sensibilité aux antibiotiques des souches EBLSE	53

Conclusion	57
Références bibliographies	
Annexes	

Remerciement

Nullle œuvre n'est exaltante que celle réalisée avec le soutien moral et financier des personnes qui nous sont proches.

Nous remercions notre encadreur "Mme. Mechai .M" pour son aide et son encouragement qu'il na cessé de nous communiquer.et pour sa précieuse attention n'oublions pas sa confiance qu'elle nous a aider pour complété ce travail, vraiment c'est la meilleur promoteur puisque très sympathique, stricte et gentille.

Nous tenons particulièrement a remercier vivement : notre

Co-encadreur Mr Machai Pour leurs directives, conseils et encouragement qu'il nous a prodigué.

Nous remercions les membres de jury pour avoir accepter d'évaluer notre travail.

Sans oublier nos chers parents jamais nous ne saurons m'exprimé quant aux sacrifices et aux dévouements que vous consacrés à nous éducation et nous études

Nous remercions Pour nos très chers amis a toutes la promotion des 2^{ème} années master en microbiologie appliquée sur la santé et l'environnement : 2016-2017

N'oublions pas la technicien Linda pour leur effort et leur confiance.

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Caractères biochimiques de quelques entérobactéries	06
02	Prélèvements réalisés au cours de l'étude	24
03	Lecture de la galerie miniaturisée Api 20E	29
04	Liste des antibiotiques testés	31
05	Résultats des tests d'identification biochimique réalisée par l'API 20 E	38
06	Effectif et pourcentage des souches selon des genres	42
07	Effectif et pourcentage des souches selon les espèces	44
08	Résultats du test de la sensibilité aux antibiotiques	46
09	Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées	49
10	Résultats des tests de détection de BLSE	51
11	Effectifs et pourcentages des souches EBLSE en fonction des espèces	52
12	Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des EBLSE	54

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif	04
02	Structure des bêta-lactamines	13
03	Mode d'action des bêta-lactamines	14
04	Mode d'action des bêta-lactamases	15
05	Galerie API20E	26
06	Schéma explicatif de la disposition des disques d'antibiotiques	33
07	Description de l'image de synergie	35
08	Schéma explicatif du test du double disque.	36
09	Quelques aspects macroscopiques sur les différents milieux utilisés	37
10	Photographie de l'Api 20 ^E de la souche 11 (<i>Serratia odorifera</i> l)	41
11	Photographie de l'Api 20 ^E de la souche 17 (<i>Klebsiella ornithinolytica</i>)	41
12	Photographie de l'Api 20 ^E de la souche 28 (<i>Klebsiella oxytoca</i>)	41
13	Photographie de l'Api 20 ^E de la souche 30 (<i>Klebsiella terrigena</i>)	41
14	Photographie de l'Api 20 ^E de la souche 36 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	41
15	Photographie de l'Api 20 ^E de la souche 40 (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	41
16	Photographie de l'Api 20 ^E de la souche 22 (<i>Enterobacter gergoviae</i>)	42
17	Photographie de l'Api 20 ^E de la souche 20 (<i>Proteus vulgaris</i>)	42
18	Photographie de l'Api 20 ^E de la souche 37 (<i>Citrobacter koseri/farmeri</i>)	42
19	Photographie de l'Api 20 ^E de la souche 01 (<i>Hafni aalvei</i> 1)	42
20	Répartition des souches en fonction des genres	43
21	Répartition des souches en fonction des espèces	44
22	Histogramme représentatif de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées	50
23	Photographies du test de synergie positif	51
24	Photographies du test de double disque positif	52

Liste des figures (**suite**).

N°	Titre	Page
25	Répartition des souches EBLSE en fonction des espèces	53
26	Histogramme représentatif de la sensibilité aux antibiotiques des souches EBLSE	55

Liste des symboles

µm : Micromètre.

β -lactamase: Bêta-lactamases.

ADH : Arginine dihydrolase.

AK : Amikacine.

AMC : Amoxiciline+Acide.clavulanique.

AMX: Amoxicilline.

AMY: Amygdaline.

ATM: Aztréonam.

API20E : Analytical profile index 20E (E : Entérobactérie).

ARA : Arabinose.

BLSE : β-lactamase à spectre étendu.

CAZ: Céftazidime.

C°: Degré Celsius.

C1G : céphalosporines de première génération.

C2G: céphalosporines de seconde génération.

C3G : céphalosporines de troisième génération.

C4G : céphalosporines de quatrième génération.

C : Chloramphénicol.

CIT : Citrate.

cm : Centimètre.

CN : Gentamicine.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

CTX : Céfotaxime.

CTX-M : Cefotaximase- Munich.

DCLS : Désoxycholate Citrate Lactose Sucrose.

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

F : Nitro-furane.

FOS : Fosfomycine.

FOX : Céfoxitine.

GEL : Gélatinase.

GLU : glucose.

GN : Gélose nutritive.

H₂S : Sulfure d'hydrogène.

I : Intermédiaires.

IND: Indole.

INO: inositol.

IPM: Imipénème.

LDC : Lysine décarboxylase.

LPS: Lipopolysaccharide.

MC : Mac Conkey.

MAN :Mannitol

MEL: Mélibiose.

MH : Mueller-Hinton.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

mn : minutes

N₂ : Azote.

NA: Acide nalidixique.

NIT : Nitrate réductase.

NO₂: Nitrite.

ODC : Ornithine décarboxylase.

OFX : Ofloxacin.

ONPG : Orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside.

OXA : Oxacillines.

PEF :Péfloxacin.

PLP : Protéine Liant la Pénicilline.

R : Résistante.

RHA: Rhamnose.

S : Sensible.

SAC: D-saccharose

SHV: Sulfhydryl variable.

SOR: D-sorbitol.

SS : *Shigella Salmonella*.

SXT:Triméthoprim-Sulfaméthoxazol.

TDA : Tryptophane désaminase

TE : Tétracyclines.

TEM: Temoniera

TIC: Ticarcilline

URE : Urée.

VP : Voges-Proskauer.

VRBG : Violet Red Bile Glucose agar.

Zn : Zinc.



Introduction



Introduction

Depuis le début des années 60, nous assistons à une augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, et à l'émergence de nouvelles résistances [59].

L'antibiorésistance bactérienne devient aujourd'hui un problème majeur de santé publique extrêmement préoccupant, dont les conséquences se mesurent en termes de difficultés thérapeutiques accrues [60].

Parmi les bactéries multi résistantes, les bactéries sécrétrices des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) prennent une place de plus en plus importante. Elles ont largement été diffusées dans le monde depuis leur première mise évidence en 1983 et font l'objet de nombreuses études [61] [62].

Plusieurs études ont été menés sur la recherche des entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE) dans différents environnements : en particulier dans l'environnement hospitalier et même dans l'environnement naturel (eaux usées) et les produits alimentaires (surtout les viandes). Dans cette optique, notre travail porte sur la recherche des EBLSE dans un produit d'origine animale : la viande rouge.

La viande étant une denrée périssable, elle a été traditionnellement considérée comme le véhicule de nombreuses maladies d'origine alimentaire chez l'homme. Sa composition en eau et en protéines de haute valeur biologique fait qu'elle est une niche très favorable au développement des microorganismes tel que les entérobactéries [63].

Les objectifs de ce travail sont donc :

- 1) Evaluer la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées de la viande rouge.
- 2) Evaluer la fréquence de contamination de la viande par les EBLSE.
- 3) Evaluer l'influence de la viande rouge contaminée par les EBLSE sur la santé humaine.
- 4) Evaluer la contribution de cette denrée contaminée à la diffusion de la résistance dans la chaîne alimentaire.

Enfin, ce manuscrit est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre est une revue bibliographique qui commence par des généralités sur les entérobactéries, puis leurs mécanismes de résistance aux bêta-lactamines, précisément par production de BLSE, et se finit par l'aspect microbiologique de la viande rouge. Dans le deuxième chapitre, nous évoquerons le matériel et les méthodes utilisés dans l'isolement, l'identification, l'étude de sensibilité aux antibiotiques et la détection des BLSE. Ensuite, dans le dernier chapitre, nous présentons les résultats obtenus, ainsi que leur discussion. Finalement, une synthèse d'une conclusion générale puis quelques perspectives seront présentées.



Chapitre 01

Revue bibliographique



I. Entérobactéries

1. Définition

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend de nombreux genres bactériens répondant à la définition suivante :

- Bacilles à Gram négatif (BGN),
- Aéro-anaérobies facultatifs,
- Mobiles par ciliature péritriche ou immobiles,
- Facilement cultivables,
- Fermentant le glucose,
- Réduisant les nitrates en nitrites,
- Ne possèdent pas d'oxydase,
- Poussant sur milieux de culture ordinaires,
- Possédant une catalase à l'exception de *Shigella dysenteriae* [1].

Les entérobactéries sont une famille très hétérogène pour ce qui est de leur pathogénie et de leur écologie [2]. Elle comprend 130 espèces actuellement répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent aux genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*.

Les espèces qui composent cette famille sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp*), soit encore saprophytes (*Serratia sp*, *Enterobacter sp*) [3].

2. Habitat

Elles sont très répandues, certaines ne sont retrouvées que dans l'environnement, en particulier dans les milieux humides. La plupart des genres comportent des espèces pathogènes qui provoquent des troubles dont la gravité varie énormément d'une souche à l'autre. Certaines sont responsables de maladies des végétaux (phytopathogènes) et d'autres pour l'animal [4].

On peut les retrouver dans de nombreux écosystèmes :

- certaines espèces sont seulement saprophytes : milieux humides surtout, sols, eaux, végétaux, produits alimentaires.
- mais la plupart des espèces sont commensales, isolées dans l'intestin de l'homme et des animaux, d'où le nom d'entérobactéries [4].

3. Paroi des entérobactéries

Les entérobactéries sont des BGN et possèdent donc une paroi dont la structure en trois couches est particulière à ces bactéries. Cette paroi est constituée de l'extérieur vers l'intérieur : d'une membrane externe, d'une couche mince de peptidoglycane et d'un espace périplasmique qui entoure la membrane cytoplasmique (**Figure 01**).

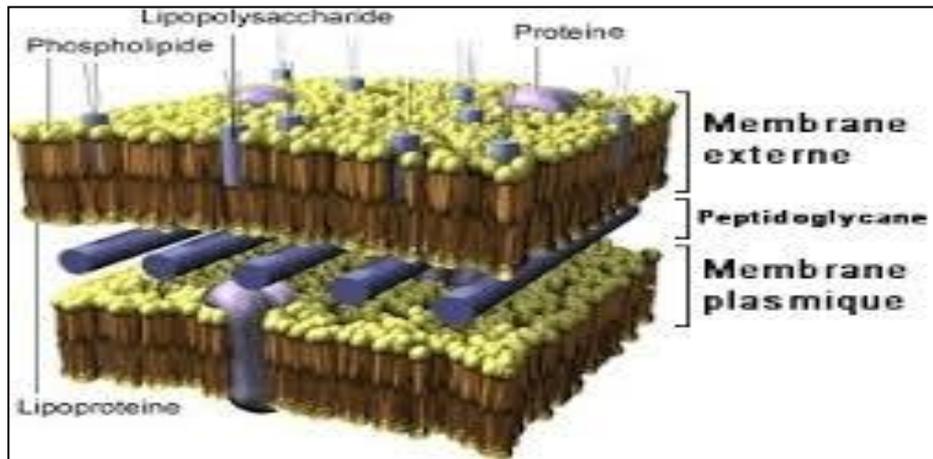


Figure 01 : Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif.

La membrane externe protège les entérobactéries de l'action des sels biliaries et des ferments digestifs. Elle est constituée d'une double couche lipidique dans laquelle sont inclus des molécules de lipopolysaccharide (LPS) qui comprend trois parties :

- le lipide A qui est l'endotoxine ;
- le core central, polysaccharide de base (constituant l'antigène R) ;
- les polyosides des chaînes latérales (constituant les antigènes O).

S'y trouvent aussi des protéines diverses dont les porines qui en se polymérisant, forment des canaux assurant le passage des molécules hydrophiles à travers cette membrane externe.

Le peptidoglycane constitue une couche rigide, plus mince et plus lâche que chez les bactéries à Gram positif. Il est composé de chaînes linéaires de polyosides reliées entre elles par des peptides. L'assemblage et le remodelage du peptidoglycane sont sous la dépendance de transpeptidases et de carboxypeptidases qui fixent les bêta-lactamines et sont pour cette raison dénommées PBP (pour Penicillin binding proteins) ou PLP (pour Protéines de liaison aux pénicillines) [5].

Dans l'espace périplasmique s'accumulent des enzymes qui dégradent les substances prélevées dans le milieu extérieur et nécessaires au métabolisme de la bactérie. On y trouve également les bêta-lactamases capables d'hydrolyser les bêta-lactamines.

La membrane cytoplasmique est constituée, comme toutes les membranes cellulaires, d'une double couche phospholipidique hydrophobe dont la perméabilité est rendue sélective par la présence de protéines dénommées perméases. De nombreuses enzymes et notamment celles qui interviennent dans le métabolisme énergétique sont insérées dans cette membrane. S'y trouvent aussi, sur sa face externe, les transpeptidases et carboxypeptidases nécessaires à la synthèse du peptidoglycane [5].

4. Caractères bactériologiques

4.1. Caractères morphologiques

- Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif de 2 à 3 micromètres de long sur 0,6 de large.
- Les *Proteus* sont très polymorphes : formes longues et filamenteuses ou petits bacilles droits.
- Les espèces mobiles - les plus nombreuses - le sont grâce à une ciliature péritriche.
- Certaines sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*).
- Les *Klebsiella* sont capsulées.
- La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili communs qui sont des facteurs d'adhésion [6].

4.2. Caractères culturels

Les entérobactéries se développent rapidement *in vitro* sur des milieux ordinaires. La température optimale de croissance est 37°C, mais la culture est possible entre 20° et 40°C. Leur temps de division varie de 20 à 40 minutes. Pour la plupart des espèces, les colonies formées après 18-24 heures d'incubation à 35-37 °C sont bombées, rondes et régulières, leur surface est lisse et brillante, il s'agit des formes S « Smooth » [7].

Sur gélose, les colonies atteignent 2 millimètres de large sauf celles des *Yersinia* qui sont plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges, grasses et luisantes. En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme du bouillon [7].

4.3. Caractères biochimiques

Le tableau ci-dessous résume les caractères d'identification des genres des entérobactéries le plus fréquemment rencontrés [8].

Tableau 01 : Caractères biochimiques de quelques entérobactéries.

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Glu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lac	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-
VP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Cit	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Mob	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
H2S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-

Glu:Glucose ;**Lac:**Lactose;**ONPG:**Orthonitrophénol-bêta-galactosidase ;**VP:**Voges-Proskauer;**Cit :** Citrate; **Mob:** Mobilité ;**H₂S:** Sulfure d'hydrogène.

