



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

Thème

Recherche des carbapénèmases chez des souches bactériennes isolées des viandes de volailles

Présenté par :

Amra amel

Chaabane sara

Devant le jury :

Dr Boukoucha. M	MCB	Université de Tébessa	Président
Mme Azizi. N	MAA	Université de Tébessa	Examinatrice
Dr Debabza. M	MCB	Université de Tébessa	Promotrice
Dr Mechai abdelbasset	MCA	Université de Tébessa	Co-promoteur

Date de soutenance : 28 Mai 2018
Note : 16/ 20 Mention : Très bien



Université Larbi Tébessi - Tébessa



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : *Amra Amel*

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

N° de carte d'étudiant : *34.014.14/2013*

Année universitaire : *2017 - 2018*

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

Filière : *Sciences biologiques*

Spécialité : *Microbiologie Appliquée*

Intitulé du mémoire : *Recherche de carbapénèmes chez des souches bactériennes isolées des viams des volailles*

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.

26 ماي 2018



Fait à Tébessa, le *24.05.2018*

Signature de l'étudiant(e)





Université Larbi Tébessi - Tébessa

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : Chaabane Sara

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

N° de carte d'étudiant : 3.40.194.25

Année universitaire : 2017/2018

Domaine : Science de la nature et de vie

Filière : sciences biologiques

Spécialité : Technologie Appliquée

Intitulé du mémoire : Recherche des castes pénètrees chez des
soies bactériennes isolées des viandes des vaches

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.

2018 ماي 29

Fait à Tébessa, le : 27/05/2018

Signature de l'étudiant(e) :

ملخص

تمثل الكاربابينام الجزيئات المختارة لعلاج عدوى المستشفيات. ومع ذلك شهدت السنوات الأخيرة انتشارا واسعا للسلاسل المعوية المقاومة لهذه الجزيئات حيث تتدخل عدة آليات في مقاومة الكاربابينيم بما في ذلك إنتاج الكاربابينيماز. الهدف من هذا العمل هو البحث عن انتاج الكاربابينيماز عند السلالات البكتيرية المعزولة من لحوم الدواجن وذلك بواسطة أساليب نمطية.

تم أخذ العينات من محلات الجزارة المختلفة لمدينة تبسة و بعد العزل تم تحديد بواسطة نظام المنمنمة Api20E ومن ثم اختبار حساسية الكاربابينام وفقا لطريقة انتشار الاقراص وكان التحقق من إنتاج الكاربابينيماز بواسطة اختبار Carba NP و ذلك بالاستناد على اظهار تحمض الوسط من خلال مؤشر ملون اثناء تحلل إيميبينيم بواسطة كاربابينيماز.

من 9 عينات تم عزل وتحديد 75 سلالة معوية تنتمي إلى أجناس مختلفة : *Serratia* (50.67%) ، *Escherichia* (14.67%) ، *Salmonella* (8%) ، *Klebsiella* (6.67%) ، *Citrobacter* (4%) ، *Enterobacter* (2.67%) .

أظهرت دراسة الحساسية للكاربابينيم مقاومة عالية للارتبينيم (58.06%) ومعدل اقل للاميبينيم (26.76%). كما كان اختبار CarbaNP موجبا عند 6 سلالات من أصل 75 سلالة، أي 8% من السلالات المعوية التي تم اختبارها.

تبين دراستنا وجود سلالات معوية منتجة للكاربابينيماز في لحوم الدواجن. حيث يمكن نقل هذه البكتيريا المقاومة إلى البشر عبر السلسلة الغذائية مما يثير مخاوف جدية حول الصحة العامة وسلامة الغذاء.

الكلمات المفتاحية : بكتيريا معوية، مقاومة الكاربابينيم، الكاربابينيماز ، لحوم الدواجن، اختبار CarbaNP، اختبار هودج المعدل

Abstract

Carbapenems are the molecules of choice for the treatment of nosocomial infections. However, in recent years, there is a spread of enterobacteriaceae strains resistant to these molecules. Several mechanisms may have been at the origin of carbapenem resistance, including the production of carbapenemases.

The aim of this study is to search the production of carbapenemases by phenotypic methods in bacterial strains isolated from poultry meat.

The samples were taken from the different butcheries of the city of Tébessa. After isolation, the identification was carried out by the Api 20E strips and the carbapenem susceptibility test was performed according to the diffusion method in agar medium. The production of carbapenemases was investigated by the Carba NP test, a phenotypic test based on the demonstration of the medium acidification, by a colored indicator, during the hydrolysis of imipenem by a carbapenemase.

From 9 samples, we have isolates and identified 75 strains of enterobacteriaceae that belong to different genera: *Serratia* (50.67%), *Escherichia* (14.67%), *Kluyvera* (13.33%), *Salmonella* (8%), *Klebsiella* (6.67%), *Citrobacter* (4%) and *Enterobacter* (2.67%). The susceptibility test to carbapenems showed a high resistance to ertapenem (58.06%) and a lower rate to imipenem (26.76%). The test of Carba NP was positive in 6/75 of the strains, ie 8% of the enterobacteriaceae tested.

Our study shows the presence of enterobacteriaceae producing carbapenemases in poultry meat. Therefore, these resistant bacteria can potentially be transferred to humans across the food chain. This situation raises serious concerns about public health and food safety.

Key words: enterobacteriaceae, carbapenem resistance, carbapenemases, poultry meat, Carba NP test, modified Hodge test.

Résumé

Les carbapénèmes représentent les molécules de choix pour le traitement des infections nosocomiales. Cependant depuis quelques années, on assiste à une dissémination des souches d'entérobactéries résistantes à ces molécules. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la résistance aux carbapénèmes dont la production de carbapénèmases.

L'objectif de notre travail est de rechercher par des méthodes phénotypiques la production de carbapénèmases chez des souches bactériennes isolées de viandes de volailles.

Les échantillons ont été prélevés à partir des différentes boucheries de la ville de Tébessa. Après isolement, l'identification a été effectuée par la galerie Api 20E et le test de sensibilité aux carbapénèmes a été réalisé selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. La production des carbapénèmases a été recherchée par le test Carba NP, un test phénotypique basé sur la mise en évidence de l'acidification du milieu, grâce à un indicateur coloré lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase.

A partir de 9 échantillons, on a pu isoler et identifier 75 souches d'entérobactéries appartenant aux différents genres : *Serratia* (50,67%), *Escherichia* (14,67 %), *Kluyvera* (13,33%), *Salmonella* (8%), *Klebsiella* (6,67%), *Citrobacter* (4%) et *Enterobacter* (2,67 %). L'étude de la sensibilité aux carbapénèmes a montré un taux de résistance élevé à l'ertapénème (58,06%) et un taux moindre à l'imipénème (26,76%). Le test Carba NP a été positif chez 6/75 des souches soit 8% des entérobactéries testées.

Notre étude montre la présence des entérobactéries productrices des carbapénèmases dans les viandes de volailles. Par conséquent, ces bactéries résistantes pourraient être potentiellement transférées aux humains à travers la chaîne alimentaire. Cette situation soulève de sérieuses préoccupations concernant la santé publique et la salubrité des aliments.

Mots clés : entérobactéries, résistance aux carbapénèmes, carbapénèmases, viandes de volailles, test Carba NP, test de Hodge modifié.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu, le tout puissant le généreux qui nous a donné la force et la volonté afin d'accomplir ce travail.

*Nos vifs remerciements s'adressent à notre promotrice **Dr Mechai Manel** qui trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa patience, sa bienveillance, et ses conseils.*

Nous offrons un grand remerciement à notre Co-encadreur Mr.Mechai qui était très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons également à remercier les membres de notre jury :

Dr BOUKoucha et Mme AZIZI, d'avoir accepté de présider et d'examiner ce travail.

Nos profonds remerciements vont à l'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie.

*Nous n'oublions pas de remercier infiniment **Mr et Mme Deghboudj** pour leur aide.*

Nous tenons également à exprimer nos remerciements à tous nos enseignants qui nous ont soutenu durant les années de notre cursus d'étude.

Nous tenons à remercier également tous les gens qui nous ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

Amel et Sara

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné

*Un magnifique model de labeur et de persévérance, de la tendresse, de
L'amour et de la force et dont je suis fière et reconnaissante de les avoir*

Comme parents.

Pour

Mes sœurs Khaoula et aya pour

Leur support continuel et leur amour.

A mes amies

A mon adorable binôme Sara

Et à ceux qui me sont très chers et qui m'ont aidé de près ou de loin à

Réaliser ce travail.

Amel

Dédicaces

A mes très chers parents...

A toute ma famille ...

A ma chère binôme amel

A ceux qui m'aiment...

A ceux que j'aime...