4.4. Caractères antigéniques

Les entérobactéries possèdent différents antigènes :

- **L'antigène de Kunitz :** c'est un antigène commun dénommé ECA (pour Enterobacterial Common Antigen). Il n'existe que chez les entérobactéries et, de ce fait, a un intérêt taxonomique. Sa présence chez les *Yersinia* a permis d'inclure ce genre dans la famille des entérobactéries [9].
- **Les antigènes O ou somatiques :** ces antigènes correspondent aux polysides fixés sur les LPS. Ils sont thermostables et résistent à l'alcool.
- **L'antigène R :** il correspond au polysaccharide du core central. auto agglutinables dans l'eau physiologique, plus sensibles aux substances bactéricides du sérum, plus facilement phagocytées et donc moins pathogènes.
- **Les antigènes H ou flagellaires :** ils n'existent que chez les souches mobiles. Constitués de protéine spécifique dénommée flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool.
- **Les antigènes de surface :** ils comprennent :
 - ✓ **Les antigènes K ou capsulaires :** ils sont de nature polysaccharidique. Lors d'un sérotypage, chez les *Escherichia coli*, les *Shigella* ou chez certaines *Salmonella* et *Citrobacter* (alors appelés Vi), ces antigènes masquent l'agglutination par les anticorps anti O qui peut être restituée après chauffage de la souche car ils sont détruits par ébullition.
 - ✓ **Les antigènes d'adhérence ou adhésines :** ils sont de nature protéique, portés par des pili communs (encore appelés fimbriae) [9].

5. Principales entérobactéries

5.1. *Escherichia coli*

- **Habitat**

E. coli est une bactérie intestinale des mammifères, commensale du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux, c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif [10].

- **Caractères bactériologiques**

E. coli est une entérobactérie mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. Il est en outre acétoïne -, citrate -, H₂S -, gaz +, uréase- [10].

- **Pouvoir Pathogène**

En médecine humaine, les *E. coli* peuvent donner lieu à divers types d'infections: infections urinaires, intestinales, néonatales, septicémies et méningites. Certaines souches d'*E. coli* sont virulentes, d'autres appartenant à la flore commensale, peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets immunodéprimés [4] [11].

- **Sensibilité aux antibiotiques**

E. coli est généralement sensible aux antibiotiques. Parmi les bêta-lactamines, sont actives les pénicillines du groupe A (aminopénicillines), les carboxypénicillines, les céphalosporines, les acyluréido-pénicillines, les carbapénems et les monobactams. Les aminosides et les polypeptides sont également actifs de même que les quinolones de première génération, les fluoroquinolones et le cotrimoxazole. Cette sensibilité peut être modifiée par la production d'enzymes hydrolysant les bêta-lactamines (pénicillinase, céphalosporinase) [12].

5.2. *Salmonella*

- **Habitat**

Les salmonelles sont des parasites intestinaux des animaux vertébrés qui se disséminent dans la nature par les excréta. Chez les animaux à sang chaud, elles sont souvent pathogènes. Les aliments susceptibles de contenir ces bactéries, citons les viandes crues ou insuffisamment cuites, le lait non pasteurisé et les œufs. Les fruits et les légumes

peuvent aussi contenir ces bactéries si le sol, dans lequel ils ont été cultivés, a été contaminé par des déchets animaux [13].

- **Caractères bactériologiques**

Les Salmonelles sont: uréase-, indole -, lactose -, H₂S +, citrate +. Certains sérovars ont des caractères particuliers [13].

- **Pouvoir Pathogène**

Les salmonelloses peuvent donner lieu à trois types de manifestations cliniques :

- ✓ **Des formes bactériémiques**, strictement humaines, qui sont les fièvres typhoïde et paratyphoïde dues à *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B et Paratyphi C. Ce sont des bactériémies à point de départ lymphatique.
- ✓ **Des toxi-infections alimentaires** donnant lieu à des gastro-entérites dues à tous les autres sérovars mais également à Paratyphi B et C.
- ✓ **Des manifestations extra-digestives** dans lesquelles divers sérovars sont en cause et qui sont plus fréquentes chez les sujets fragilisés (infections pleuro-pulmonaires, atteintes ostéo-articulaires, ...) [14].

- **Sensibilité aux antibiotiques**

Les Salmonelles sont naturellement sensibles aux antibiotiques. Le chloramphénicol a été longtemps l'antibiotique de choix et a été remplacé par les fluoroquinolones et le cotrimoxazole [15].

5.3. *Shigella*

- **Habitat**

Les *Shigella* ne font partie d'aucune flore commensale chez l'être humain, elles sont toutes pathogènes et spécifiques du tube digestif ; éliminées par les selles et dispersées dans les sols et les eaux où elles ne survivent que peu de temps [16].

- **Caractères bactériologiques**

Les Shigelles sont: Uréase -, Indole+/-, Lactose -, H₂S-, Citrate -, ONPG +/- [7].

- **Pouvoir pathogène**

Les shigelles provoquent chez l'adulte de colites infectieuses et chez l'enfant de gastro-entérites sévères avec diarrhée mucopurulente et sanglante, fièvre et déshydratation. Elles détruisent l'épithélium de côlon et provoquent la production d'une microulcération [7].

- **Sensibilité aux antibiotiques**

Le traitement curatif repose sur l'administration d'antibiotiques : ampicilline, cotrimoxazole, fluoroquinolones [15].

5.4. *Enterobacter*

- **Habitat**

Les *Enterobacter* sont présents dans l'environnement, et également des commensaux du tube digestif [17].

- **Caractères bactériologiques**

Ce sont des entérobactéries mobiles, VP+, Lactose+, ONPG+, Urée-, Indole -, Citrate +, H₂S- [17].

- **Pouvoir Pathogène**

Ce sont des pathogènes opportunistes responsables, en milieu hospitalier surtout, d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses [17].

- **Sensibilité aux antibiotiques**

Enterobactercloacae oppose une résistance naturelle aux pénicillines A et aux céphalosporines de 1ère génération. Il a souvent acquis une polyrésistance, en particulier aux bêta-lactamines par production d'une céphalosporinase déréprimée.

Les autres espèces sont généralement plus sensibles aux antibiotiques, sauf en cas d'acquisition de résistances d'origine plasmidique (bêta-lactamase à spectre étendu d'*Enterobacter aerogenes*, par exemple) [17].

5.5. *Klebsiella*

• Habitat

Les *Klebsiella* sont très répandues dans la nature : eaux de surface, eaux usées, effluents industriels, sols, le bois, les végétaux divers, les aliments. Ce sont aussi des commensales du tube digestif des animaux et de l'homme. On peut les rencontrer aussi à l'état commensal sur la peau et les muqueuses, notamment les muqueuses respiratoires [18].

• Caractères bactériologiques

Ces bactéries sont : LDC⁻ (lysine-décarboxylase) ; ODC⁻ (l'ornithine-décarboxylase), ADH⁻ (l'arginine déshydrogénase) ; VP⁺ ; mobilité-, capsule+, ONPG +, uréase+ [18].

• Pouvoir pathogène

Chez l'homme, *K. oxytoca* et *K. pneumoniae* sub sp. *pneumoniae* sont responsables d'infections diverses : infections suppuratives, infections biliaires, infections hépatiques, infections intra-abdominales. Certaines souches de *K. pneumoniae* sub sp. *Pneumoniae* sont responsables des diarrhées chez le jeune enfant.

Classiquement, les klebsielles ne sont pas considérées comme des agents de toxi-infections alimentaires. Toutefois, lors d'une toxi-infection alimentaire consécutive à la consommation de viande de dinde, une souche de *Klebsiella pneumoniae* sub sp. *pneumoniae* capable de produire une entérotoxine a été isolée de la viande et des selles des malades [18].

• Sensibilité aux antibiotiques

Les souches de *Klebsiella oxytoca*, de *Klebsiella pneumoniae* sub sp. *pneumoniae* et de *Klebsiella variicola* sont naturellement sensibles à la colistine, aux quinolones, aux aminosides, à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole. En revanche, elles sont naturellement résistantes aux : aminopénicillines, carboxypénicillines [18].

5.6. *Serratia*

- **Habitat**

D'une manière générale, les espèces du genre *Serratia* sont isolées des plantes (légumes, champignons, mousses), on les trouve aussi dans le tube digestif de l'homme, des rongeurs, des insectes, ainsi que dans le sol, l'eau. *Serratia* est capable aussi de se développer sur des aliments tels que le pain, la viande et le lait [19].

- **Caractères bactériologiques**

Serratia sont des bactéries ONPG⁺, VP⁺, indole⁻, H₂S⁻, urease⁻, TDA⁻.

La plupart des espèces produisent un pigment rouge à rose, appelé prodigiosine [19].

- **Pouvoir pathogène**

Les espèces de *Serratia* sont des agents pathogènes opportunistes. Elles sont à l'origine d'une multitude d'infections, dont la bactériémie, la pneumonie, les infections liées aux cathéters intraveineux, l'ostéomyélite, l'endocardite, mais elles sont rares.

En médecine vétérinaire, *Serratia marcescens* est un agent des mammites chez la vache laitière [20].

- **Sensibilité aux antibiotiques**

Les *Serratia* présentent une résistance naturelle aux céphalosporines de première génération, à la colistine et à la polymyxine B. De plus, les souches de *Serratia marcescens* sub sp. *marcescens* (notamment les souches hospitalières) et plus rarement les souches des autres espèces ont évolué vers la résistance à de nombreux antibiotiques (ampicilline, carbénicilline, tétracyclines, aminosides, chloramphénicol, sulfamides, triméthoprime...) [21].

6. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

De manière générale, les entérobactéries utilisent différents mécanismes pour développer une résistance aux antibiotiques : il peut s'agir de troubles de perméabilité pour les antibiotiques, ce qui empêche la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie; de systèmes d'efflux qui permettent d'évacuer les antibiotiques qui auraient pénétré dans la bactérie; ou de modification de la cible bactérienne de l'antibiotique (ex : PBP, ce qui empêche la synthèse de la paroi de la bactérie ou la modification de la gyrase pour les quinolones). Mais le plus fréquemment, il s'agit d'enzymes détruisant les bêta-lactamines, les bêtalactamases [22].

II. Bêta-lactamases

1. Bêta-lactamines

1.1. Définition

Ce sont des antibiotiques caractérisés par la présence constante du cycle bêta-lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables (**figure 02**). L'ensemble des bêta-lactamines forme une large classe d'antibiotiques qui comprend les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs de bêta-lactamases. Elles sont des acides relativement forts et franchissent parfois difficilement les membranes bactériennes [23].

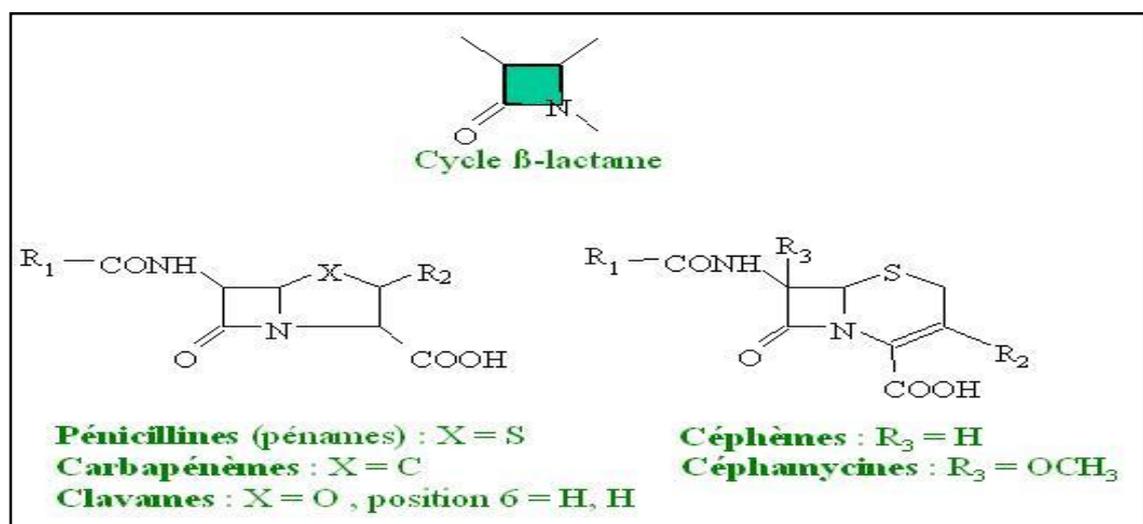


Figure 02 : Structure des bêta-lactamines

1.2. Classification

Les β -lactamines sont classées en quatre groupes (**figure 02**):

- **Les pénicillines** (noyau pénème) dont font partie la pénicilline G, la méticilline, les amino-benzyl pénicillines (ampicilline et amoxicilline), les uréido-pénicillines (pipéracilline), les carboxy-pénicillines (ticarcilline) et les amidino-pénicillines (mécillinam).

- **Les céphalosporines** (noyau céphème) constituées de 4 générations : la première (céfaloquine, céfalexine), la deuxième (céfmandole, céfoxitine), la troisième (céfotaxime, ceftazidime) et la quatrième génération (céfépime, ceftiprome).

- **Les carbapénèmes** (noyau carbapénème) qui sont les plus efficaces actuellement (imipénème, méropénème).

- **Les monobactames** (noyau azétidine) représentés par l'aztréonam [24].

1.3. Mode d'action

Les bêta-lactamines agissent en se fixant sur des enzymes présents dans la synthèse de la paroi bactérienne. L'inhibition de ces enzymes fait accumuler des précurseurs du peptidoglycane qui activent le système autolytique de la bactérie (**figure03**) [25].

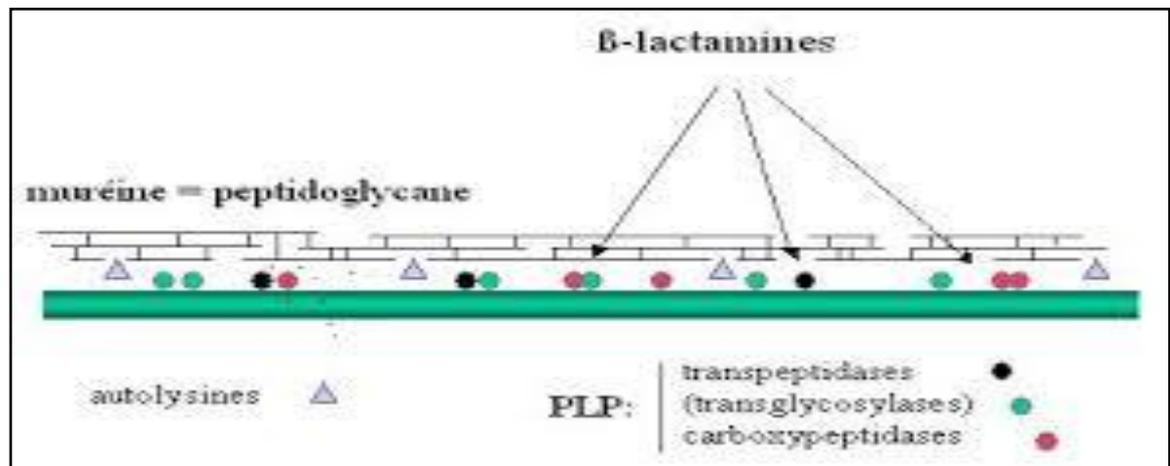


Figure 03 : Mode d'action des bêta-lactamines.

2. Bêta-lactamases

2.1. Définition

Les β -lactamases sont des enzymes, constitutionnelles ou acquises, produites par les bactéries [26]. Elles catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison

amide du cycle β -lactame des β -lactamines, en donnant un produit qui perd totalement son activité antimicrobienne [27].

Leur activité enzymatique provoque l'ouverture du cycle beta-lactame et crée un intermédiaire acyl-enzyme instable qui est ensuite dégradé en un acide inactif. La première β -lactamase est appelée « pénicillinase » [26]. (Figure 04).

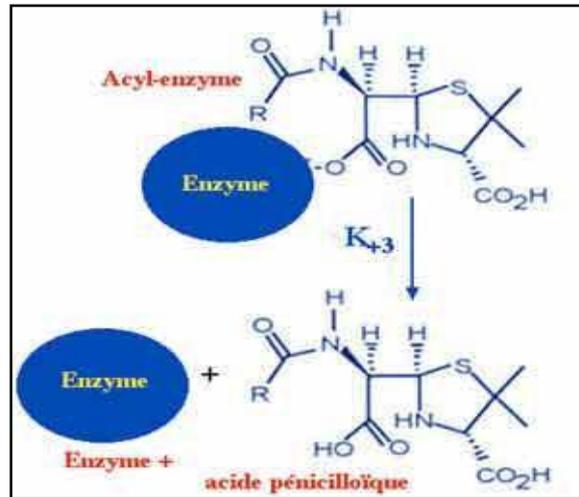


Figure 04 : Mode d'action des bêta-lactamases.

2.2. Classification

Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation, d'une extrême diversité, de type sérine ou métallo-enzymes. Deux types de classification sont principalement utilisés pour ces enzymes :

a) Classification d'Ambler

Elle est établie selon la séquence protéique primaire, notamment au niveau du site actif. On distingue quatre classes :

- ✓ **Classe A** : elle comprend des pénicillinases, des céphalosporinases inducibles (AmpA) chromosomiques ou plasmidiques, et des β -lactamases à spectre étendu (BLSE), sensibles à l'acide clavulanique.
- ✓ **Classe B** : cette classe constitue le groupe des métallo-enzymes zinc-dépendantes (AmpB), pouvant être inhibées par acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA).
- ✓ **Classe C** : elle est constituée de céphalosporinases (AmpC) chromosomiques ou plasmidiques, résistantes à l'acide clavulanique.
- ✓ **Classe D** : oxacillinases (AmpD), le plus souvent plasmidiques, de phénotype pénicillinases peu sensibles aux inhibiteurs, pouvant être inhibées par le NaCl [28].

b) Classification de Bush, Jacoby et Medeiros

Elle est établie selon les propriétés fonctionnelles de l'enzyme définies par son substrat préférentiel et son profil d'hydrolyse [28].

3. β -lactamases à spectre étendu

3.1. Définition

Le terme BLSE a été proposé pour la première fois en 1988 pour distinguer les β -lactamases plasmidiques donnant la résistance aux céphalosporines à large spectre d'où le nom « β -lactamases à large spectre » [29]. Les BLSE engendrent une résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes. Elles sont inhibées in vitro par l'acide clavulanique. Le plus souvent, elles sont d'origine plasmidique à rapidité de diffusion et d'évolution.

Les BLSE ont aujourd'hui une répartition mondiale [29]. Leur apparition dans les bactéries à Gram négatif et leur dissémination coïncidente avec l'utilisation d'antibiotiques à large spectre tels que les céphalosporines et les quinolones. Les bactéries productrices de BLSE peuvent occasionner des infections hospitalières et communautaires.

Actuellement plus de 400 BLSE naturelles ont été décrites; elles ont été classées en 11 familles différentes sur la base de leur séquence d'acides aminés: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA.

3.2. Classification

a) BLSE de type TEM

Les BLSE de types TEM (Temoneira - nom du patient) dérivent de TEM-1 et TEM-2 (enzymes principalement chromosomiques) par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés. C'est l'enzyme la plus fréquemment rencontrée chez *E. coli*, mais elle est aussi présente chez de nombreuses espèces telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Haemophilus influenza* et *Neisseria gonorrhoeae*.

Jusqu'à 90% de la résistance à l'ampicilline chez *E. coli* est due à la production de TEM-1, qui est capable d'hydrolyser l'ampicilline, et à un degré moindre l'oxacilline ou la céfalotine [30].

b) BLSE de type SHV

Les BLSE de type SHV (Sulfhydryl variable) se retrouvent plus fréquemment mais pas exclusivement, dans le genre *Klebsiella*. La majorité de ces enzymes ont été décrites

chez les souches de *K. pneumoniae*, mais aussi peut se trouver chez *Citrobacter freundii*, *C. diversus*, *E.coli*, *Enterobacter cloacae* et *P.aeruginosa* [31].

c) BLSE de type OXA

Les BLSE de type OXA (oxacillinase) sont comparativement rares, et ont été trouvés la plupart du temps chez *P. aeruginosa*. Les BLSE de type OXA portent typiquement des mutations multiples, les dérivés d'OXA-10 portent souvent des substitutions au niveau de Gly167, qui sont responsables de la résistance au ceftazidime. Ces BLSE peuvent être plasmidiques ou chromosomiques. OXA-23 une enzyme chromosomique caractérisée chez *P. mirabilis*, et OXA-48 une enzyme plasmidique caractérisée chez *K. pneumoniae* présentent une activité carbapénémase [32].

d) BLSE de type CTX-M

Les BLSE de type CTX-M (Céfotaximase-Muenchen) sont les plus fréquentes, mondialement, au sein des entérobactéries après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90. Au niveau de leur spectre d'activité, elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime, d'où leur nom de céfotaximase. Certaines d'entre elles ont évolué plus récemment par mutation (ponctuelle ou non) [33]. Générant un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles les enzymes CTX-M-15, CTXM-16, CTX-M-19, CTX-M-23 ou encore très récemment CTX-M-32 [33].

3.3. Épidémiologie

Les BLSE sont retrouvées essentiellement dans la famille des entérobactéries, principalement *Escherichia coli* et *Klebsiella*, plus rarement *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* ou des bactéries à Gram négatif non fermentatives comme *Pseudomonas*, *Acinetobacter* [34].

Depuis la première découverte de bactéries productrices de BLSE, on observe une augmentation du nombre de patients colonisés et du nombre d'infections à ces germes, ainsi qu'une très grande hétérogénéité de ces enzymes avec une nomenclature complexe. Les BLSE type TEM et SHV ont été décrites en premier dans le milieu hospitalier, en particulier chez *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et d'autres entérobactéries.

Indépendamment, en milieu communautaire, ce sont les BLSE type CTX qui sont apparues dans *E. coli*, liées à des infections urinaires. Au cours des dernières années, on a

observé une circulation des souches entre les milieux hospitalier et communautaire. Il est clairement établi que le développement et la propagation de BLSE sont liés à l'utilisation des bêta-lactamines, que la colonisation du tube digestif joue un rôle important, mais le mode de transmission n'est pas clairement établi (contact cutané, consommation d'aliments) [34].

Les souches productrices de BLSE étaient souvent associées à des épidémies nosocomiales. A partir de 1995, de nouvelles BLSE notamment les CTX-M ont émergé de façon rapide chez les entérobactéries. Contrairement aux BLSE de type TEM et SHV, les mécanismes de diffusion de CTX-M semblent plus complexes, mettant en jeu la diffusion des plasmides et/ou d'autres éléments génétiques. [34].

III. Viande rouge

1. Définition

Le terme « viandes de boucherie » désigne la chair (le muscle) des animaux comestibles élevés (ou chassés) pour la consommation alimentaire. Les viandes sont classées en différentes catégories parmi lesquelles les viandes rouges comme le bœuf et le mouton [35].

2. Composition

La viande « rouge » est un aliment qui constitue une source importante des protéines (15 à 25%). Elle contient aussi des lipides (5 à 30%) qui sont en quantité très variable selon l'animal et le morceau. Les acides gras les plus abondants sont le palmitique, le stéarique, et l'oléique [36]. Les viandes ne contiennent pas des glucides. En effet, le glycogène présent dans les muscles est transformé en acide lactique après la mort de l'animal ; cet acide exerce une action favorable sur la maturation de la viande ; dans le foie, il reste un peu de glycogène [37]. La viande est composée aussi d'eau, d'acides aminés, de sels minéraux et de vitamines.

Le pigment de la viande est la myoglobine qui lui donne sa couleur rouge caractéristique qui passe au brun lors de l'oxydation (longue conservation, cuisson) et qui se trouve dans les muscles et assure le transport de l'oxygène et du fer [38].

3. Nature des germes des viandes

La microflore de contamination des viandes et des produits à base de viande comprend essentiellement les germes saprophytes et les germes tests d'hygiène et éventuellement une flore pathogène responsable des maladies [39].

3.1. Les germes saprophytes et les germes tests d'hygiène

Les germes saprophytes constituent l'essentiel de la microflore de contamination des viandes et produits à base de viande. Parmi les bactéries saprophytes isolées des viandes, nous pouvons citer par ordre d'importance d'abord *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Micrococcus* ; il y a ensuite : les entérobactéries et *Flavobacterium* et enfin : *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* et *Clostridium*. La plupart des espèces de *Pseudomonas* sont psychrotrophes et celles les plus fréquemment rencontrées chez l'homme sont *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* [18]. Leur présence au niveau des chaînes d'abattage et en particulier dans les chambres froides constitue une source permanente de contamination des viandes. *Pseudomonas* est principalement utilisé comme indicateur d'altération des viandes fraîches [40].

Les hygiénistes font une place à *E.coli*, aux coliformes fécaux et entérocoques en général. Ces bactéries sont considérées comme provenant directement du tube digestif. Cependant *E. coli* demeure actuellement le seul et le plus sûr des germes tests à utiliser en hygiène publique [39].

3.2. Germes pathogènes

Les germes pathogènes qui contaminent les viandes et responsables de toxico-infections alimentaires sont en général *Salmonella ssp*, *Listeria monocytogene*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* et *E.coli* entéro hémorragiques [41].

4. Sources de contamination

Les carcasses des animaux et les viandes découpées sont contaminées par les poils, les fèces des animaux ou les manipulations durant les opérations d'abattage (Couteaux,

machette etc...), l'eau de lavage, le contenu du tube digestif, la peau avec ses poils et de traitement des viandes [42].

- **Contamination ante- mortem**

Cette contamination se fait soit par septicémie, soit par bactériémie par des germes dont l'habitat naturel est l'organisme [43]. Les bactéries qui sont pathogènes des animaux sont, très exceptionnellement, transmissibles à l'homme, comme *Brucella* (brucellose), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (rouget), *Mycobacterium bovis* (tuberculose bovine), *Bacillus anthracis*(charbon) et *Pasteurella tularensis*(tularémie) [44].

- **Contamination lors des opérations de préparation à l'abattoir**

Cette contamination est essentiellement due à la bactériémie d'abattage qui est largement influencée par la fatigue et le stress observés durant le transport. Les cuirs sont également une importante source de contamination microbienne des carcasses. L'éviscération doit être précoce pour empêcher les germes de traverser la paroi intestinale [45].

Un tiers des carcasses est pollué par *Escherichia coli* provenant de l'intestin. Une partie non négligeable des germes peut provenir de l'eau utilisée pour le travail des carcasses [39].

- **Contamination au cours du stockage et de la commercialisation**

Toute variation dans les conditions de stockage et de commercialisation va entraîner la prolifération des microorganismes contaminants. Lors de la commercialisation, des contaminations par l'air, les surfaces, les vendeurs et le personnel de service sont encore possibles [46].

- **Contamination au cours du transport**

Le transport constitue une source éventuelle de variation dans les températures et dans l'humidité relative [47], ce qui peut influencer le développement des microorganismes [46].

- **Contamination lors de la découpe**

Les erreurs graves d'hygiène dans les conditions de travail telles que la température trop élevée dans les salles de découpe, le nettoyage insuffisant du matériel et des tenues vestimentaires des travailleurs favorisent la prolifération des bactéries [43]. Ainsi, le bois est à proscrire dans les ateliers de découpe, car il sert de réservoir aux bactéries [39].



Chapitre 02

Matériel et méthodes



I. Matériel

1. Appareillages

- ✓ Autoclave 120°C.
- ✓ Balance électrique de précision.
- ✓ Etuve à 37°C.
- ✓ Microscope optique.
- ✓ Plaque chauffante.
- ✓ Réfrigérateur (-20°C à 5°C).

2. Verrerie

- ✓ Bêchers (1000 ml, 500 ml).
- ✓ Flacons stériles 250 ml.
- ✓ Lames.
- ✓ Pipettes graduées 10ml.
- ✓ Pipettes Pasteur.
- ✓ Tubes à essai.

3. Outils

- ✓ Mortier.
- ✓ Spatules.
- ✓ Anse de platine.
- ✓ Bec Bunsen.
- ✓ Boîtes de Pétri.
- ✓ Ecouvillons.
- ✓ Pince.
- ✓ Portoirs.
- ✓ Micropipette 1000µl.
- ✓ Micropipette 200µl.

4. Réactifs et autres substances

- ✓ Colorants de Gram (Violet de Gentiane, Lugol, Fuschine).

- ✓ Ethanol 95%.
- ✓ Disques d'antibiotiques.
- ✓ Eau distillée stérile.
- ✓ Eau physiologique stérile.
- ✓ Huile à immersion.
- ✓ Huile de vaseline stérile.
- ✓ Réactif de Kovacs.
- ✓ Réactif TDA.
- ✓ Réactifs VP1 et VP2.
- ✓ Réactifs nitrate réductase I et II.
- ✓ Poudre de zinc.