Sara

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Spectre d'action des carbapénèmes	6
02	Prélèvements réalisés au cours de l'étude	16
03	Lecture de la galerie miniaturisée Api 20E	21
04	Diamètres critiques des zones d'inhibition correspondant aux carbapénèmes utilisées	23
05	Interprétation des résultats du Carba NP test	25
06	Résultats de l'identification par l'Api 20E	30
07	Pourcentage de résistante aux carbapénèmes selon le genre	37
08	Résultats du test Carba NP.	38

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Structure moléculaire des β -lactamines	3
02	Structures chimique de base de carbapénèmes	4
03	Structure chimique des différentes carbapénèmes	5
04	Mode d'action des carbapénèmes	5
05	Hétérogénéité d'activité hydrolytique des carbapénémases des entérobactéries	7
06	Mécanismes d'altération des porines	8
07	Echantillon de viande volaille dans un sac ligaturé	16
08	Préparation de la suspension mère	17
09	Technique de purification et de conservation	18
10	Photo d'une galerie Api 20 E	19
11	Principe de Carba NP test	24
12	Les résultats de Carba NP test	26
13	Principe de test de Hodge modifié	27
14	Principaux aspects macroscopiques sur Mac conkey	28
15	Principaux aspects microscopiques observé après coloration de Gram	29
16	Photographie de l'Api 20E de la souche 40 (<i>Serratia odorifera 1</i>)	31
17	Photographie de l'Api 20E de la souche 15 (<i>Escherichia coli 1</i>)	31
18	Photographie de l'Api 20E de la souche 11 (<i>Kluyvera spp.</i>)	31
19	Photographie de l'Api 20E de la souche 3 (<i>Salmonella arizonae</i>)	31
20	Photographie de l'Api 20E de la souche 53 (<i>Klebsiella ornithinolytica</i>)	32
21	Photographie de l'Api 20E de la souche 24 (<i>Citrobacter freundii</i>)	32
22	Photographie de l'Api 20E de la souche 45 (<i>Citrobacter koseri / farmeri</i>)	32

Liste des figures (Suite)

N°	Titre	Page
23	Photographie de l'Api 20E de la souche 58 (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	32
24	Photographie de l'Api 20E de la souche 51 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	33
25	Répartition des souches en fonction de genres	33
26	Répartition des souches en fonction des espèces	34
27	Histogramme représentatif de la sensibilité aux carbapénèmes des souches isolées	36
28	Quelques exemples des résultats du test Carba NP	39
29	Répartition des EPC en fonction des espèces	40
30	Résultats de test de Hodge modifié	41

Liste des symboles

- + %: pourcentage.
- + °C: Degré Celsius.
- + ADH : Arginine dihydrolase.
- + AMY: amygdaline.
- + Api 20E :Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries).
- + ARA: arabinose.
- + BGN: Bacilles à Gram négatif
- + BLSE : β -lactamase à spectre étendu.
- + CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- + Cclin : Centre de Coordination de la lutte contre les infections nosocomiales.
- + CIT: Citrate.
- + CLSI : Clinical & laboratory standards institute.
- + CMI: concentration minimale inhibitrice.
- + CNR : Centre National de Référence.
- + C3G : céphalosporines de troisième génération
- + ECP: Entérobactéries Productrices de Carbapénèmes.
- + ERC: entérobactéries résistantes aux carbapénème
- + ETP : ertapénème.
- + GLU: Glucose.
- + GN: Gélose nutritive.
- + H₂S : hydrogène sulfuré.
- + I : Intermédiaire.
- + IMI : Imipénème.
- + IMP : *Active on Imipenem* : carbapénémase
- + IND : Indole.
- + INO : Inositol.
- + KPC : Klebsiella pneumoniae carbapénémase.
- + LDC : Lysine décarboxylase.
- + MAN: Mannitol.
- + MC: Mac Conkey.
- + MEL: Melibiose.
- + MH: Mueller-Hinton.
- + N₂ : Azote.

- ✚ **NDM** : New-Delhi métallob- β -lactamase.
- ✚ **NIT**: Nitrate réductase.
- ✚ **NMC-A** : Non-metallo-carbapénémase-A.
- ✚ **ODC**: Ornithine décarboxylase.
- ✚ **ONPG**: Orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside.
- ✚ **Oxa** : oxacillinase
- ✚ **PLP**: Protéine Liant la Pénicilline.
- ✚ **R**: Résistante
- ✚ **RHA**: Rhamnose.
- ✚ **S**: Sensible
- ✚ **SAC**: saccharose.
- ✚ **SME** : *Serratia marcescens* enzyme.
- ✚ **SOR**: sorbitol.
- ✚ **TDA** : Tryptophane désaminase.
- ✚ **URE**: Uréase.
- ✚ **VIM** : Verona integron encoded metallo- β -lactamase.
- ✚ **VP**: Voges-Proskauer.
- ✚ **Zn**: Zinc.

Table des matières

ملخص

Abstract

Résumé

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des symboles

Introduction [1]

Chapitre 01 : Revue bibliographique

I. Carbapénèmes.....	[3]
1-Définition et Historique	[3]
2-Structure chimiques	[4]
3-Molécules disponibles.....	[4]
4-Mécanismes d'action.....	[5]
5-Spectre d'action	[6]
II. Mécanismes de résistances.....	[6]
1-Mécanismes enzymatiques (Carbapénèmases)	[6]
2- Mécanismes non enzymatiques	[7]
2-1 Association des mécanismes	[7]
2-2 Altération des protéines de liaison des pénicillines	[9]
III. Classification et propriétés des Carbapénèmases	[9]
1-Classification fonctionnelle	[9]
2-Classification moléculaire	[9]
2-1 Carbapénémase de classe A.....	[9]
2-2 Carbapénémase de classe B	[10]
2-3 Carbapénémase de classe D	[10]
3- Epidémiologie	[11]
3-1 Epidémiologie mondiale	[11]
3-1-1 Béta lactamases de classe A	[11]
3-1-2 Béta lactamases de classe B	[12]

3-1-3 Béta lactamases de classe D	[12]
3-2 Epidémiologie en Algérie	[13]

Chapitre 02 : Matériel et méthodes

I. Matériels.....	[14]
1- Appareillages	[14]
2- Verreries et outils	[14]
3- Réactifs et autres produits	[15]
4- Milieux de culture	[15]
5- Produits et solution chimique pour la réalisation du test Carba NP	[15]
I. Méthodes	[16]
1- Prélèvement	[16]
2- Préparation de la suspension mère	[17]
3- Préparation des dilutions décimales.....	[17]
4- Ensemencement et incubation	[18]
5- Isolement et purification	[18]
6- Conservation	[18]
7- Identification biochimiques par la galerie Api 20E	[19]
8- Etude de la sensibilité aux Carbapénèmes	[22]
9- Détection de Carbapénémase par le test carba NP	[24]
10- Détection de Carbapénémase par le test de Hodge modifié	[26]

Chapitre 03 : Résultats et discussion

1- Examen macroscopique.....	[28]
2- Examen microscopique.....	[29]
3- Identification biochimique.....	[30]
4- Répartition des souches selon le genre	[33]
5- Répartition des souches selon les espèces	[34]
6- Sensibilité des souches aux Carbapénèmes	[36]
7- Détection des EPC	[38]
7-1 Test de carba NP	[38]
7-1-1 Répartition des EPC en fonction des espèces	[40]
7-2 Test de Hodge modifié.....	[41]

8- L'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire et la diffusion de souches multi résistantes [41]

Conclusion et perspectives..... [45]

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

L'utilisation des antibiotiques en clinique depuis les années 1940, constitue une étape importante dans l'histoire de la médecine. Leur usage en médecine humaine et vétérinaire dans un but thérapeutique a constitué pendant longtemps une arme efficace contre de nombreux germes pathogènes (**Kantati, 2011**).

Le traitement des infections causées par les entérobactéries repose principalement sur les β -lactamines. Cependant, leur utilisation intensive a conduit les bactéries à s'adapter progressivement pour leur survie en produisant des enzymes inactivatrices : les β -lactamases qui inactivent les antibiotiques en procédant à l'hydrolyse de leur cycle β -lactame (**Ambler, 1980**).

L'émergence des souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) par production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et de céphalosporinases a accentué l'utilisation des seules β -lactamines restant actives sur ces souches: les carbapénèmes. Ces molécules présentent une excellente activité antibactérienne liée en particulier à la rapidité de leur pénétration à travers la paroi des bacilles Gram à négatif (BGN) et à leur stabilité vis-à-vis de la plupart des β -lactamases naturelles ou acquises, y compris les céphalosporinases et les BLSE.

Le recours intensif aux carbapénèmes a conduit une nouvelle fois les bactéries à développer une résistance à ces antibiotiques, qui résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous deux des β -lactamases : le premier mécanisme associe la production d'une céphalosporinase chromosomique ou plasmidique ou d'une BLSE à une perte de perméabilité membranaire; le second mécanisme implique la production de β -lactamases présentant une forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes : les carbapénémases (**Walsh et al., 2005**). Ces enzymes hydrolysent les carbapénèmes et entraînent la perte d'activité de ces antibiotiques.

Les carbapénèmes sont utilisées en médecine humaine et en médecine vétérinaire, ce qui suggère le développement des résistances à ces antibiotiques chez les bactéries qui abritent les produits alimentaires d'origine animale comme les viandes. Dans cette optique, notre travail porte sur la recherche des carbapénémases chez des souches bactériennes isolées des viandes des volailles.

Les objectifs de ce travail sont les suivants :

- Evaluation de la sensibilité des souches de BGN, à deux carbapénèmes : l'imipénème et l'ertapénème.
- Détection phénotypique de la production des carbapénèmases par le test Carba NP (Nordmann-Poirel).

Ce manuscrit inclut trois parties : une première partie théorique qui sera consacrée aux carbapénèmes et aux carbapénèmases. Une deuxième partie pratique qui sera consacrée à la présentation du matériel et de la méthodologie utilisés dans l'isolement, l'identification, l'étude de sensibilité aux carbapénèmes et la détection des carbapénèmases. Dans la dernière partie, nous présentons les résultats obtenus ainsi que leur discussion. Enfin, une conclusion générale et quelques perspectives seront présentées.