5. Milieux de culture

- ✓ Tryptone-sel
- ✓ Gélose Désoxycholate Citrate Lactose Sucrose (DCLS).
- ✓ Gélose Mac Conkey (MC).
- ✓ Gélose Violet Red Bile Glucose agar (VRBG).
- ✓ Gélose nutritive (GN).
- ✓ Gélose *Salmonella - Shigella*(SS).
- ✓ Galerie biochimique miniaturisée API 20 E.
- ✓ Gélose Mueller-Hinton (MH).

II. Méthodes

1. Prélèvement

Notre étude s'est déroulée durant une période de 04 mois : de février à mai 2016. Elle porte sur des viandes rouges prélevées, à partir de différentes boucheries de la wilaya de Tébessa.

Un échantillon de 100 g de la viande rouge, a été prélevé, aseptiquement, dans un sac plastique, stérile, ligaturé, puis transporté au laboratoire de microbiologie, dans un délai ne dépassant pas 2 heures. Ainsi, 6 échantillons ont été prélevés, à partir de différentes boucheries, selon le (**tableau 02**).

Tableau 02 : Prélèvements réalisés au cours de l'étude.

N° de l'échantillon	Date de prélèvement	Site de prélèvement
01	07-02-2016	Le grand marché
02	14 -02-2016	La route d'Annaba
03	21-02-2016	La route de Constantine
04	28-02-2016	Wiame
05	07-03-2016	Cité thévest
06	08-03-2016	Le grand marché

2. Préparation de la suspension mère

- Peser aseptiquement 25 g de viande et les transférer dans un mortier stérile.
- Broyer la viande, en ajoutant progressivement 225ml de bouillon tryptone-sel, jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.
- Laisser le broyat reposer pendant 15 à 45 minutes à température ambiante.

3. Préparation des dilutions

- Répartir stérilement le diluant (tryptone- sel) dans 3 tubes à essai stériles, à raison de 9 ml par tube.
- A partir de la suspension mère (10^{-1}), et à l'aide d'une micropipette, transférer 1 ml dans le tube N°1, puis homogénéiser pour avoir la dilution 10^{-2} .
- A partir de la dilution 10^{-2} , transférer 1 ml dans le tube N°2, pour avoir la dilution 10^{-3} .
- A partir de la dilution 10^{-3} , transférer 1 ml dans le tube N°3, pour avoir la dilution 10^{-4} .

4. Recherche des entérobactéries totales

Prélever à l'aide d'une micropipette (20-200 µl) 0,1 ml de la suspension mère et de ses dilutions et les déposer à la surface des deux milieux de culture (MC et VRBG), à raison d'une boîte par dilution et par gélose.

- Etaler à l'aide de pipettes Pasteur repliées en râteaux.
- Laisser reposer sur paillasse pendant 20 minutes (couvercle en haut);
- Incuber pendant 24 à 48 h à 37 °C, jusqu'à l'apparition des colonies macroscopiques.

5. Recherche de *Salmonella* et *Shigella*

5.1. Pré-enrichissement

- Incuber la suspension mère dans un flacon stérile pendant 16 à 24h à 37°C.

5.2. Enrichissement

- 1 à 2 ml de bouillon du pré-enrichissement sont inoculés dans 10 ml du bouillon SFB.
- Incuber le bouillon SFB pendant 24 à 48 à 37 °C.

5.3. Isolement

- A l'aide d'une pipette Pasteur prélever à partir du bouillon SFB et faire des stries à la surface des milieux DCLS et SS à raison de 3 boîtes pour chaque milieu.
- Incuber pendant 24 à 48 h à 37 °C, jusqu'à l'apparition des colonies.

6. Examen macroscopique et microscopique

-Après incubation, repérer les colonies suspectes sur les différents milieux :

- ❖ **VRBG** : colonies rouges (glucose +) suspectes d'être des entérobactéries.
 - ❖ **MC** : colonies rouges (lactoses +) et colonies incolores (lactose -).
 - ❖ **DCLS**: colonies jaunes ou incolores (lactose -) avec ou sans centre noir, suspectes d'être *Salmonella* ou *Shigella*.
 - ❖ **SS**: colonies incolores avec ou sans centre noire, suspectes d'être *Salmonella* ou *Shigella*.
- Faire une coloration de Gram pour toute colonie suspecte.

- Retenir seulement les colonies ayant donné des bacilles à Gram négatif (BGN).

7. Purification

- Repiquer chaque type de colonies sur le même milieu d'isolement, en faisant des stries éloignées par l'anse de platine ou par une pipette Pasteur.
- Incuber pendant 24 à 48 h à 37 °C.
- Après incubation, vérifier si les colonies présentent le même aspect macroscopique et microscopique que celui présenté dans le premier isolement.
- Poursuivre le repiquage si nécessaire, jusqu'à l'obtention d'un isolat pur présentant les mêmes caractéristiques que celui obtenu en premier isolement.

8. Conservation des isolats

- A partir de chaque isolat pur, repiquer en stries, sur la pente d'une gélose nutritive (GN) inclinée en tube.
- Après incubation à 37°C pendant 24 h, conserver les cultures au réfrigérateur à -4°C.

9. Identification biochimique

L'identification biochimique est réalisée par la galerie API 20 E.

a) Principe et description de la galerie API 20^E

L'API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés (**figure 05**). Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne 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 [48].



Figure 05: Galerie API20E.

b) Mode opératoire

➤ **Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ **Préparation de l'inoculum**

Préparer une suspension bactérienne dense dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 h, faite sur GN.

➤ **Ensemencement de la galerie**

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air.
- Pour les caractères soulignés : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, ensemercer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.
- Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension.
- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.

c) Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (tableau 03).

- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- **Test TDA** : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- **Test IND** : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- **Test VP** : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.
- **Test Glu** : Ajouter une goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2-5 minutes, une coloration rouge indique une réaction positive (NO_2). Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote : ajouter 2-3 mg de poudre de zinc dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté jaune indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats. Si la cupule devient orange-rouge, la réaction est négative, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zn.

Remarque : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois :

- Réincuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

Tableau 03 : Lecture de la galerie miniaturisée Api 20E [49].

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-Galactosidase	Beta- galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	L-tryptophane	Production d'indole	James/ 2 mn	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2/ 10mn	
			Incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	D-mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
Nitrate réductase Tube GLU	Potassium nitrate	Production de NO ₂	NIT1 + NIT2 / 2-3 mn	
			Jaune	Rouge
		Réduction au stade N ₂	Zinc / 5mn	
			Rouge/orangé	Jaune

ONPG : orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside ; **ADH** : arginine dihydrolase ; **VP** Réaction de Voges-Proskauer ; **LDC** : lysine décarboxylase ; **ODC** : ornithine décarboxylase ; **CIT** : Utilisation du citrate ; **H2S** : recherche d'une thiosulfate réductase ; **URE** : Hydrolyse de l'urée (uréase) ; **TDA** : recherche d'une Tryptophane désaminase ; **IND** : production d'indole ; **GEL** : Gélatinase ; **GLU** : glucose ; **MAN** : mannitol ; **INO** : inositol ; **SOR** : D-sorbitol ; **RHA** : rhamnose ; **SAC** : D-saccharose ; **MEL** : melibiose ; **AMY** : amygdaline ; **ARA** : arabinose.

d) Interprétation des résultats

L'identification a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'identification (feuille Excel pour l'identification microbienne).

10. Test de l'antibiogramme

Il a été réalisé selon la méthode diffusion en milieu gélosé, méthode des disques (Antibiogramme standard).

a) Définition

L'antibiogramme est l'examen biologique destiné à mesurer l'interaction entre chacune des molécules antibactériennes utilisables et une souche bactérienne. Le résultat contribue à évaluer la sensibilité de la souche bactérienne examinée ou sa résistance, ce qui signifie que la molécule sera probablement active au sens thérapeutique où le traitement sera un échec : résistant, sensible, intermédiaire [50].

b) Principe

La méthode des disques consiste à déposer à la surface de la gélose Mueller-Hinton préalablementensemencée avec une suspension bactérienne, des disques pré imprégnés d'une dose connue des différents antibiotiques. Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose à partir du disque et y détermine des concentrations inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne. La multiplication des bactéries s'arrête là où existe dans la gélose, une concentration d'antibiotique égale à la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche en seront déduits [51].

c) Choix des antibiotiques

Le choix des antibiotiques utilisés dans cette étude a été fait selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie [52]. La liste des antibiotiques testés est présentée dans le (tableau 04).

Tableau 04 : Liste des antibiotiques testés.

Famille	Antibiotique	Sigle	Charge Du disque	Diamètres critiques	
				R (d)	I S (D)
β-Lactamines	Aminopénicilline	Amoxicilline	AMX	25 µg	<14 ≥14
	Carboxypénicilline	Ticarcilline	TIC	75 µg	<23 ≥23
	Carbapénème	Imipénème	IPM	10 µg	<16 ≥22
	Clavams	Amoxicilline+Acideclavulanique	AMC	20+10 µg	<17 ≥17
	Monobactame	Aztréonam	ATM/AO	30 µg	<21 ≥24
	C2G	Céfoxitine	FOX	30 µg	<19 ≥19
	C3G	Céfotaxime	CTX/CE	30 µg	<17 ≥20
Ceftazidime		CAZ	30 µg	<19 ≥22	
Aminosides	Amikacine	AK	30 µg	<13 ≥16	
	Gentamicine	GN	15µg/10UI	<14 ≥17	
Quinolones	Quinolones 1 ^{ère} G	Acide nalidixique	NA	30 µg	<14 ≥19
	Quinolones 2 ^{ème} G	Ofloxacin	OFX	5 µg	<19 ≥22
		Péfloxacin	PEF	5 µg	<16 ≥22
Fosfomycines	Fosfomycine	FOS	50 µg	<14 ≥14	
Furanes	Nitrofuranes	F	300 µg	<15 ≥15	
Phénicolés	Chloramphénicol	C	30 µg	<17 ≥17	
Triméthoprime-sulfamides	Triméthoprime-sulfaméthoxazole	SXT	25 µg	<13 ≥16	
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30 UI	<17 ≥19	

C2G : céphalosporines deuxième génération.

C3G : céphalosporines troisième génération.

d) Technique**➤ Préparation de l'inoculum**

- Préparer une suspension bactérienne : à partir d'une culture jeune de 18 heures sur GN, prélever au moins 03 colonies et émulsionner dans 05 ml d'eau physiologique stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne [53].

➤ Ensemencement

L'ensemencement se fait par la méthode d'écouvillonnage :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et laisser s'imbiber.
- Le sortir du tube en l'essorant doucement sur la paroi.
- Ensemencer la boîte de Mueller-Hinton dont l'épaisseur de la gélose est de 4mm, en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60°C afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 minutes [53].

➤ Application des disques et incubation

Appliquer les disques à l'aide d'une pince préalablement flambée, en appuyant légèrement. Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres. Les disques d'antibiotiques sont répartis sur trois boîtes de Pétri selon la (**figure 06**). Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas [53].

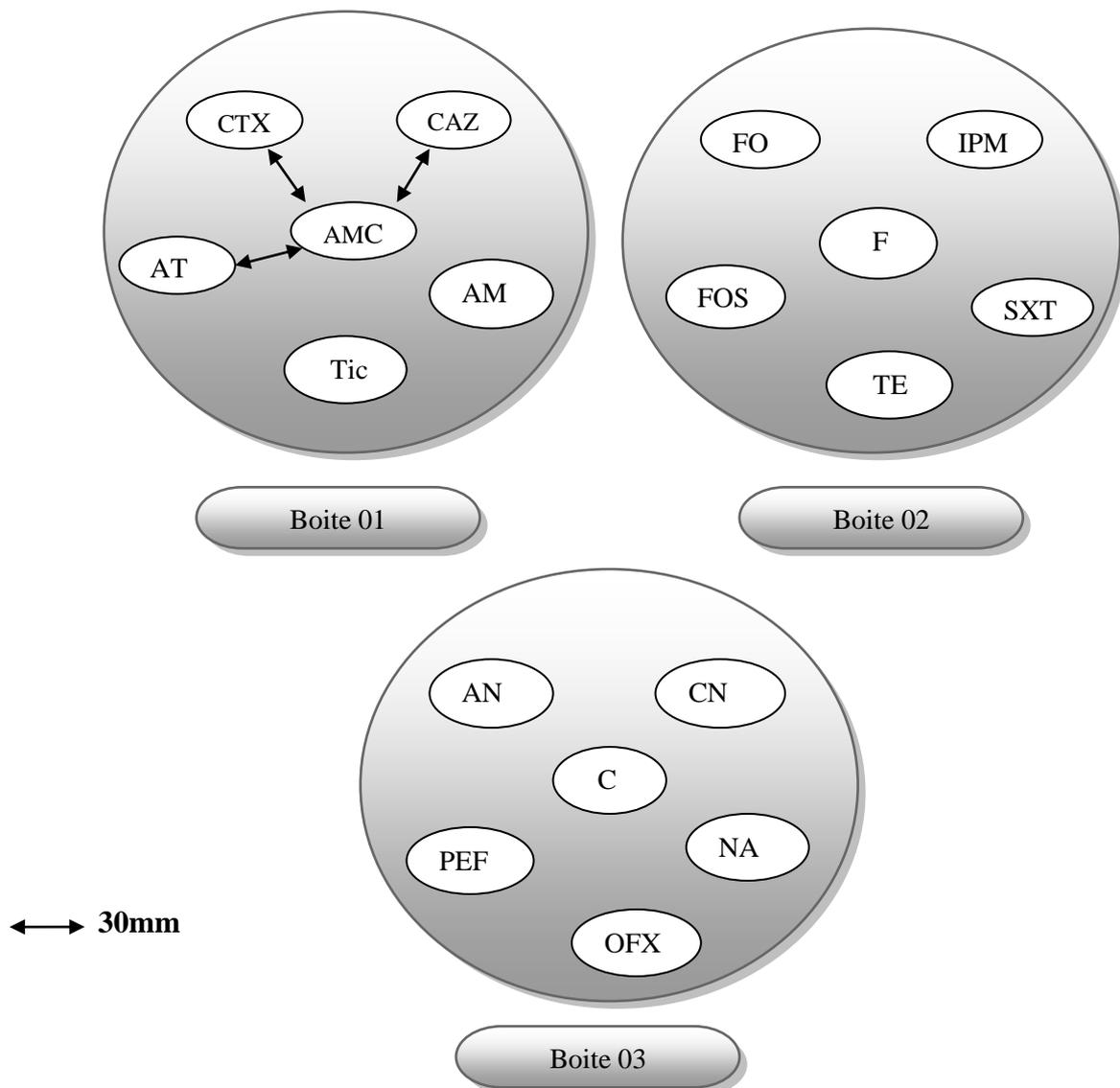


Figure 06 : Schéma explicatif de la disposition des disques d'antibiotiques.

e) Lecture et interprétation

Pour chaque antibiotique: mesurer le diamètre de la zone d'inhibition au revers de la gélose. L'interprétation des souches (sensibles, intermédiaires ou résistantes) se fait selon les diamètres critiques recommandés [52]. Présentés dans le tableau 04. Chaque disque a une concentration minimale inhibitrice, caractérisée par un diamètre d'inhibition, la comparaison des diamètres mesurés autour des disques déposés et ceux recommandés permettra de détecter le phénotype sensible, intermédiaire, et résistant :

- Si le diamètre de la zone d'inhibition est $\geq D$: la souche est dite sensible (S).
- Si le diamètre de la zone d'inhibition est $< d$: la souche est dite résistante (R).
- Si $d \leq$ diamètre de la zone d'inhibition $< D$: la souche est dite intermédiaire (I) [53].

11. Recherche d'une BLSE

La détection de BLSE est réalisée selon deux tests : le test de synergie et le test de double disque.

11.1. Le test de synergie

a) Principe:

Il consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, ceftazidime et céfepime) et l'aztréonam, cette image est dite en "bouchon de champagne" [54].

b) Technique

Un inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h. La gélose Muller-Hinton est ensemencée par la méthode d'écouvillonnage. Un disque d'amoxicilline/acide clavulanique est placé au centre de la boîte de Pétri distant de 3 cm de disques de cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) et aztréonam (AO) (**figure 06 : boîte 01**). Les boîtes sont incubées pendant 18 h à 37°C [55].

c) Lecture

La production de BLSE peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie en « Bouchon de champagne » entre le disque AMC et CTX/ CAZ/ ATM (**figure 07**).

En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques C3G ou de monobactam. On recherchera donc une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes : CTX = 27 mm, CAZ = 22 mm et ATM = 27 mm. Dans ce cas, il faut pratiquer un test de confirmation de production de BLSE [55].

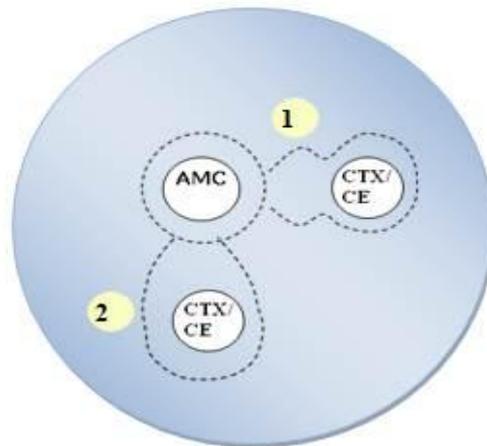


Figure 07 : Description de l'image de synergie.

1 : synergie en entonnoir

2 : synergie en bouchon de champagne.

11.2. Test de double disque

a) Principe

Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton [54].

b) Technique

- Préparer une suspension à partir d'une culture de 18 ou 24 h.
- Ensemencer la gélose Mueller-Hinton selon la technique de l'antibiogramme.
- Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX) à une distance de 25mm (centre à centre).

- Laisser diffuser les antibiotiques à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps.
- Après une heure d'incubation sur la paillasse, ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de C3G (**figure 08**).
- Incuber pendant 18 heures à 37°C [55].

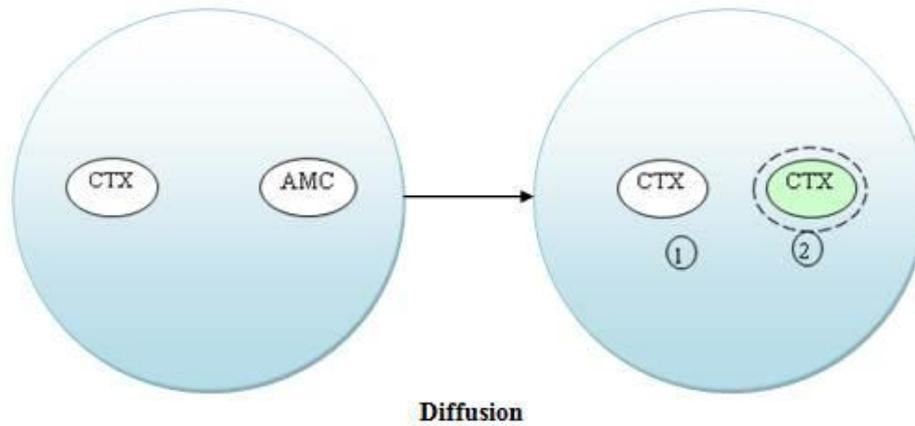


Figure 08 : Schéma explicatif du test du double disque.

c) Lecture

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliqué après diffusion du disque AMC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de C3G, ce qui indique une production d'une BLSE [55].



Chapitre 03

Résultats et discussion



1. Examen macroscopique

Les isolats obtenus ont donné plusieurs aspects sur les milieux. Quelques exemples sont présentés dans la (figure 09).

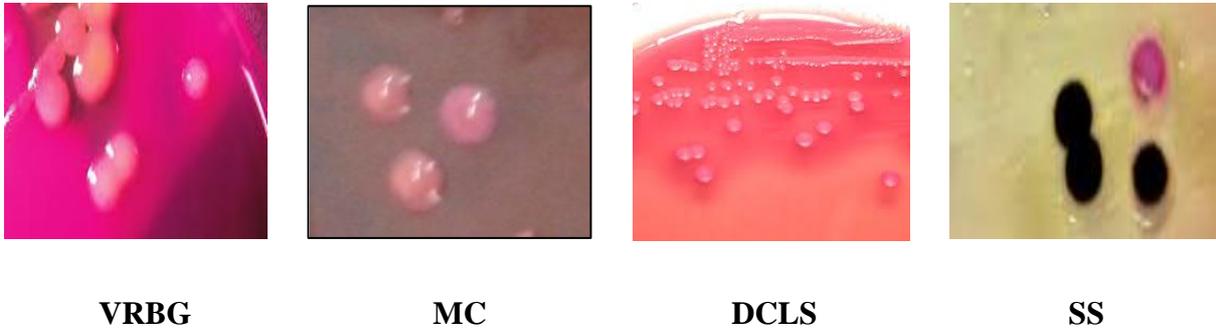


Figure 09 : Quelques aspects macroscopiques sur les différents milieux utilisés.

2. Examen microscopique

Après coloration de Gram, l'observation microscopique montre des bacilles à Gram négatif (BGN) droits, courts, moyens ou longs, épais ou fins, isolés ou regroupés en paires, ou en chaînettes de longueur variable, ou bien des coccobacilles isolés ou regroupés en paires. Au total, 65 isolats de BGN ont été obtenus.

3. Identification biochimique

En raison du temps limité, seulement 40 isolats, parmi 65 ont été soumis à l'identification.

Les résultats des différents tests réalisés sur l'API20E sont présentés dans le (Tableau 05).

Tableau 05 : Résultats des tests d'identification biochimique réalisée par l'API 20 E.

Test \ Isolant	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Espèce	Code
01	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Hafnia alvei</i> 1	Ha 1
02	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i> 1	S.o 1
03	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i> 1	S.o 2
04	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Hafnia alvei</i> 1	Ha 2
05	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i> 1	S.o 3
06	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i> 1	S.o 4
07	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	<i>Enterbacter gergoviae</i>	E.g 1
08	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i> 1	S.o 5
09	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 1
10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 2
11	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i> 1	S.o 6
12	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i> 1	S.o 7
13	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Hafnia alvei</i> 1	Ha 3
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 3
15	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterbacter sakazakii</i>	E.s 1
16	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i> 1	S.o 8

Tableau 05 (suite).

Test / Isolat	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Espèce	Code
17	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 4
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 5
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 6
20	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	<i>Proteus vulgaris</i>	P.v
21	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera 1</i>	S.o 9
22	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>Enterbacter gergoviae</i>	E.g 2
23	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 7
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera 1</i>	S.o 10
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Enterbacter sakazakii</i>	E.s 2
26	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 8
27	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 9
28	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>	K.o x
29	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera 1</i>	S.o 11
30	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella terrigena</i>	K.t

Tableau 05 (suite).

Test Isolats	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Espèce	Code	
31	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 10
32	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera 1</i>	S.o 12
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 11
34	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera 1</i>	S.o 13
35	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera 1</i>	S.o 14
36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterbacter cloacae</i>	E.c
37	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter koseri/farner</i>	C.k
38	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 12
39	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K.o 13
40	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterbacter sakazakii</i>	E.s 3

Quelques exemples d'API20E, correspondant à différentes espèces, sont présentés dans les figures 10 à 19.



Figure 10 : Photographie de l'Api 20^E de la souche 11 (*Serratia odorifera*).



Figure 11 : Photographie de l'Api 20^E de la souche 17 (*Klebsiella ornithinolytica*).



Figure 12 : Photographie de l'Api 20^E de la souche 28 (*Klebsiella oxytoca*).



Figure 13 : Photographie de l'Api 20^E de la souche 30 (*Klebsiella terrigena*).



Figure 14 : Photographie de l'Api 20^E de la souche 36 (*Enterobacter cloacae*).



Figure 15 : Photographie de l'Api 20^E de la souche 40 (*Enterobacter sakazakii*).



Figure 16 : Photographie de l'Api 20^E de la souche 22 (*Enterobacter gergoviae*).



Figure 17 : Photographie de l'Api 20^E de la souche 20 (*Proteus vulgaris*).



Figure 18 : Photographie de l'Api 20^E de la souche 37 (*Citrobacter koseri/farmeri*).



Figure 19 : Photographie de l'Api 20^E de la souche 01 (*Hafnia alvei 1*).

3.1. Répartition des souches isolées selon les genres

La répartition des souches identifiées en fonction des genres est présentée dans le tableau 06 et la figure 20.

Tableau 06: Effectif et pourcentage des souches selon les genres.

Genre	Effectif	Pourcentage
<i>Klebsiella</i>	15	37,5%
<i>Serratia</i>	14	35%
<i>Enterobacter</i>	06	15%
<i>Hafnia</i>	03	7,5%
<i>Citrobacter</i>	01	2,5%
<i>Proteus</i>	01	2,5%
TOTAL	40	100%

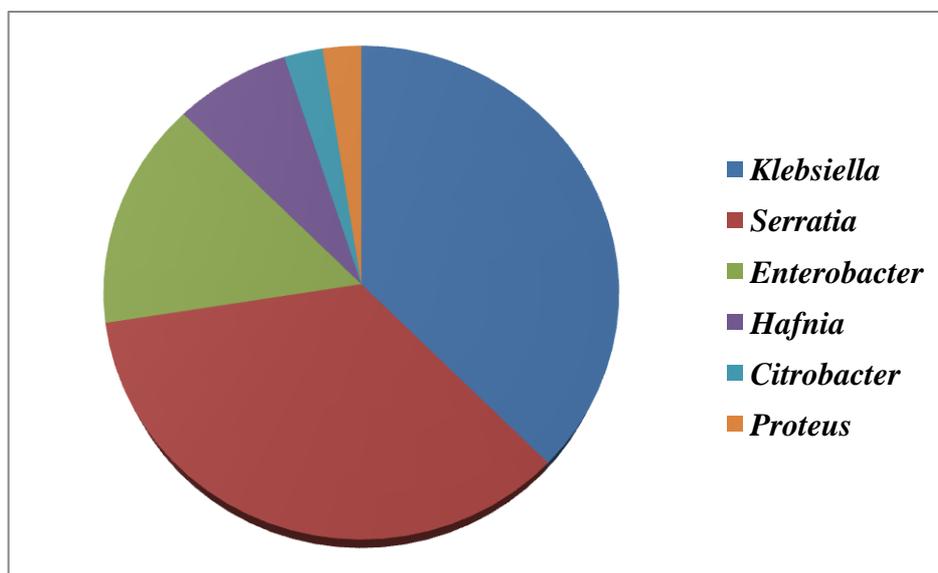


Figure 20 : Répartition des souches en fonction des genres.

D'après les illustrations ci-dessus, on y observe une prédominance du genre *Klebsiella* (37,5%), suivi par le genre *Serratia* (35%). *Enterobacter* occupe la troisième position avec une fréquence de 15 %, tandis que les genres *Hafnia*, *Proteus* et *Citrobacter* ont présenté les pourcentages les plus faibles. Donc la plupart des souches isolées dans notre travail (95%) appartiennent au groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Hafnia* (KESH).

Généralement, les bactéries de ce groupe sont peu dangereuses, toutefois certaines espèces (*Hafnia* sp, *E. cloacae*,) sont susceptibles d'entraîner des intoxications (diarrhée, vomissements, douleurs abdominales, céphalées) en cas de développement abondant dans un aliment [56].

Quant aux *Proteus*, il s'agit de bactéries saprophytes très répandues dans le sol et dans les eaux; elles ne sont pas très fréquentes dans l'intestin. Les *Proteus* ne sont pas généralement entéropathogènes, cependant certaines souches peuvent être responsables de troubles gastro-intestinaux. Ces cas (rares) sont dus à *P. vulgaris* et autres espèces, à partir de produits animaux ayant subi une contamination fécale [56].

Concernant *Citrobacter*, entérobactérie commensale de l'intestin, il s'agit d'un contaminant très courant, qui n'est qu'exceptionnellement entérotoxique [56].

3.2. Répartition des souches selon les espèces

La répartition des souches identifiées en fonction des genres est présentée dans le tableau 07 et la figure 21.

Tableau 07 : Effectif et pourcentage des souches selon les espèces.

Espèce bactérienne	Effectif	Pourcentage
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	13	32,5%
<i>Klebsiella terrigena</i>	01	2,5%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	01	2,5%
<i>Serratia odorifera</i>	14	35%
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	2,5%
<i>Enterobacter sakazakii</i>	03	7,5%
<i>Enterobacter gergoviae</i>	02	5%
<i>Hafnia alevi 1</i>	03	7,5%
<i>Citrobacter koseri/farmeri</i>	01	2,5%
<i>Proteus vulgaris</i>	01	2,5%
TOTAL	40	100%

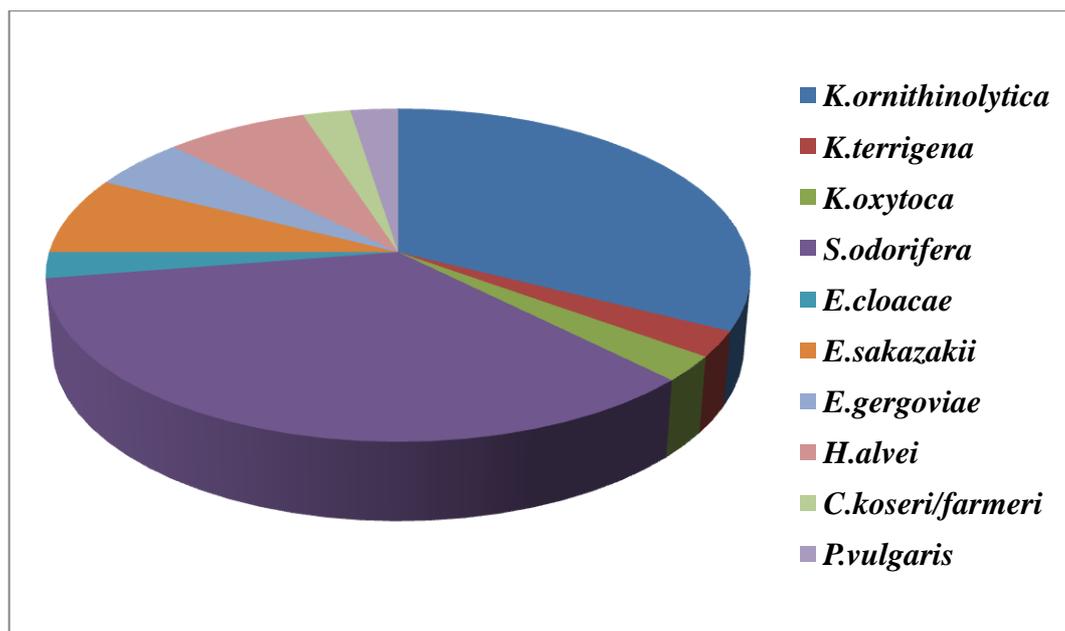


Figure 21 : Répartition des souches en fonction des espèces.