Chapitre 01

Revue

Bibliographique

I. Carbapénèmes :

Les carbapénèmes appartiennent à la famille des β -lactamines qui représente la plus importante famille d'antibiotiques par le nombre de molécules disponibles et par le volume d'utilisation, aussi bien en ville qu'à l'hôpital. Cette utilisation importante est due à leur large spectre d'action, leur efficacité, leur faible toxicité et à leur faible coût pour de nombreuses molécules (Rolinson, 1998).

La base commune à toutes les β -lactamines est le noyau β -lactame (Figure 01). À partir de ce cycle, quatre sous-familles ont été développées par adjonction de chaînes latérales : les pénicillines (ou pénames), les céphalosporines (ou céphèmes), les monobactames et les carbapénèmes (annexe 01).

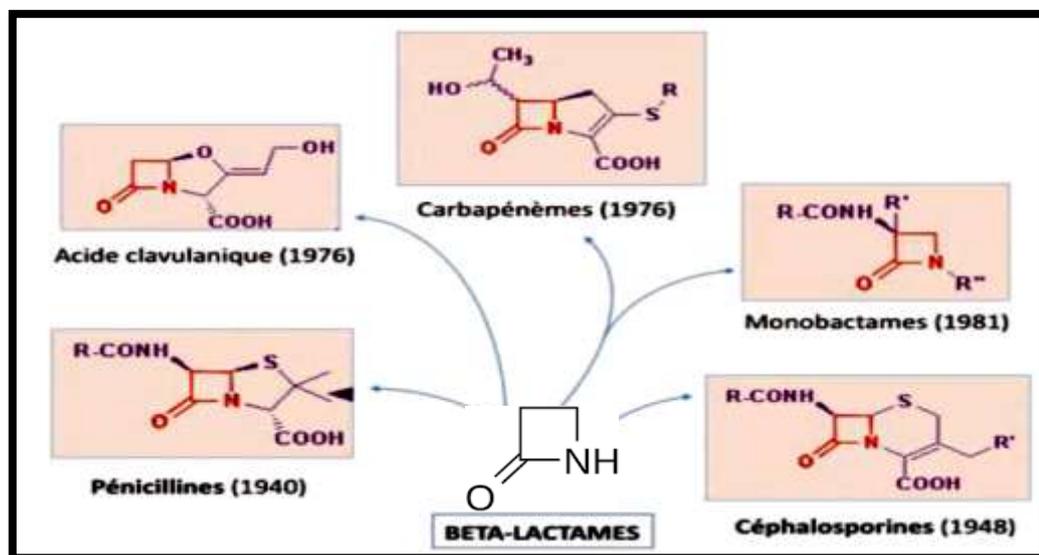


Figure 01 : Structure moléculaire des β -lactamines (Thibaut, 2016)

1-Définition et historique :

Les carbapénèmes sont une des dernières classes d'antibiotiques de la famille des β -lactamines. C'est en 1976 que fut découverte la thiénamycine, produite par *Streptomyces cattleya*.

La molécule était instable, ce qui conduisit au développement, dans les années 1980, d'un dérivé N-forminidoyle semi-synthétique, l'imipénème. En raison d'une dégradation rapide *in vivo* par la dehydropeptidase rénale humaine (DHP-1), l'imipénème doit être co-administré avec un inhibiteur de cette enzyme, la cilastatine.

L'imipénème possède un quasi-monopole au sein de cette famille en France, alors que le méropénème, apparu environ dix ans plus tard, est largement utilisé dans d'autres pays d'Europe et

en Amérique du Nord. Le début des années 2000 a vu l'apparition de nouvelles carbapénèmes : l'ertapénème et le doripénème.

Les carbapénèmes sont des antibiotiques majeurs de la famille des β -lactamines, en raison notamment de leur très large spectre (**Grall et Muller, 2013**), ce sont des antibiotiques à usage hospitalier pouvant être utilisés en traitement probabiliste en cas de suspicion d'infection à une bactérie multi-résistante. Leur utilisation est justifiée en raison de leur activité conservée à l'égard des bacilles Gram à négatif (BGN) résistants aux céphalosporines de troisième génération (C3G), par production d'une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) ou hyperproduction d'une céphalosporinase (**Gauzit et al., 2010**). En effet, ils possèdent une excellente activité antibactérienne en raison de leur bonne pénétration à travers la membrane externe des bactéries et de leur bonne stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse de la plupart des β -lactamases (**Day et al., 2013**).

2- Structure chimique :

La structure des carbapénèmes comprend un noyau β -lactame auquel est fusionné un cycle distinct de celui des pénicillines (l'atome de soufre est remplacé par un carbone en position 1 et le cycle comporte une liaison C2-C3 insaturée (**Figure 02**).

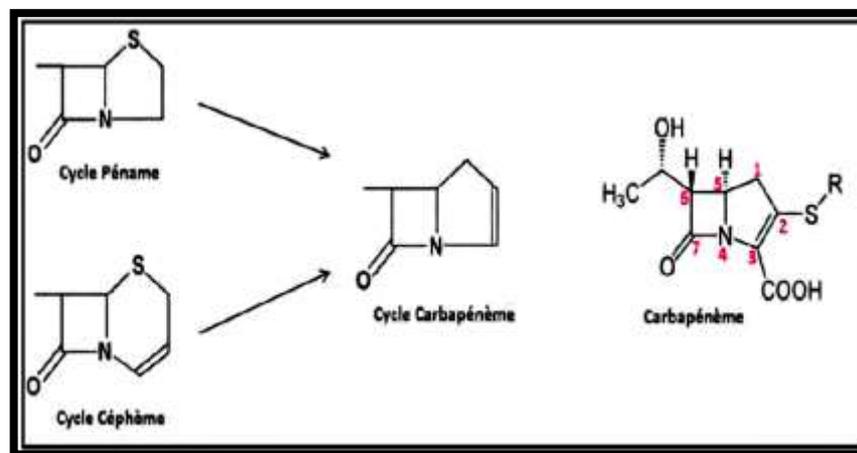


Figure 02 : Structure chimique de base des carbapénèmes
(Wolff *et al.*, 2008 ; Cuzon *et al.*, 2010).

3- Molécules disponibles :

Les molécules actuellement commercialisées en France sont : l'imipénème (Tienam®), le méropénème (Méronem®) et l'ertapénème (Invanz®), dont le spectre est plus restreint ; le doripénème (Doribax®) ayant été retiré du marché en 2014 (**Day et al., 2013**) (**Figure 03**).

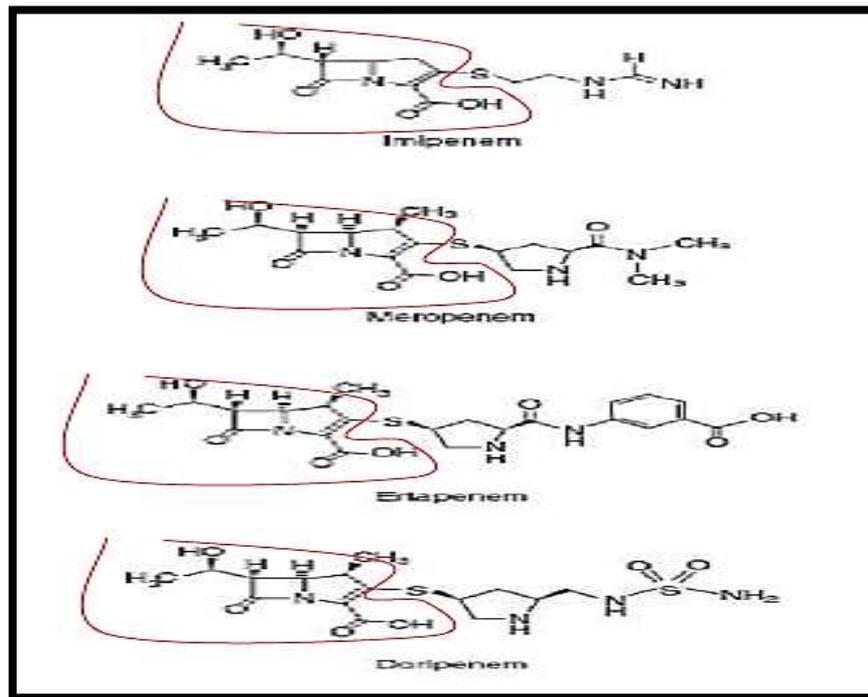


Figure 03 : Structure chimique des différents carbapénèmes (Gauzit *et al.*, 2012).

4-Mécanisme d'action :

Les carbapénèmes exercent leur activité en se liant aux protéines de liaison à la pénicilline (PLP), inhibant ainsi l'étape de transpeptidation nécessaire à la synthèse du peptidoglycane (**Figure 04**). Leur affinité pour les différentes PLP varie selon les molécules, ce qui explique en partie leur différence d'activité des pénicillines PLP contrairement aux céphalosporines et aux aminopénicillines qui se lient principalement à la PLP3, les carbapénèmes ont pour cibles privilégiées les PLP1a, 1b et 2 (Guery, 2009).