Les résultats montrent que l'espèce prédominante est *Serratia odorifera* (35%), suivie par *Klebsiella ornithinolytica* (32,5%). Les autres espèces ont présenté des fréquences plus faibles : *H.alvei* et *E.sakazakii* (7,5% chacune), *E.gergoviae* (5%), *K.terrigena*, *K. oxytoca*, *E.cloacae*, *C.koseri*, et *P.vulgaris* ont présenté 2,5% pour chacune.

Dans une étude faite sur des produits d'origine animale [57], *K.oxytoca* a été prédominante avec une fréquence de 53,3% des souches isolées à partir d'une viande hachée de veau; ce résultat est supérieur à celui trouvé dans notre travail (seulement 2,5%).

D'après nos résultats, on remarque l'absence totale des entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *E. coli* et *Shigella*. Cette absence pourrait être expliquée par le respect des règles d'hygiène au cours des différentes étapes de préparation de la viande : dès le recueil des animaux jusqu'à la présentation de la viande chez le détaillant ; en passant par l'abattage et l'éviscération en particulier, puisque la contamination de la viande par ces entérobactéries a principalement pour origine le tube digestif de l'animal.

4. Test de sensibilité aux antibiotiques

Les profils de sensibilité aux ATB des souches testées sont présentés dans le

(Tableau 08).

Tableau 08 : Résultats du test de la sensibilité aux antibiotiques.

Espèces	ATB	AML	AMC	TIC	ATM	FOX	CTX	CAZ	IPM	AN	GN	NA	OFX	PEF	FOS	C	F	TE	SXT	
	Code																			
<i>Serratia odorifera</i>	So 1	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	/	S	R	S	S	
	So 2	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	
	So 3	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	
	So 4	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	
	So 5	R	R	S	R	S	S	S	I	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	
	So 6	R	R	R	R	S	S	S	I	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R
	So 7	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	
	So 8	R	R	R	R	R	S	S	I	S	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R
	So 9	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R
	So 10	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	I	S	I	S	R	S	S	R	R
	So 11	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	So 12	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R	I	R	R	R	S	R	R
	So 13	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	R	R	R
	So 14	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	I	S	S	S	R	S	S	R	R

Tableau 08 (suite).

Espèces	ATB	AML	AMC	TIC	ATM	FOX	CTX	CAZ	IPM	AN	GN	NA	OFX	PEF	FOS	C	F	TE	SXT	
	Code																			
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	K01	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	
	K02	R	S	R	S	S	S	S	I	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	
	K03	S	S	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	
	K04	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	I	S	/	S	S	S	S	
	K05	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	
	K06	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R
	K07	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	K08	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	I	I	R	R	S	S	R	R
	K09	S	S	R	R	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	I	I
	K010	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
	K011	S	R	R	R	R	S	R	R	R	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S
	K012	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	I	R	R	R	S	S	S	S
	K013	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	I	R	S	S	R	R
<i>Klebsiella oxyloca</i>	K0x	R	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	
<i>Klebsiella terrigena</i>	Kt	S	S	R	R	S	R	R	I	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	

Tableau 08 (suite).

Espèces	ATB		AML	AMC	TIC	ATM	FOX	CTX	CAZ	IPM	AN	GN	NA	OFX	PEF	FOS	C	F	TE	SXT
	Code																			
<i>Citrobacter koseri/farmer</i>	Ck	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
	Ha 1	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	/	S	S	S	S
	Ha 2	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
	Ha 3	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R	R	/	S	S	R	R
<i>Hafnia alvei</i>	Es 1	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	/	S	S	S	S
	Es 2	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
	Es 3	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	I	R	R	S	S	S	S
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Eg 1	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R
	Eg 2	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	I	S	I	R	R	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	Ec	S	S	R	R	R	S	R	R	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
	Pv	S	S	R	R	R	S	R	R	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S

Serratia odorifera : les souches de *Serratia odorifera* montrent des profils hétérogènes, mais la plupart sont résistantes aux antibiotiques : TE et SXT. Les souches So 6, So3, So 4, So 5, So 8 expriment toutes une résistance vis-à-vis des antibiotiques : GN, NA, OFX et PEF. Toutes les souches de *S. odorifera* sont multi résistantes à au moins un antibiotique parmi trois familles, sauf les souches So 12 et So 1. Il y a des souches qui sont résistants à 5, 7, 8, 9 ou 10 antibiotiques parmi 18 ATB testés. A titre d'exemple, So 32 est résistante à 10 ATB.

Klebsiella ornithinolytica : les souches montrent des profils très différents. 7 souches parmi 13 sont multi résistantes.

Quant aux souches de *K.oxytoca*, *K.terrigena*, *Citrobacter koseri* et *Hafnia alvei*, elles sont généralement sensibles sauf la souche Ha 3 est multi résistante (résiste à 9 ATB).

Parmi les 3 souches d'*E.sakazakii*, la souche Es 6 est multirésistante, tandis que toutes les souches des espèces *E.gergoviae* et *E. cloacae* sont multirésistantes. Concernant la de *Proteus vulgaris*, elle montre une sensibilité à la plupart des ATB testés.

Les 40 souches isolées sont réparties dans les trois catégories : résistante, sensible et intermédiaire selon le (tableau 09) et illustrée dans la figure 22.

Tableau 09: Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées.

Antibiotique	Sigle	N ^{bre} des souches (Pourcentage)		
		Résistante R	Intermédiaire I	Sensible S
Amoxicilline	AML	21 (52,5%)	00 (00%)	19 (47,5%)
Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	19 (47,5%)	00 (00%)	21 (52,5%)
Ticarcilline	Tic	37 (92,5%)	00 (00%)	03 (7,5%)
Aztréonam	ATM	21 (52,5%)	00 (00%)	19 (47,5%)
Céfoxitine	FOX	15 (37,5%)	00 (00%)	25 (62,5%)
Cefotaxime	CTX/ CE	18 (45%)	01 (2,5%)	21 (52,5%)
Céftazidime	CAZ	17 (42,5%)	02 (05%)	21 (52,5%)
Imipénème	IPM	12 (30%)	12 (30%)	16 (40%)
Amikacine	AN	02 (05%)	02 (05%)	36 (90%)
Gentamicine	GN	10 (25%)	04(10%)	26 (65%)
Acide nalidixique	NA	13 (32,5%)	02 (05%)	25 (62,5%)
Ofloxacin	OFX	16 (40%)	06 (15%)	18 (45%)
Péfloxacin	PEF	15 (37,5%)	05 (12,5%)	20 (50%)
Fosfomycine	FOS	22 (62,85%)	00 (00%)	13 (37,15%)
Chloramphénicol	C	01 (2,5%)	00 (00%)	39 (97,5%)
Furanes	F	02 (05%)	00 (00%)	38 (95%)
Tétracycline	TE	19 (47,5%)	01 (2,5%)	20 (50%)
Triméthoprime-Sulfaméthoxazole	SXT	19 (47,5%)	01 (2,5%)	20 (50%)

N.B parmi les 40 souches, seulement 35 souches ont été testées avec le FOS à cause du manque de ces disques.

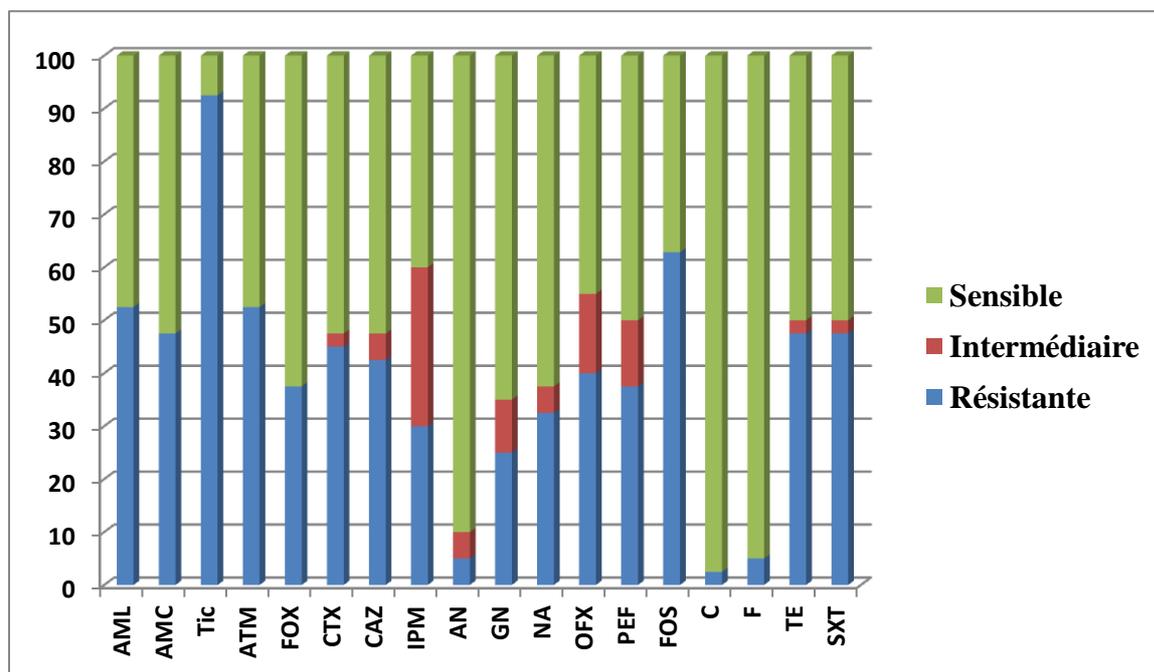


Figure 22 : Histogramme représentatif de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.

Les résultats obtenus nous ont permis de constater que les antibiotiques les plus actifs par ordre décroissant sont : C (97,5%), F (95%), AN (90%), GN (65%), NA et FOX (62,5%).

Les résistances les plus marquées sont observées à l'égard des antibiotiques : Tic (92,5%), FOS (62,85%), ATM et AMC (52,5%), AMC, TE et SXT (47,5%). Cependant, on peut dire que tous les antibiotiques testés sont touchés par la résistance mais à des degrés variables.

Concernant l'efficacité des aminosides, l'amikacine (active sur 90% des souches) s'est montrée plus efficace que la gentamicine (65%).

5. Détection des BLSE

Parmi 40 souches en à effectués les testes de détection seulement pour 38 souches les 2 souches restant n'ont pas présenté les diamètres caractéristiques des souches suspectes d'être productrices les BLSE (voir chapitre matériel et méthodes : test de synergie).

Les résultats des deux tests réalisés sont représentés dans le (tableau 10).

Tableau 10: Résultats des tests de détection de BLSE.

Test	Test de synergie			Test de double disque	
Résultats	Positif	Négatif	±	Positif	Négatif
	03	29	06	23	15

± : synergie faible

On remarque dans nos résultats que le test de synergie a permis la détection de la production de BLSE chez seulement 3 souches (7.5%); alors que le test du double disque l'a confirmé chez 23 souches (57.5%). Ce qui prouve l'importance de réalisation des tests de confirmation ; pour éviter les problèmes de faux négatifs et de faux positifs.

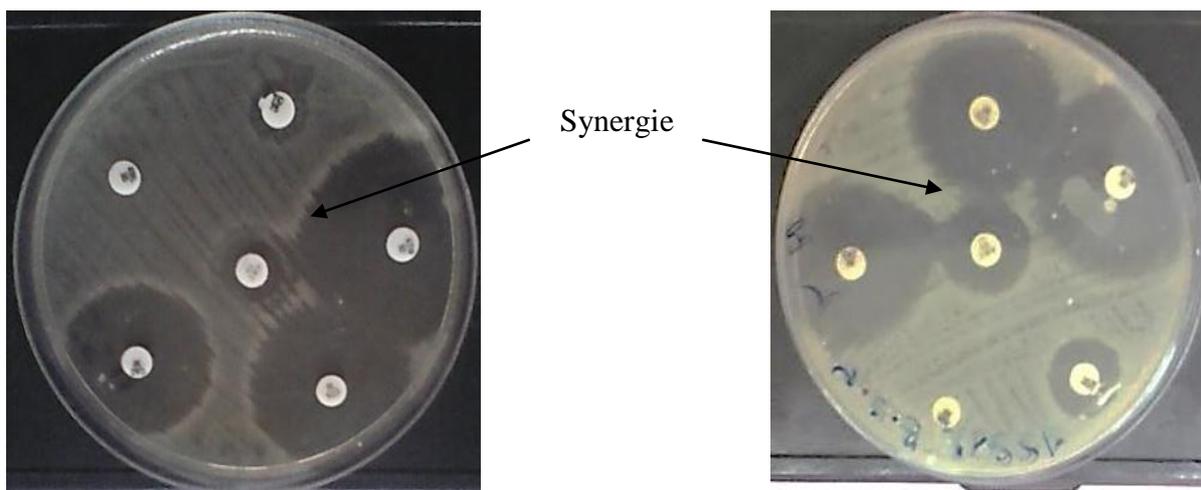


Figure 23 : Photographies du test de synergie positif.

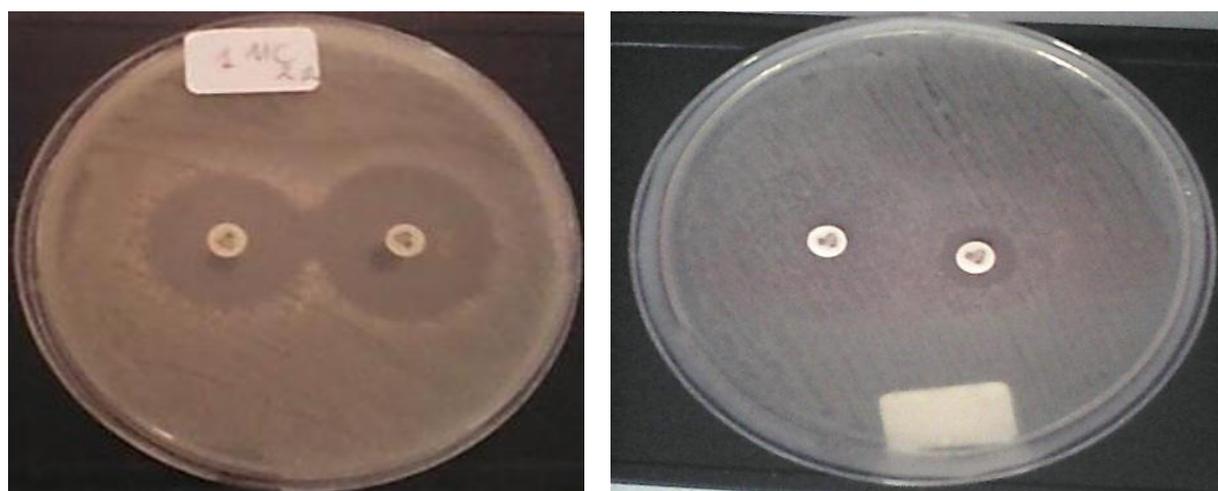


Figure 24 : Photographies du test de double disque positif.

Disque à gauche : CTX.

Disque à droite : CTX remplaçant l'AMC.

6. Fréquence des EBLSE

Les effectifs et les fréquences des différentes espèces EBLSE sont présentés dans le tableau (11) et la figure (25).

Tableau 11 : Effectifs et pourcentages des souches EBLSE en fonction des espèces.

Espèce	Effectif des souches EBLSE	Fréquence (%)
<i>Serratia odorifera</i>	09	39.13
<i>K.ornithinolytica</i>	06	26.09
<i>K.terrigena</i>	01	04.35
<i>Hafnia alvei</i>	02	08.69
<i>E.gergoviae</i>	01	04.35
<i>E.sakazakii</i>	02	08.69
<i>E.cloacae</i>	01	04.35
<i>Proteus vulgaris</i>	01	04.35
Total	23	100

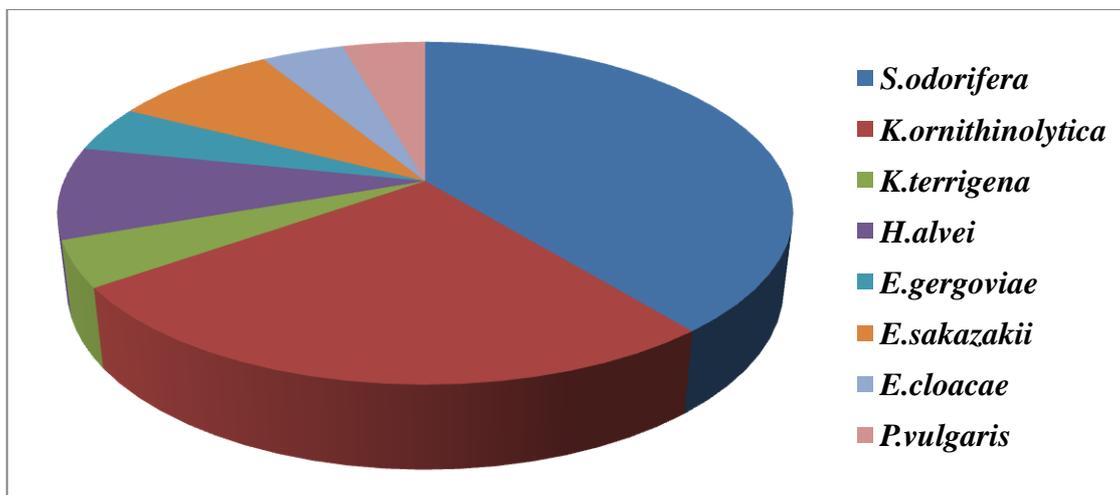


Figure 25: Répartition des souches EBLSE en fonction des espèces.

Au total, nous avons détecté la production des BLSE chez 23 souches d'entérobactéries, ce qui correspond à 57.5%. Ce résultat est proche de celui trouvé par [57] et qui était 50%. De même, notre résultat est très proche de celui rapporté dans une étude similaire [58] où la fréquence était de 59%.

D'après la figure 25, on remarque une prédominance des espèces *Serratia odorifera* et *K.ornithinolytica*. Ce résultat diffère de celui rapporté par [57], où *E.coli* et *K.oxytoca* étaient prédominantes. Dans une autre étude [58], *E.coli* et *Serrtia fonticola* était les plus fréquentes. Cependant certaines espèces EBLSE trouvées dans notre travail (*E.cloacae* et *P.vulgaris*) ont été rapportées par Usoz *et al* [58] comme productrices de BLSE.

7. Sensibilité aux antibiotiques des souches EBLSE

Les résultats de sensibilité des souches EBLSE aux antibiotiques sont présentés dans le (tableau 12).

Tableau 12 : Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des EBLSE.

Antibiotique	Sigle	Nbr de souches (Pourcentage des souches)		
		Résistante R	Intermédiaire I	Sensible S
Amoxicilline	AMX	08 (34.78%)	00 (00%)	15 (65.22%)
Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	12 (52.17%)	00 (00%)	11 (47.83%)
Ticarcilline	TIC	22 (95.65%)	00 (00%)	01 (4.35%)
Aztréonam	ATM	14 (60.87%)	00 (00%)	09 (39.13%)
Céfoxitine	FOX	09 (39.13%)	00 (00%)	14 (60.87%)
Céfotaxime	CTX	12 (52.17%)	01 (4.35%)	10 (43.48%)
Céftazidime	CAZ	12 (52.17%)	02 (8.70%)	09 (39.13%)
Imipénème	IPM	06 (26.09%)	06 (26.09%)	11 (47.82%)
Amikacine	AN	00 (00%)	01 (4.35%)	22 (95.65%)
Gentamicine	GN	04 (17.39%)	02 (8.70%)	17 (73.91%)
Acide naldixique	NA	04 (17.39%)	01 (4.35%)	18 (78.26%)
Ofloxacine	OFX	07 (30.43%)	05 (21.74%)	11 (47.83%)
Pefloxacine	PEF	06 (26.09%)	04 (17.39%)	13 (56.52%)
Fosfomycine	FOS	06 (31.58%)	00 (00%)	13 (68.42%)
Chloramphénicol	C	01 (4.35%)	00 (00%)	22 (95.65%)
Furanes	F	02 (8.70%)	00 (00%)	21 (91.30%)
Tétracycline	TE	08 (34.78%)	01(4.35%)	14 (60.87%)
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	SXT	09 (39.13%)	01 (4.35%)	13 (56.52%)
Total		23 (100%)		

En comparant les résultats obtenus dans notre étude à ceux rapportés dans une étude espagnole [58] on peut constater que nos souches présentent des taux de résistance plus élevés vis-à-vis vis des antibiotiques : CAZ (52.17% contre 27.7% dans l'autre étude), AMC (52.17% contre 43%) et ATM (60,87% contre seulement 36%). Par ailleurs, nos souches présentent des taux de sensibilité moindres concernant les antibiotiques : FOX (60.87% contre 86% dans l'autre étude), FOS (68,42% contre 94.8%) et GN (73.91% contre 94%). Donc, on peut conclure que les souches EBLSE isolées dans notre travail montrent des niveaux de résistance importants.

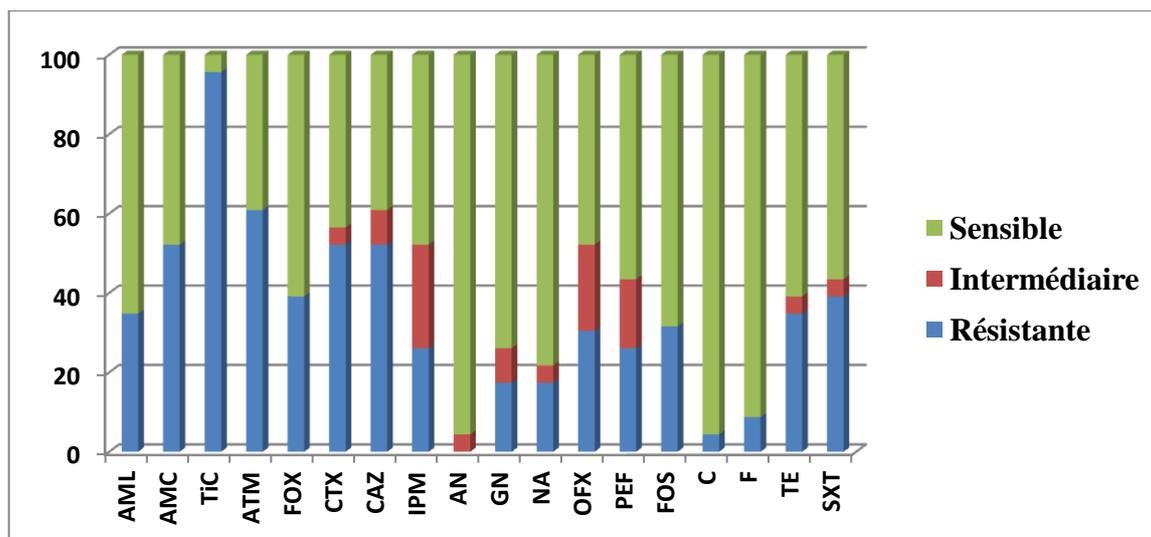


Figure 26: Histogramme représentatif de la sensibilité aux antibiotiques des souches EBLSE.

D'après la figure 26, on remarque que les souches EBLSE ont présenté des taux de résistance variables, vis-à-vis des différents antibiotiques, à l'exception de l'amikacine dont aucune résistance n'a été marquée. Les aminosides restent généralement plus efficaces que les quinolones.

➤ *Serratia odorifera*

Les souches EBLSE sont : So1, So 3, So 4, So 8, So 9, So 10, So 11, So 12, So 13. Toutes ces souches sont résistantes à la ticarcilline. A l'exception des souches So 1 et So 11, la totalité des souches résiste à TE et SXT. Parmi les aminosides et les quinolones testés, l'amikacine reste très active (8/9 souches sont sensibles). Le Chloramphénicol et les furanes restent encore actifs sur la majorité des souches.

➤ *Klebsiella ornithinolytica*

Les souches EBLSE sont : Ko 3, Ko 4, Ko 5, Ko 6, Ko 9, Ko 10. Les antibiotiques : AN, GN, NA, C, F et TE sont actifs à 100% sur ces souches.

➤ *Klebsiella terrigena*

La souche Kt apparaît sensible à la plupart des ATB testés.

➤ *Enterobacter sakazakii*

Deux souches de cette espèce sont productrices de BLSE : *Es1* et *Es 3*. La souche *Es1* est sensible aux antibiotiques autres que les β -lactamines. Par contre la souche *Es3* montre des résistances à l'égard des ATB : AMC, Tic, ATM, CTX, IMP, CAZ, GN, PEF et FOS.

➤ ***Enterobacter gergoviae***

La souche *Eg 2* présente un profil très proche de celui de *Es 3*, sauf qu'elle est intermédiaire vis-à-vis de GN et résistante à AML.

➤ ***Enterobacter cloacae***

La souche *Ec* est sensible dans l'ensemble, mais elle montre une résistance vis-à-vis de FOS et SXT.

➤ ***Hafnia alvei***

Les souches *Ha 1* et *Ha 2*, sont sensibles à la plupart des antibiotiques.

➤ ***Proteus vulgaris***

La souche *Pv* résiste seulement à 5 ATB : Tic, ATM, CTX, CAZ et FOS.



Conclusion



Conclusion

Ce travail a été réalisé pour évaluer la fréquence de contamination de la viande rouge par les entérobactéries productrices des β lactamases à spectre étendue EBLSE ces dernières peuvent causer des problèmes de santé tels que des toxico-infections alimentaires.

Dans cette étude on a identifié 40 souches présentées par des différentes espèces. Les espèces les plus dominantes appartiennent au genre *Klebsiella* représenté principalement par l'espèce *Klebsiella ornitholytica*, aussi le genre *Serratia* et *Hafnia*. Mais on n'a pas isolé des entérobactéries pathogènes.

Les résistances les plus marquées sont observées à l'égard des antibiotiques : Ticarciline 92,5%, Céfoxitine 62,85%, Aztréoname et Amoxiciline 52,5%, Amoxiciline /Acide clavulanique et Tétracycline et Triméthoprime-sulfaméthoxazole 47,5%. Les taux de résistance des quarante souches d'entérobactéries aux β -lactamines sont élevés.

Les résultats des tests de détection des BLSE nous ont permis de cribler 23 souches de EBLSE soit 57,5% parmi les entérobactéries totales, avec une prédominance de l'espèce *S. odorifera* 39,13% et *K.ornitholytica* 26,09%.

En perspectives, nos résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et méritent d'être exploités et complétés par :

- ✓ Identification de type de β -lactamases par des réactions de PCR et séquençage des gènes (méthode moléculaire)
- ✓ Recherche des gènes de résistance aux autres familles d'antibiotiques associés aux β -lactamases,
- ✓ Élargir la période d'étude afin d'avoir des résultats représentatifs et significatifs.

Il n'existe pas d'études randomisées contrôlées pour le traitement des problèmes des entérobactéries productrices BLSE. Les recommandations sont basées sur des revues de littérature de petites séries de cas traités avec différents antibiotiques.