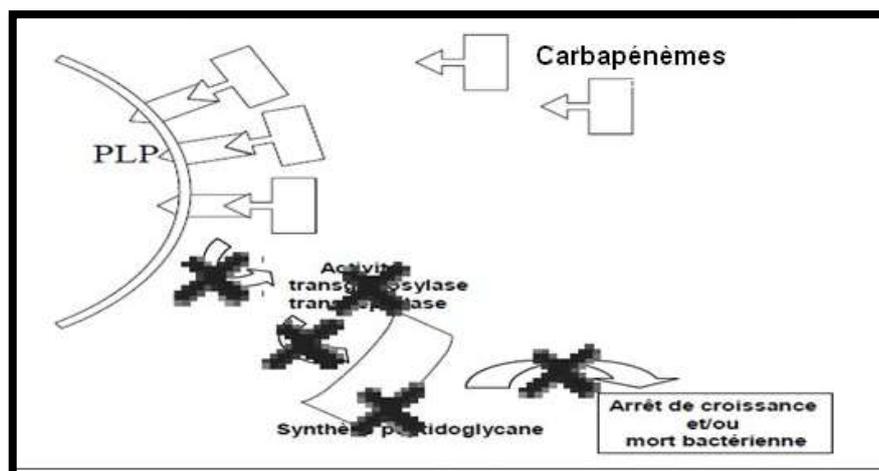


Figure 04 : Mode d'action des carbapénèmes (Thibaut, 2016)

5-Spectre d'action :

Les carbapénèmes possèdent une activité bactéricide rapide sur les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif incluant les bactéries aérobies et anaérobies (**Tableau 01**).

Quant aux bactéries suivantes, elles sont naturellement résistantes aux carbapénèmes : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, *Enterococcus faecium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus sp*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* (**Delaere et Glupczynski, 2002 ; Paradis et al., 2009 ; Cuzon et al., 2010**).

Tableau 01 : Spectre d'action des carbapénèmes.

(**Delaere et Glupczynski, 2002 ; Paradis et al., 2009 ; Cuzon et al., 2010**).

Forme bactérienne	Cocci Gram positifs et négatifs	Bacilles Gram Négatifs	Anaérobies
Espèces bactériennes	<ul style="list-style-type: none"> • Staphylocoques • Streptocoques • Entérocoques • <i>Neisseria</i> • <i>Moraxella cattaharis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Entérobactéries • <i>Haemophilus</i> • Bacilles non fermentant tels <i>Acinetobacter</i> et <i>Pseudomonas</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Clostridium</i> • <i>Bacteroides</i> • <i>Fusobacterium</i>

II. Mécanismes de résistance aux carbapénèmes :**1-Mécanisme enzymatique (carbapénémases) :**

Les carbapénémases appartiennent aux β -lactamases, enzymes capables d'hydrolyser le cycle β -lactame des β -lactamines. Elles hydrolysent les carbapénèmes avec une plus ou moins grande efficacité, l'hydrolyse des autres β -lactamines étant variable en fonction du type d'enzyme. En présence de carbapénémases, la résistance aux carbapénèmes est souvent majeure, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) très élevées, à l'exception des enzymes de type OXA-48 et apparentées. Ces CMI présentent une grande variabilité en fonction des enzymes produites, rendant leur détection difficile. Des sensibilités apparentes sur l'antibiogramme peuvent ainsi être retrouvées chez des bactéries productrices de carbapénémases (**Figure 5**) (**Grall et al., 2011 ; Arlet, 2012**).

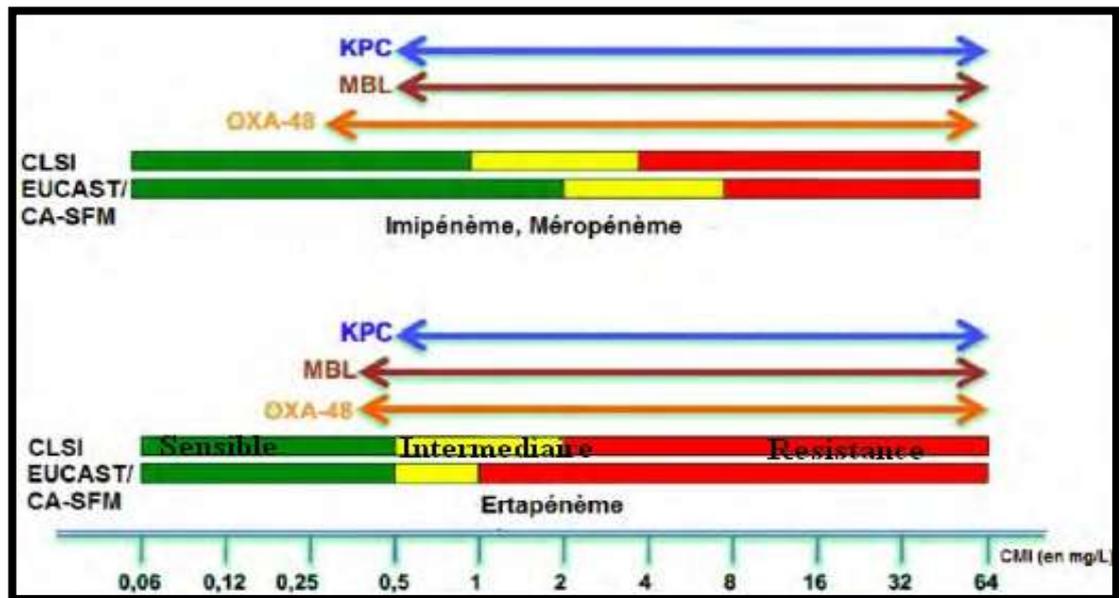


Figure 05 : Hétérogénéité d'activité hydrolytique des carbapénèmases des entérobactéries (Arlet, 2012).

2- Mécanisme non enzymatique :

2-1- Association des mécanismes:

Dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif sont incluses des protéines spécifiques, appelées porines, formant un canal hydrophile permettant l'entrée sélective des nutriments essentiels à la bactérie et de certains autres composés, dont les antibiotiques (Pagès et jaimés, 2008). Ainsi, toute modification dans le nombre ou l'activité de ces porines peut engendrer des effets immédiats sur la résistance aux antibiotiques. Un des mécanismes de résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries associe une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des porines (Figure 06) et la production d'une enzyme ne possédant pas d'activité hydrolytique significative vis-à-vis des carbapénèmes, comme les céphalosporinases chromosomiques ou plasmidiques, ou les BLSE.

Ce mécanisme a été décrit, tout d'abord chez *Enterobacter* sp. puis dans d'autres espèces d'entérobactéries qui produisent naturellement une céphalosporinase (entérobactéries dites du groupes III : *Serratia* sp. *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*...) (Doumith et al., 2009 ; Tzouvelekis et al., 1994)

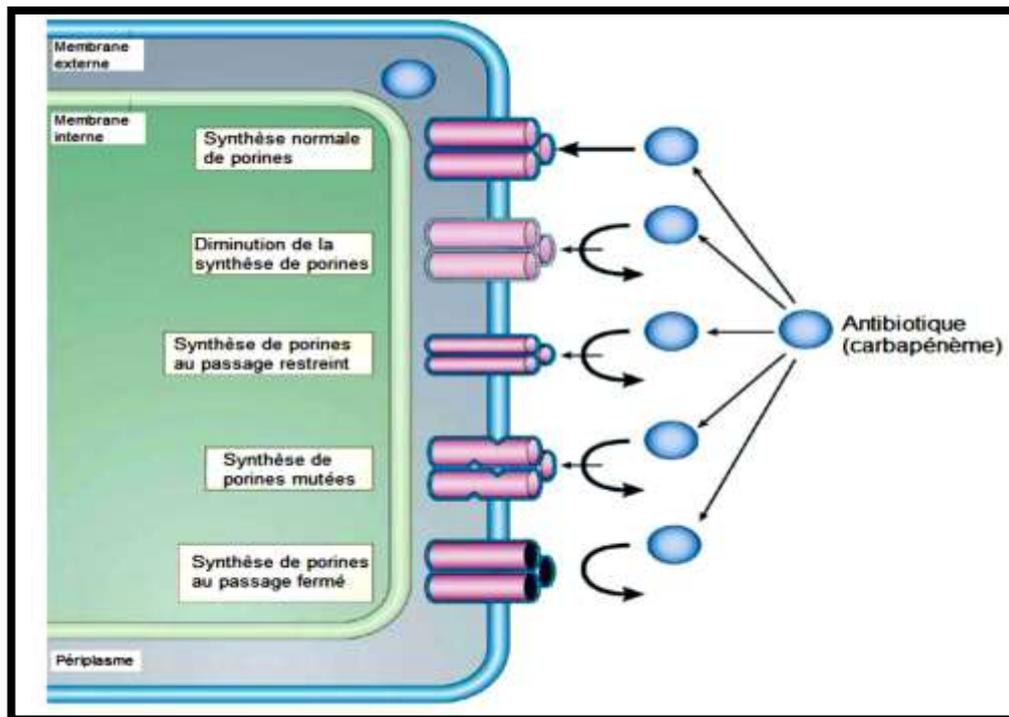


Figure 06: Mécanismes d'altération des porines (Pagès *et al.*, 2008).

Plus récemment, des mécanismes de résistance aux carbapénèmes, en fait assez similaires, ont été décrits combinant une céphalosporinase plasmidique (DHA-1, CMY-2...) ou une BLSE (TEM, SHV, CTX-M...) à de l'imperméabilité dans des espèces d'entérobactéries qui n'expriment pas naturellement de céphalosporinase (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Salmonella sp.*) (Doumith *et al.*, 2009 ; Martinez, 2008).

Plusieurs études suggèrent que ces résistances sont réversibles du fait de l'instabilité de la modification de porines. Ce phénomène serait la conséquence d'une limitation de croissance bactérienne liée à une moindre utilisation de substrats exogènes normalement capables de transiter via ces porines devenues déficientes ou en quantité insuffisante.

Ces souches résistantes aux carbapénèmes, mais qui ne produisent pas de carbapénèmase, sont en général beaucoup moins résistantes aux autres familles d'antibiotiques que les entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC). En effet, cette résistance aux carbapénèmes n'est pas transférable, car elle implique des modifications de gènes dont la localisation est chromosomique (ex : porines, céphalosporinases naturelles chez les entérobactéries du groupe III). Pour ces raisons, les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, mais qui ne produisent pas de carbapénèmase, sont considérées comme d'un intérêt clinique modéré par comparaison aux EPC (Doumith *et al.*, 2009).

2-2 Altération des protéines de liaison des pénicillines :

L'altération de certaines PLP chez *P. mirabilis* peut être à l'origine de résistances à l'imipénème. Ce mécanisme reste toutefois rare (Neuwirth *et al.*, 1995).

III. Classification et propriétés de carbapénèmases :

Les β -lactamases sont classées selon deux caractéristiques, fonctionnelles ou moléculaires :

1-Classification fonctionnelle :

Il s'agit de l'ancienne classification des β -lactamases selon leurs propriétés biochimiques, les substrats d'hydrolyse et le profil d'inhibition. Elle fut proposée par Bush et coll (Bush et Jacoby, 2010) et classe les β -lactamases en quatre groupes (1 à 4), avec de multiples sous-groupes pour le groupe 2. Dans cette classification, les carbapénèmases sont présentes dans les groupes 2d, 2f, et 3 (annexe 2).

2-Classification moléculaire :

Elle fut établie par Ambler et coll (Ambler, 1980) et divise les β -lactamases en 4 classes (A à D) selon la structure primaire des enzymes (annexe 02). Les classes moléculaires A, C et D incluent des β -lactamases ayant une sérine pour site actif, tandis que la classe moléculaire B est constituée de métallo-enzymes, dont le site actif contient des ions zinc. Les carbapénèmases constituent une famille très hétérogène, définie sur la base d'un spectre enzymatique (l'hydrolyse d'au moins un carbapénème) et non sur une base structurale. Elles sont ainsi retrouvées au sein des classes A, B et D d'Ambler.

2-1-Carbapénèmases de classe A :

Les carbapénèmases de classe A (sous-groupe 2f de Bush) sont des enzymes plasmidiques ou plus rarement chromosomiques comme SME (*Serratia marcescens* enzyme), IMI (Imipénèmase) et NmcA (Non-metallo-carbapénèmase-A) (Bush *et al.*, 1995). KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapénèmase) la carbapénèmase plasmidique de classe A la plus fréquemment rencontrée, hydrolyse davantage les céphalosporines et les pénicillines que les carbapénèmes et l'aztréonam (Thomson, 2010).

Les enzymes de cette classe A sont inhibées à des degrés variables par l'acide boronique, l'acide clavulanique et le tazobactam (**Pasteran, 2009**) cependant davantage par ce dernier, l'EDTA n'a aucune action sur elles (**Bush et Jacoby, 2010**).

2-2-Carbapénèmases de classe B :

Les métallo- β -lactamases (MBL) comme VIM (*Verona integron encoded metallo- β -lactamase*), IMP (*Active on Imipenem* : carbapénémase) et NDM-1 (New-Delhi métallo- β -lactamase) correspondent à la classe B de la classification d'Ambler (groupe 3 de Bush).

Les MBL diffèrent des sérines carbapénèmases par la présence d'ions zinc au niveau du site actif qui catalysent la réaction enzymatique. Elles comptent actuellement plus de 80 enzymes découvertes à travers le monde.

Dans de nombreuses espèces, plus de 75 % de ces gènes étant portés par des plasmides (**Bush, 2010**). Les MBL hydrolysent largement les carbapénèmes, les pénicillines et les céphalosporines. Elles épargnent l'aztréonam (**Bush et Jacoby, 2010**).

Toutes les MBL sont inhibées par des agents chélateurs du zinc comme l'EDTA mais aussi par l'acide dipicolinique. En revanche, l'acide clavulanique, l'acide boronique ou le tazobactam n'exercent aucune activité inhibitrice sur ces enzymes (**Bush et Jacoby, 2010**).

2-3-Carbapénèmases de classe D :

Les carbapénèmases de classe D correspondent aux enzymes de type oxacillinases (OXA) à activité carbapénémase (sous-groupe 2df de Bush) : OXA-48, OXA-163, OXA-181 essentiellement. Leur activité carbapénémase est cependant faible avec une vitesse d'hydrolyse du méropénème inférieure à celle de l'imipénème, mais 40 à 50 fois plus faible que celles retrouvées pour les pénicillines. Elles n'hydrolysent pas ou peu les C3G, ce qui rend leur détection délicate. En revanche, elles hydrolysent fortement la témocilline (ou 6- α -methoxy-ticarilline) (**Maurer et al., 2015**) et sont définies par leur activité hydrolytique vis-à-vis de la cloxacilline ou de l'oxacilline.

Ces enzymes sont résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique et tazobactam) et l'EDTA n'a aucune action.

Leur présence est souvent couplée à la présence d'une BLSE, ce qui conduit à une multi-résistance des souches sécrétrices. Elles sont le plus fréquemment décrites chez *Acinetobacter baumannii* et les entérobactéries (**Bush et Jacoby, 2010**).

3-Epidémiologie :

3-1- Epidémiologie mondiale :

3-1-1-Bêta-lactamases de classe A :

Parmi les bêta-lactamases de classe A, seules les carbapénèmases de type KPC ont été très largement rapportées dans le monde (Nordmann *et al.*, 2009). Les carbapénèmases KPC (essentiellement KPC-2) ont été identifiées essentiellement chez *K. pneumoniae* et plus rarement chez *E. coli*, *P. mirabilis*, *Enterobacter sp.* *Serratia sp* (Nordmann *et al.*, 2009).

Après leur identification sur la côte est des États-Unis, d'autres souches d'entérobactéries KPC ont été très rapportées dans la plupart des états des États-Unis, avec une forte prévalence dans l'état de New York. Dans certains cas, 30 % des souches de *K. pneumoniae*, productrices de KPC, exprimaient une BLSE (Nordmann *et al.*, 2009 ; Gootz *et al.*, 2009 ; Kitchelk *et al.*, 2009). Ainsi, ces souches ont été très décrites en Israël et en Grèce où elles semblent être, maintenant, endémiques (Nordmann *et al.*, 2009 ; Pournaras *et al.*, 2009 ; Leavit *et al.*, 2010).

Elles ont été rapportées également dans la plupart des pays européens de façon sporadique, au Canada, en Amérique du Sud, dans les Caraïbes et en Chine. En France, une dizaine de souches d'entérobactéries KPC ont été identifiées (Nordmann *et al.*, 2009 ; Barbier *et al.*, 2010 ; Naas *et al.*, 2010). Dans tous les cas, il s'agit de souches de *K. pneumoniae* exprimant KPC-2 provenant de patients hospitalisés auparavant en Grèce et aux États-Unis. Deux épidémies de souche

K. pneumoniae ont été identifiées dans plusieurs hôpitaux parisiens (Barbier *et al.*, 2010 ; Naas *et al.*, 2010), l'origine de l'épidémie était liée, dans l'un des cas, à une contamination par un endoscope gastrique (Naas *et al.*, 2010).

D'un point de vue clinique, les souches *K. pneumoniae* KPC sont associées à des infections qui n'ont pas de spécificité en ce qui concerne la nature des infections ou leur terrain de survenue (Nordmann *et al.*, 2009; Carmeli *et al.*, 2010). Cependant, la mortalité liée à ces infections est élevée (38-57 % en Israël et aux USA), du fait de la multi résistance des souches, (Nordmann *et al.*, 2009; Carmeli *et al.*, 2010). En Grèce, cette mortalité est rapportée comme plus faible (22-28 %) (Carmeli *et al.*, 2010). Des études ont montré la diffusion de ce déterminant de résistance dans les infections de patients de soins de suite et de réadaptation (Endimiani *et al.*, 2009).

3-1-2-Bêta-lactamases de classe B :

Les enzymes de type VIM et IMP sont également très répandues (**Queenan et Bush, 2007 ; Poirel et al., 2007 ; Walsh, 2008**). Leur hôte le plus habituel est *K. pneumoniae* avec des niveaux d'expression de la résistance aux carbapénèmes variables. Plusieurs épidémies de souches d'entérobactéries MBL ont été identifiées, notamment au Japon, en Italie, en Espagne et en Grèce (**Souli et al., 2008 ; Carmeli et al., 2010 ; Miriagou et al., 2010**).

Les sites d'isolement de ces souches sont variables : urines, sang et sécrétions bronchiques majoritairement. L'Europe du Sud contribue fortement à la diffusion de ces marqueurs de résistance (VIM-1 notamment) (**Giamarellou et Poulakou, 2009**).