Références bibliographiques



Références bibliographique

1. Gueye O.,2007. Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. [En ligne]; n°36. 2^{ème} édition. Disponible sur : <http://microcsb.net/IMG/pdf/doc-62>.
2. Cartier P, Moevi I., 2007. Le point sur la qualité des carcasses et des viandes de gros bovins. Département Techniques d'Elevage et qualité. Service Qualité des viandes. Compte, 70p.
3. Denis F, H. Monteil *et al.* , 1998. Bactériologie clinique Edition marketing. Paris.144-145p.
4. Avril J, Monteil H *et al.* , 2011. Bactériologie clinique. [En ligne]. 2^{ème} édition. Disponible sur : <http://microcsb.net/IMG/pdf/doc-62.pdf>.
5. Terrier C, Hansen N *et al.*, 1990 Les bacilles à gram négatif non fermentaires autres que Pseudomonas Lyon pharmaceutique, vol 41, 2 : 125-136.
6. Minor L., 1989. Bactériologie médicale. Edition Science, Paris, 333-318 ; 773-823.
7. Joly B. et Reynaud A. ,2002. Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic. Ed DOC et Ed médicales Inter Nationales. Paris. 356P.
8. Croize J., 1999. Evolution de la maturation d'un fromage industriel tunisien à pâte pressée non cuite : Caractéristiques microbiologiques, physico-chimiques et biochimiques. Industrie alimentaire et agricoles. Paris.
9. Carbonnelle B, Denis F *et al.*, 1987. Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. Paris. 121-137p.
10. Jean P ., 1998. Collection Médecine-Sciences. Paris. ISBN 2-257-16399-0.1030 p.
11. Berche P, Gaillard L, *et al.* , 1988. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1^{ère} édition. Médecine-sciences Flammarion .660p.
12. Hoshino M, Kurazono H, *et al.*, 2003 . Genetic and immunological analysis of a novel variant of Shiga toxin 1 from bovine E. coli strains and development of bead-ELISA to detectt the variant toxin. Microbiol Immunol. 47(10):717-25.
13. Saint D., 2002. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des Salmonella spp.27 p.
14. Bruxelles ., 2004. Programme de surveillance pour la réduction de la prévalence de Salmonella. 473-481P.
15. Pierre. , 2002 .Bacteriologies Niveau DCEM1. P122

16. Shigell ., 2001. Shigella. In: Bacterial Pathogenesis : A molecular approach. 2^{ed}. American Society for Microbiology.
17. Lehner A., 2004. Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Food Protection*, 67(12): 2850-2857.
18. Euzéby J., 2010. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. *Int. J. Syst. Bacteriol.*
19. Vaaje-Kolstad G *et al.*, 2010 .An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides . Vol 330 . 219 – 222 P
20. Van R., Givskov M *et al.*, 2007. Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiology Reviews*. 407-424P.
21. Marinella M., 1998. Endogenous endophthalmitis due to *Serratia marcescens*. *Southern Medical Journal* .388p.
22. Pitout D, Laupland B., 2008 .Extended-spectrum betalactamase-producing Enterobacteriaceae : An emerging public-health concern. *Lancet Infect* . 66-159P.
23. Cattoir, V. ,2004. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathol Biol*. 52: 607-616 P.
24. Sougakoff W , Trystram D. ,2003. Résistances aux β -lactamines. Service de Bactériologie-Hygiène -Pitié-Salpêtrière. Faculté de médecine. Université Pierre et Marie Curie. France. 78P.
25. Francois J, Chomar M., 2003 *et al* .De l'antibiogramme à la prescription. Biomerieux, 2^{ème} édition . 8-22P
26. Paterson D, Bonomo R . , 2005. Extended-spectrum beta-lactamases : A clinical update. *Clin Microbiol Rev* . 86 -657 P.
27. Matagne A, Lamotte J, *et al.* ,1998 . Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. 581-598 P.
28. Bush K, Jacoby A *et al.* ,1995. A fonctionnal classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1211- 1233P.
29. Giske *et al.*, 2009. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson . Paris.107-115P.
30. Partridge S *et al.* . ,2005. Analyse cytobactériologique des pus. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Paris. 165-169 P.
31. Bradford P. ,2001. Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization,

epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 933-951P.

32. Poole K . ,2004. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2200-2223P.

33. Philippon A *et al .* , 2006. β -lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Ann Biol Clin*. 37-51P.

34. Coque T, Baquero F *et al .*,2008 .Increasing prevalence of ESBL-producing enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill*;13.

35. Sylvain L.,2011. La boucherie parisienne, un exemple singulier de marché régulé à une époque réputée: Corporations et cartels, *Société suisse d'histoire économique et sociale*, n° 26, Chronos. 213-224P.

36. Jacotot B *et al .*,2003 .Nutrition humaine.paris.83 – 311P.

37. Mykles D, Haire M.,1995 Branched chain- amino- acid- preferring peptidase activity of the lobster multicatalytic proteinases (proteasome) and the degradation of myofibrillar proteins. 285-291P.

38 .Girard J , Valin C ., 1988. Technologie de la viande et des produits carnés. APRIA, INRA, Lavoisier technique et documentation .Paris. 100-280P.

39. Fournaud J., 1982 .Type de germes rencontrés aux différents stades de la filière. In : Hyg. et Tech de la viande fraîche, Paris : éd CNRS 109 – 132P.

40. Villalobos H , Struelens M., 2006. Extended spectrum β -lactamases mediated bacterial resistance: Implications for the intensivist. *Réanimation*. 205-213P.

41. Dennai N., Karrati B *et al .* , 2000 .Bovins à l'abattoir : Une microbiologie fluctuante. *VPC*.191-196P.

42. Heredia N., Garcia S *et al .* , 2001.Microbiological Condition of Ground Meat Retailed in Monterrey, Mexico. 64 (8): 1249-1251.

43. Sylla P., 1994.Contribution à l'étude de la qualité microbiologique et commerciale des merguez vendues sur le marché dakarais. Th: Méd. vét; Dakar ; n°13, 81 P.

44. Ghafir Y., Cornelis M *et al .* , 2002 .Détermination de critères microbiologiques pour le contrôle régulier de la contamination fécale et de l'hygiène générale dans les établissements belges producteurs de viande. 207-208P.

45. Rozier J., Carlier V *et al .* , 1985 .Base microbiologiques de l'hygiène des aliments. Paris : éd Sapaic. 230 P.

46. Mesle F , Zucca J., 1988 . L'origine des microorganismes dans les aliments. Aspects microbiologiques de la sécurité et de la qualité alimentaire. Paris, éd Tec et Doc.9-14P.

- 47.** Lemaire J., 1982. Les opérations de préparation des viandes. In : Hyg. et Tech de la viande fraîche, Paris : éd CNRS. 57-76P.
- 48.** Lagha N. , 2015. Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, Tlemcen, Algeria, 54P.
- 49.** Bio merieux
- 50.** Doi Y., Wachino J. ,2004. Inhibitor sensitive Amp C β -lactamase variant produced by an Escherichia coli clinical isolate resistant to oxyimino cephalosporins and céphamycins. Antimicrob. Agent Chemother. 48: 2652-2658
- 51.** Delarras C. , 1998 .Microbiologie. 90 heures de Travaux pratiques. Gaëtan Morin, France. 276P.
- 52.** CA-SFM. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations., 2014. 114 p.
- 53.** CA-SFM. Antibiogramme en diffusion. Recommandations techniques et Guide d'interprétation. Communiqué. , 1998 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sanofi Diagnostics Pasteur, 12p.
- 54.** Courvalin P. ,2006. Antibiogramme. 2^{ème} édition, ESKA, Paris. 25P.
- 55.** Rahal K. , 2005 .Standardisation de l'antibiogramme en Médecine Humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. 4^{ème} édition. 95p.
- 56.** Guiraud J.P, 2003 Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris. 652 p.
- 57.** Gundogan N, Avci E., 2013. Prevalence and antibiotic resistance of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli and Klebsiella species isolated from foods of animal origin in Turkey.. African Journal of Microbiology Research. Vol. 7(31), pp. 4059-4064 P
- 58.** Gonzalez D *et al* ., 2012. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain, Meat Science .
- 59.** Mirabaud M. , 2003 .Entérobactéries à bêta-lactamases à spectre élargi en pédiatrie .Thèse de doctorat en médecine. Suisse : Université de Genève. 52 P.
- 60.** Gassama A. ,2004. Etude du rôle des intégrons dans la multi résistance aux antibiotiques des bactéries entéropathogènes isolées en Afrique sub-saharienne. Thèse de doctorat en microbiologie. France : Université de Limoges.
- 61.** Paterson D, Bonomo R. ., 2005 Extended-spectrum beta lactamases: A clinical update. Clin Microbiol Rev; 18:657-86.

62.Boyd D, Tyler S,. 2004 .Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*; 48: 3758-64.

63.Farougou G , MENSAH A., 2009. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Département de Production et Santé Animales, 01 BP Cotonou, Bénin. 2



Annexe



Annexe

Milieux de culture utilisés

Les compositions sont données pour un litre de milieu.

1) Tryptone- sel

Composition

- Tryptone (peptone de caséine) : 1,0g
- Chlorure de sodium : 8,5g

PH final à 25°C : 7,0

Préparation

Dissoudre le tryptone et le chlorure de sodium dans 1 litre d'eau pure. Si nécessaire, chauffer sous agitation fréquente pour dissoudre complètement la suspension. Répartir en tubes ou en flacons. Autoclaver 15 minutes à 121°C.

2) Gélose Glucosée Biliée au Cristal Violet et au Rouge neutre (VRBG)

Composition

- Digestion pancréatique de gélatine : 7,0 g
- Extrait de levure : 3,0g
- Chlorure de sodium : 5,0 g
- Sels biliaires : 1,5g
- Glucose Monohydraté : 10,0g
- Rouge neutre : 0,03g
- Cristal violet : 0,002g
- Agar : 15,0 g

pH final : 7,4 ± 0,2

Préparation

Suspendre 41,5 g de milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger. Faire bouillir en agitant fréquemment pendant 1 minute jusqu'à dissolution complète. Refroidir à 45°C et utiliser immédiatement. Il peut aussi être réparti et stérilisé en autoclave à 118°C pendant 15 minutes. Ne pas surchauffer ou réchauffer de milieu.

3) Gélose Mac Conkey

Composition

- Peptone: 20,0 g
- Lactose : 10,0 g
- Sels biliaires : 5,0 g
- Cristal violet : 0,001 g
- Rouge neutre : 0,075 g
- Chlorure de sodium : 5,0 g
- Agar : 12,0 g

pH final $7,4 \pm 0,2$

Préparation

Suspendre 52g dans 1 litre d'eau distillée. Porter à ébullition pour dissoudre complètement. Stériliser à l'autoclave à 121°C pour 15 minutes. Verser dans des boîtes de Pétri stériles.

4) Bouillon au sélénite/ bouillon SFB (Selenite-F Broth)

Composition

- Tryptone : 5,0 g
- Lactose : 4,0 g
- Phosphate disodique : 10,0 g
- Sélénite acide de sodium : 4,0 g

pH = 7,0

Préparation

Mettre en suspension 23,0 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée. Porter à ébullition lentement, en agitant jusqu'à dissolution complète. Maintenir l'ébullition pendant 2 minutes. Ne pas autoclaver. Refroidir rapidement. Répartir en tubes ou en flacons stériles en remplissant les contenants aux 2/3 de leur capacité maximale.

5) Gélose Désoxycholate Citrate Lactose Sucrose (DCLS)

Composition

- Peptone : 7,0 g
- Extrait de viande : 3,0 g

- Lactose : 5,0 g
- Citrate de sodium : 10,5 g
- Citrate de fer III : 1,0 g
- Désoxycholate de sodium : 2,5 g
- Rouge neutre : 0,03 g
- Thiosulfate de sodium 5,0 g
- Agar-agar : 12,0 g

pH final : $7,2 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension 49,5g du milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger. Chauffer jusqu'à ébullition et dissolution complète. Ne pas surchauffer. Ne pas autoclaver. Laisser refroidir (45 à 50°C) et répartir en boîtes de Pétri.

6) Gélose *Salmonella-Shigella* (SS)

Composition

- Peptone : 5,0 g
- Extrait de viande : 5,0 g
- Lactose 10,0 g
- Citrate de sodium : 10,0 g
- Citrate de fer III 1,0 g
- Sels biliaires :8,5 g
- Rouge neutre : 25mg
- Thiosulfate de sodium : 8,5 g
- Vert brillant: 3,3 mg
- Agar-agar : 12,0 g

pH final : 7,3

Préparation

Suspendre 63 g dans 1 litre d'eau distillée. Porter à ébullition en agitant fréquemment et laisser dissoudre complètement. Ne pas autoclaver. Verser dans des boîtes de Pétri.

7) Gélose Nutritive (GN)

Composition

- Extrait de viande : 1,0g
- Extrait de levure : 2,5g
- Peptone : 5,0g
- Chlorure de sodium : 5,0 g
- Agar : 15,0 g

pH : 7,0

Préparation

Mettre en suspension 20,0 g dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution. Répartir en tubes ou en flacons. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

8) Gélose Mueller-Hinton (MH)

Composition

- Infusion de viande de bœuf : 300 g
- Peptone de caséine : 17,5 g
- Amidon de maïs : 1,5 g
- Agar : 17,0 g

pH = 7,4

Préparation

Mettre en suspension 38 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Homogénéiser puis chauffer en agitant. Porter à ébullition pendant environ une minute. Stériliser la gélose à l'autoclave durant 15 minutes à 121,1°C.

Tableau : Résultats détaillés des tests de détection des BLSE.

Espèce	Teste de synergie	Test de double disque
So 3	-	-
Ha 1	-	+
Ha 2	+ avec CAZ, CTX	+
So 5	-	+
Eg 1	+ avec ATM	-
So 12	+/- avec CTX	-
So 1	+/- avec ATM	+
Ko 9	+ avec CAZ	-
Ko 10	-	-
So 9	-	+
So 10	-	+
Ko 7	-	+
Pv 1	-	+
Ko 14	-	+
Kt 1	-	+
Ko 13	-	-
So 11	-	+
Eg 2	+/- avec ATM	+
Kx 1	-	-
So 13	+/- avec CTX	-
Ec 1	-	+
Ez 3	+/- avec ATM	+
Ko 15	-	-

Ko 14	-	-
Ko 10	+/- avec ATM, CTX, CAZ	-
So 2	-	+
So 7	-	+
Ha 3	-	-
Ez 2	-	-
Ez 1	-	+
So 8	-	+
So 4	-	+
Ko 6	-	+
Ck 1	-	-
Ko 9	-	-
Ko 8	-	+
Ko 12	-	+
Ko 11	-	+



Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : *Bouazza Sara*

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : ... *Biologie appliquée*

N° de carte d'étudiant : ... *201114012421*

Année universitaire : ... *2015/2016*

Domaine: ... *Sciences de la nature et de la vie*

Filière: ... *Sciences biologiques*

Spécialité: ... *Microbiologie appliquée à la santé et à l'environnement*

Intitulé du mémoire : *Recherche des enterobactéries productrices
des β lactamases à spectre élargi dans la viande
ravage*

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le ... *25/05/2016*

Signature de l'étudiant(e) :

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : Bouâkka Nesrine

Régulièrement inscrit(e) en **Master** au département : Biologie Appliquée

N° de carte d'étudiant : 2011 / 4012 865

Année universitaire : 2015 / 2016

Domaine: sciences de la nature et de la vie

Filière: sciences biologiques

Spécialité: Microbiologie appliquée à la santé et à l'environnement

Intitulé du mémoire : Recherche de souches bactériennes productrices de β -lactamase à spectre élargi dans la viande rouge.

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : 25/05/2016

Signature de l'étudiant(e) :

NE SRINE