En Grèce, la proportion de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes a augmenté considérablement passant de < 1 % en 2001 à 20 % dans les unités classiques d'hospitalisation, à 50 % dans les unités de soins intensifs en 2006. Des souches VIM ont été trouvées dans 3 hôpitaux en 2002 puis dans 40 hôpitaux en 2006 en Grèce (**Giamarellou et Poulakou, 2009**).

L'identification de VIM-1 chez *P. mirabilis*, en Grèce, indique une transmission communautaire de ce déterminant de résistance (**Giamarellou et Poulakou, 2009**).

NDM-1 est l'une des MBL les plus récemment décrites (**Yong et al., 2009**). Elle aurait déjà une diffusion internationale importante, identifiée au moins en Inde, au Pakistan et en Grande-Bretagne chez *K. pneumoniae* et *E. coli* en milieu hospitalier et également en milieu communautaire (**Livermore D et Walsh T, données personnelles**).

La prescription de bêta-lactamines ou de quinolones est un facteur de risque d'acquisition de ces souches MBL (**Carmeli et al., 2010**).

3-1-3-Bêta-lactamases de classe D :

Les conséquences cliniques d'OXA-48 sont par contre maintenant bien établies avec sa diffusion chez *K. pneumoniae* dans de nombreux hôpitaux en Turquie et dans de nombreux pays du pourtour méditerranéen (Liban, Tunisie, Israël, Égypte, France) en Grande-Bretagne, en Inde et en Argentine. En Turquie, plusieurs épidémies d'infections nosocomiales sont associées à ce type des souches. L'analyse des patients infectés ne fait pas apparaître de caractéristiques cliniques particulières (**Aktas et al., 2008 ; Carrër et al., 2010**).

3-2-Epidémiologie en Algérie :

Les premières NDM-1 en Algérie ont été identifiées chez des souches d'*A.baumannii* isolées chez des patients algériens transférés en France (**Boulangier et al., 2012**) et en Belgique (**Bogaerts et al., 2012**). Une autre étude a récemment rapporté la présence de ce gène chez des souches d'*A.baumannii* à l'ouest de l'Algérie (**Mesli et al., 2013**).

La résistance aux Carbapénèmes chez *A. baumannii* est également souvent liée à la production de carbapénémase de classe D. La première oxacillinase OXA-23 (ARI-1) a été observée dès 1985, publiée en 1993 et a diffusé dans le monde entier avant même l'utilisation des carbapénèmes (**Paton et al., 1993**).

Depuis, 4 groupes d'oxacillinases ont été identifiés chez *A. baumannii* (OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like et OXA-51-like) (**Heritier et al., 2005**). Dans les groupes OXA-23 et OXA-58-like, différentes séquences d'insertion présentes à l'extrémité 50 et/ou 30 (ISAb1, ISAb3 ou IS18) régulent l'expression des enzymes (**Decré, 2012**).

En Algérie, OXA-58 flanquée à ces deux extrémités par la séquence d'insertion ISAb3 a été décrite pour la première fois en 2010 à Tlemcen (**Drissi et al., 2010**). Depuis, plusieurs études ont rapporté la présence de ces gènes OXA-23, OXA-24, OXA-58 et OXA-72 dans le nord du pays (**Bakour et al., 2012 ; Kempf et al., 2012**.) OXA-23 est la carbapénémase la plus répandue et semble être endémique en Algérie (**Mugnier et al., 2010**).

Chez les entérobactéries OXA-48 n'a pas été décrite en Algérie, mais Poirel et al suggèrent que cette enzyme est endémique dans ce pays, suite aux observations positives effectuées chez les patients transférés de l'Algérie (**Poirel et al., 2012**).

Chapitre 02
Matériel et méthodes

I. Matériel

1- Appareillages :

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

2- Verrerie et outils :

- ✓ Bêchers (1000 ml, 500 ml).
- ✓ Flacons stériles 250 ml.
- ✓ Lames.
- ✓ Pipettes graduées 20 ml, 10 ml, 1 ml.
- ✓ Pipettes Pasteur.
- ✓ Tubes à essai.
- ✓ Mortier.
- ✓ Spatules.
- ✓ Bec Bunsen.
- ✓ Anse de platine.
- ✓ Boîtes de Pétri.
- ✓ Ecouvillons.
- ✓ Pince.
- ✓ Portoirs.
- ✓ Micropipettes 1000 µl, 200 µl.
- ✓ Tubes Eppendorf de 1.5 ml.
- ✓ Cônes.

3-Réactifs et autres produits :

- ✓ Colorants de Gram (Violet de Gentiane, Lugol, Fuschine).
- ✓ Ethanol 95%.
- ✓ Disques d'antibiotiques (imipénème et ertapénème).
- ✓ Eau distillée stérile.
- ✓ Eau physiologique stérile.
- ✓ Huile à immersion.
- ✓ Huile de vaseline stérile.
- ✓ Réactif de Kovacs.
- ✓ Réactif TDA (tryptophane désaminase).
- ✓ Réactifs VP1 et VP2 (Voges-Proskauer).
- ✓ Réactifs NR1 et NR2 (nitrate réductase).
- ✓ Poudre de zinc.

4-Milieus de culture :

- ✓ Bouillon nutritif (BN).
- ✓ Gélose Mac Conkey (MC).
- ✓ Gélose nutritive (GN).
- ✓ Gélose Mueller-Hinton (MH).

5-Produits et solutions chimiques pour la réalisation du test Carba NP :

- ✓ Rouge de phénol en poudre.
- ✓ Sulfate de zinc heptahydraté ($ZnSO_4, 7 H_2O$) en poudre ;
- ✓ Imipénème + Cilastatine (poudre pour solution injectable : antibiotique à usage hospitalier) ;
- ✓ Tris (hydroxyméthyl) aminométhane chlorhydrate (Tris HCl) en poudre.
- ✓ Solution hydroxyde de sodium (NaOH) 0,1 N.

II. Méthodes

1-Prélèvement :

Notre travail pratique a été effectué au niveau du laboratoire de microbiologie, département de biologie appliquée, faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, durant une période de 03 mois : du 5 février au 3 mai 2018. Il porte sur neuf échantillons de viande de volailles, prélevées à partir de différentes boucheries de la ville de Tébessa.

Le calendrier des différents échantillons est présenté dans le **tableau02**.

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

N° de l'échantillon	Date de prélèvement	Site de prélèvement
01	11/ 02/ 2018	Djebel jorf
02	18/ 02/ 2018	Le grand marché
03	19/ 02/ 2018	El wiame
04	25/ 02/ 2018	Djebel jorf
05	25/ 02/ 2018	Skanska
06	04/ 03/ 2018	Djebel jorf
07	04/ 03/ 2018	Le grand marché
08	05/ 03/ 2018	Djebel jorf
09	05/ 03/ 2018	Djebel jorf

Un échantillon de 100 g du blanc de poulet, a été prélevé, aseptiquement, dans un sac plastique, stérile, ligaturé (**Figure 07**), puis transporté au laboratoire, dans un délai ne dépassant pas deux heures.



Figure 07 : Echantillon de viande de volaille dans un sac ligaturé.

2-Préparation de la suspension mère :

- Peser aseptiquement (près du bec Bunsen) 25 g de viande (en découpant avec un couteau stérile) dans une boîte de Pétri stérile, et les transférer dans un mortier stérile.
- Broyer à sec la viande, puis ajouter progressivement 225ml de bouillon nutritif, en poursuivant le broyage jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (**Figure 08**).
- Laisser le broyat reposer pendant 15 à 45 minutes à température ambiante dans des conditions stériles.



Figure 08: Préparation de la suspension mère.

Remarque : vu le manque du tryptone- sel au niveau du laboratoire, on a utilisé le bouillon nutritif.

3-Préparation des dilutions décimales :

- Répartir stérilement le BN 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-Ensemencement et incubation :

- Prélever à l'aide d'une micropipette 0,1 ml de la suspension mère et de ses dilutions et les déposer à la surface du milieu Mac Conkey, à raison de deux boîtes par dilution.
- Etaler à l'aide d'une pipette Pasteur repliée en râteau, sur toute la surface de la gélose, en allant de la dernière dilution à la première dilution (10^{-4} jusqu'à 10^{-1}).
- Laisser reposer sur paillasse pendant 20 minutes (couvercle en haut).
- Incuber pendant 24 à 48 h à 37 °C, (couvercle en bas) jusqu'à l'apparition des colonies.

5-Isolement et purification :

Après incubation, faire l'examen macroscopique (description de la forme, la taille, l'aspect des colonies et le couleur) et l'examen microscopique (coloration de Gram) des colonies. Retenir seulement les colonies qui présentent des bacilles à Gram négatif. Poursuivre la purification des isolats à partir des mêmes colonies examinées : chaque colonie est repiquée sur le milieu MC, en faisant des stries éloignées par l'anse de platine ou par pipette Pasteur (méthode des quadrants). Après incubation pendant 24h à 37 °C, faire la coloration de Gram et vérifier si les colonies présentent les mêmes aspects macroscopique et microscopique présentés dans le premier isolement. Dans ce cas, procéder à la conservation sur GN inclinée.

6-Conservation :

La conservation se fait par repiquage à partir des isolats purs sur GN inclinée, en faisant des stries serrées. Après incubation pendant 24h à 37°C, conserver au réfrigérateur ou à température ambiante en position verticale (**Figure 09**) en notant le numéro d'isolat et la date de conservation.

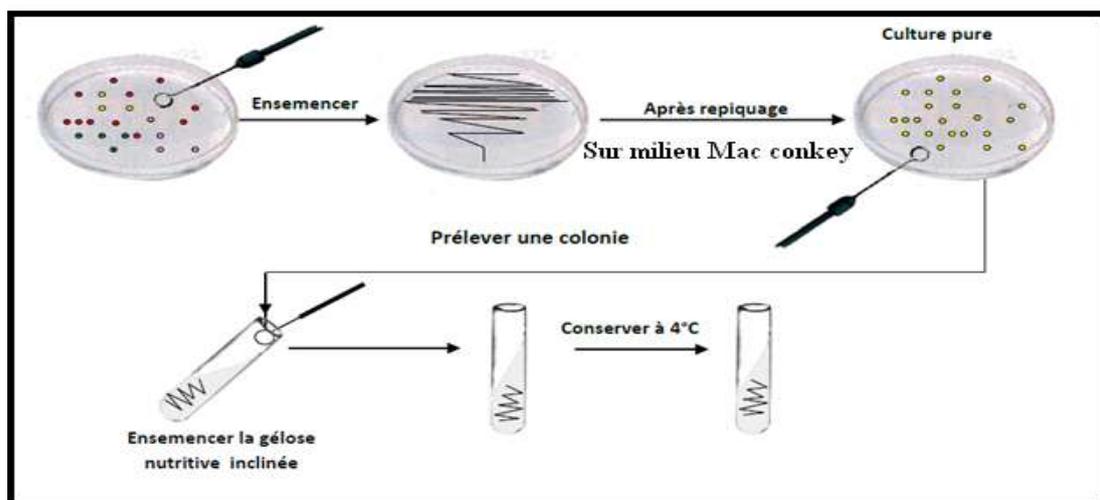


Figure 09: Technique de purification et de conservation (Marchal *et al.*, 1982).

7- Identification biochimique par la galerie Api 20E :

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

7-1- Principe et description :

L'API 20 E est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries et autres BGN non fastidieux, comportant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La galerie est commercialisée dans des boîtes stériles, elle comporte 20 microtubes (**Figure 10**) contenant des substrats sous forme déshydratée, chaque microtube est partagé en deux parties : le tubule (en bas) et la cupule (en haut).

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 des réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (**Bio Mérieux SA**).



Figure 10 : Photo d'une galerie API 20^E.

7-2- Mode opératoire :

➤ Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation (**Bio Mérieux SA**).

➤ Préparation de l'inoculum :

Préparer une suspension bactérienne dans 5 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h sur GN.

➤ **Inoculation 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 (**Bio Mériex SA**).

7-3-Lecture de la galerie :

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (**Tableau 03**).
- Si trois 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 une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - **Test IND** : ajouter une 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 une goutte de réactif VP1 et VP2. 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.

Note : 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 (**Bio Mériex SA**).

Tableau 03 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20^E

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	Rouge/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 rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'indole	James/ immédiat	
			Incolore/ vert pâle-jaune	Rose
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2/ 10mn	
			Incolore	Rose/ 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	Potassium nitrate	Production de NO ₂	NIT1 + NIT2 / 2-3 mn	
			Jaune	Rouge
GLU		Réduction au stade N ₂	Zinc / 5mn	
			Rouge/orangé	Jaune

VP: Réaction de Voges-Proskauer. **H2S:** recherche d'un thiosulfate réductase.

7-4- Interprétation :

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

8-Etude de la sensibilité aux carbapénèmes :

L'étude de la sensibilité aux carbapénèmes (l'imipénème et l'ertapénème), est réalisée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques).

a) Principe :

La méthode des disques consiste à déposer à la surface de la gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencée 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 (**Delarras, 1998**).

b) Milieu utilisé :

On utilise un milieu non sélectif Mueller-Hinton, il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm, les boîtes doivent être séchées avant leur emploi (**Mendaci et Mihoubi, 2015**).

c) Technique :**➤ Préparation de l'inoculum**

Préparer une suspension bactérienne (à partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures), prélever au moins 03 colonies et émulsionner dans 05 ml d'eau physiologique stérile. Bien homogénéiser la suspension bactérienne (**CA-SFM, 1998**).

➤ 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 MH, 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 (CA-SFM, 1998).

➤ 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. Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas (CA-SFM, 1998).

b) 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 par CA-SFM (2018). 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) (CA-SFM, 1998).

Tableau 04 : Diamètres critiques des zones d'inhibition correspondant aux Carbapénèmes utilisées (CA-SFM 2018).

Antibiotique	Sigle	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
			d	D
Ertapénème	ETP	10 µg	22	25
Imipénème	IMI/IPM	10 µg	16	22

9-Détection des carbapénèmases par le test Carba NP (Carba Nordmann-Poirel) :

a) Principe :

Le Carba NP test est une méthode biochimique de détection des carbapénèmases développée par Nordmann et son équipe. Ce test met en évidence l'acidification du milieu grâce à un indicateur coloré lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénèmase. L'indicateur coloré, le rouge de phénol, vire au jaune lors de l'hydrolyse de l'imipénème par production d'acide et donc diminution du pH (**Figure 11**).

Le Carba NP test a été évalué au Centre national de référence (CNR) à partir de plus de 4000 souches de sensibilité diminuée aux carbapénèmes. Il présente de très bonnes sensibilité et spécificité (100%), c'est un test rapide et peu onéreux dont la mise en place peut se faire dans tout laboratoire de microbiologie (**Dortet *et al.*, 2013**).

Ce test est actuellement recommandé en première ligne pour le dépistage de l'activité carbapénémase par le CLSI (Clinical & laboratory standards institute) aux États-Unis (**Decousser *et al.*, 2017**).

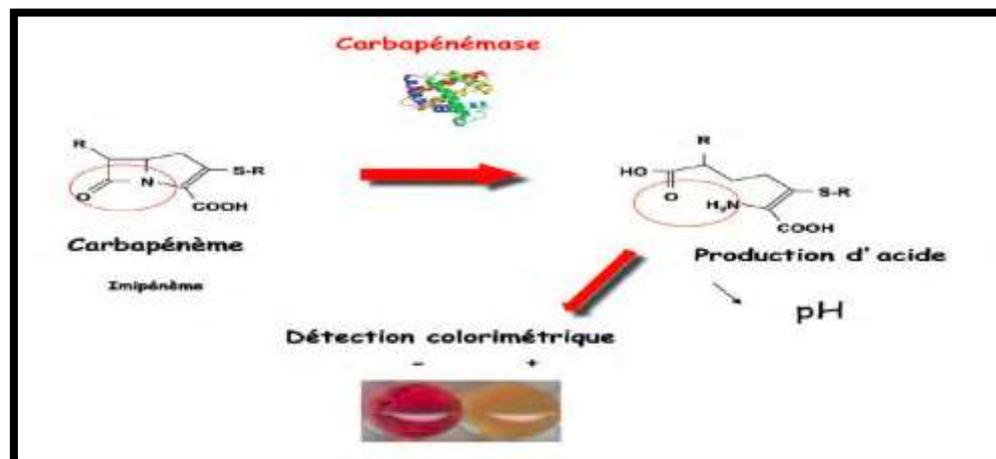


Figure 11 : Principe du Carba NP test (Nordmann *et al.*, 2014).

b) Préparation de la solution A :

La solution A (solution contenant l'indicateur de pH) est préparée comme suit :

- Préparer une solution concentrée de rouge de phénol 0.5% poids/volume.
- Mélanger 2ml de la solution concentrée de rouge de phénol dans 16.6ml d'eau distillée.
- Ajuster le pH à 7.8 en ajoutant, goutte à goutte d'une solution de NaOH (1 N).
- Ajouter 180 µl d'une solution de ZnSO₄ 10 mM pour obtenir une concentration finale de ZnSO₄ à 0.1 mM.

La Solution A est stable à température ambiante pendant 1 semaine et peut être conservée pendant plusieurs mois à -20°C. La solution A + imipénème (6 mg/ml) doit impérativement être préparée extemporanément.

c) Protocole :

- Ajouter 100 µl du tampon de lyse Tris-HCl 20 mM dans 2 tubes Eppendorf de 1.5 ml.
- Bien resuspendre une 1/2 öse calibrée (10 µl) de colonies bactériennes dans chacun des deux tubes contenant le tampon de lyse (les colonies bactériennes peuvent être obtenues directement à partir d'un antibiogramme prélevées autour du disque de Carbapénème).
- Vérifier que les bactéries ont bien été remises en suspension. Si nécessaire, mélanger par Pipetage (de haut en bas) ou par vortex pour bien dissocier les colonies bactériennes dans le tampon de lyse.
- Pour chaque souche à tester, ajouter (i) 100 µl de Solution A dans le premier tube eppendorff puis (ii) 100 µl de Solution A + imipénème 6 mg/ml dans le second tube eppendorff.
- Incuber à 37°C pendant un maximum de 2 h.
- Lecture visuelle de la couleur de chaque tube (**CNR**).

d) Interprétation :

Tableau 05 : Interprétation des résultats du Carba NP Test (CNR).

Tube 1 (sans imipénème)	Tube 2 (plus imipénème)	Interprétation
Rouge	Rouge	Pas de carbapénèmases
Rouge	Orange/Jaune	Carbapénèmases
Jaune	Jaune	Non interprétable

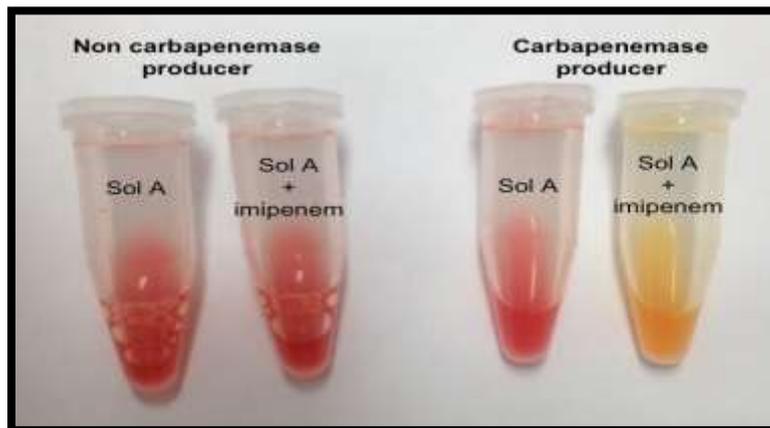


Figure 12 : Les résultats de Carba NP test (CNR).

Résultat positif à droite et résultat négatif à gauche

10-Détection des carbapénèmases par le test de Hodge modifié :

Un autre test phénotypique anciennement recommandé par le CLSI est le Hodge test modifié (Lee *et al.*, 2001) : il permet, de façon non spécifique, de détecter la production d'une carbapénémase épidémique sans préjuger de la classe d'Amblar. Malgré des avantages certains (peu coûteux, bonne détection des souches productrices de carbapénèmases de type OXA-48 et KPC), ce test présente de nombreux inconvénients : faux négatifs avec des souches produisant une NDM ; nombreux faux positifs essentiellement pour *Enterobacter spp.* Sur exprimant leur céphalosporinase naturelle ; et délai de rendu long (24 h à 48 h après obtention de l'antibiogramme) incompatible avec une identification rapide des carbapénèmases (Dortet et Cuzon, 2015).

a) Principe :

Ce test est basé sur la déformation de la zone d'inhibition d'une souche sensible aux carbapénèmes grâce à la présence d'une souche productrice d'une carbapénémase.

b) Technique :

- ensemencer une souche d'*E. Coli* ATCC 25922 sauvage en culture confluite sur une gélose MH.
- déposer au centre de la boîte un disque de carbapénème (imipénème dans notre travail)
- ensemencer la souche à tester par une strie partant du disque d'antibiotique jusqu'au bord de la boîte (Girlich *et al.*, 2011).

c) Lecture :

Après incubation pendant 18h à 37°C, la présence d'une carbapénémase est révélée par une déformation de la zone d'inhibition due à l'activité enzymatique autour du disque d'antibiotique proche de la souche suspecte (**Figure**) (**Girlich *et al.* , 2011**).

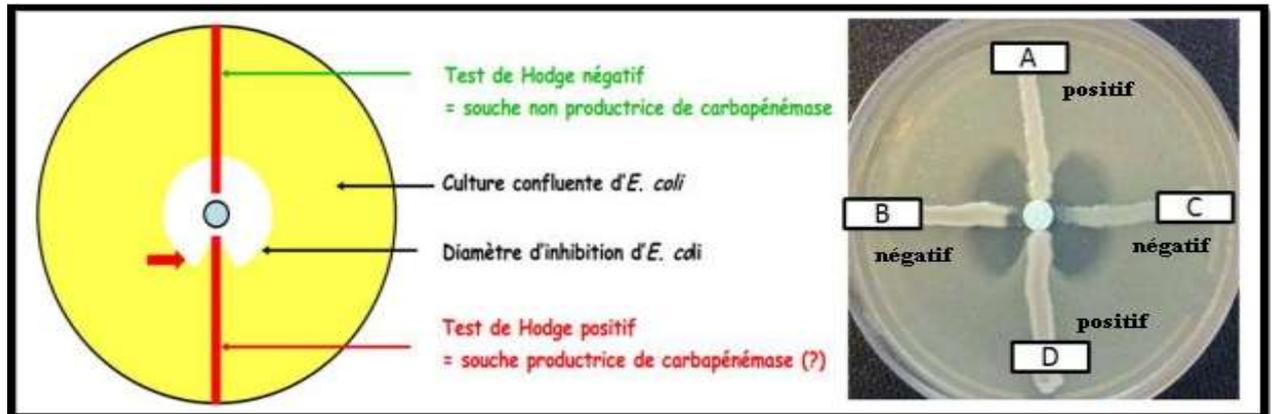


Figure 13 : Principe du test de Hodge modifié (Riethmuller, 2013)

Chapitre 03

Résultats et discussion

1-Examen macroscopique

Les principaux aspects macroscopiques des isolats obtenus sur Mac conkey sont présentés dans les **figures 14** : des colonies roses (**a et d**), des colonies blanchâtres (**b**), des colonies rouges (**c et f**) des colonies transparentes (**e**).



(a) : isolat 56



(b) : isolat 41



(c) : isolat 20



(d) : isolat 30



(e) : isolat 46

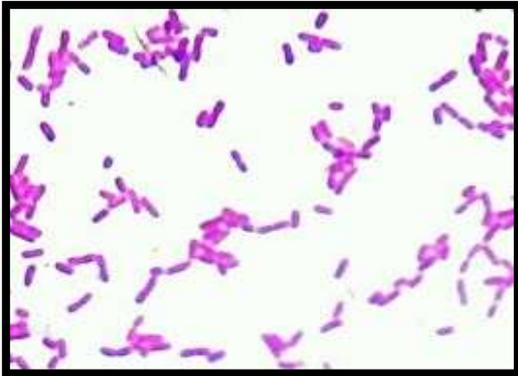
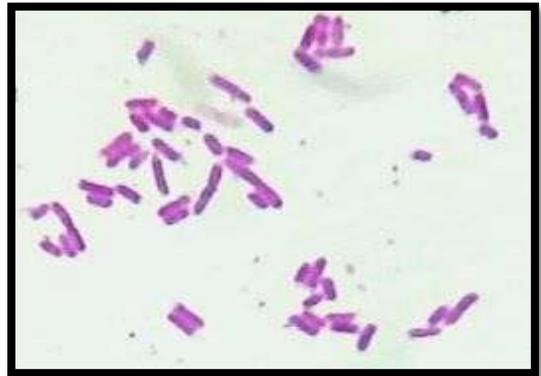
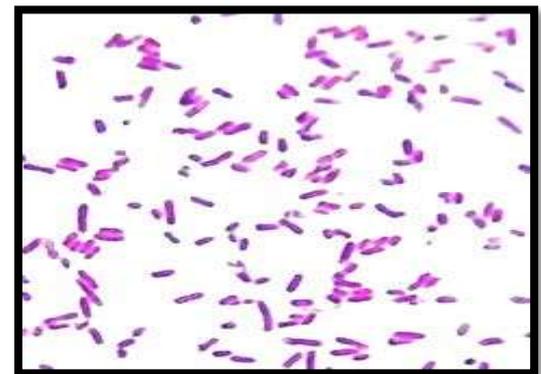


(f) : isolat 38

Figure 14 : Principaux aspects macroscopiques sur Mac Conkey.

2-Examen microscopique :

Cette étape a permis d'observer des BGN droits, courts ou moyens, épais ou fins, isolés ou regroupés en paires, ou en chaînettes de longueur variable, ou bien des coccobacilles isolés ou regroupés en paires.

**(a) : isolat 56****(b) : isolat 59****(c) : isolat 45****(d) : isolat 11****(e) : isolat 7****(f) : isolat 36****Figure 15 : Principaux aspects microscopiques observés après coloration de Gram.**

La purification basée sur les examens macroscopiques et microscopiques nous a permis d'obtenir 75 isolats de BGN.

3-Identification biochimique :

Tous les isolats de BGN ont été identifiés, les résultats des différents tests d'identification réalisés sont présentés dans le **tableau C (voir annexe)**. Et le **tableau 06** présente les résultats de l'identification réalisée.

Tableau 06 : Résultats de l'identification par l'Api 20E

Isolat	Espèce bactérienne	Isolat	Espèce bactérienne
S1	<i>Salmonella arizonae</i>	S39	<i>Serratia odorifera</i> 1
S2	<i>Salmonella arizonae</i>	S40	<i>Serratia odorifera</i> 1
S3	<i>Salmonella arizonae</i>	S41	<i>Serratia odorifera</i> 1
S4	<i>Salmonella arizonae</i>	S42	<i>Serratia odorifera</i> 1
S5	<i>Salmonella arizonae</i>	S43	<i>Serratia odorifera</i> 1
S6	<i>Serratia odorifera</i> 1	S44	<i>Serratia fonticola</i>
S7	<i>Serratia odorifera</i> 1	S45	<i>Citrobacter koseri /farmeri</i>
S8	<i>Serratia odorifera</i> 1	S46	<i>Serratia odorifera</i> 1
S9	<i>Serratia odorifera</i> 1	S47	<i>Serratia odorifera</i> 1
S10	<i>Serratia odorifera</i> 1	S48	<i>Serratia odorifera</i> 1
S11	<i>Kluyvera</i> spp	S49	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
S12	<i>Kluyvera</i> spp	S50	<i>Serratia odorifera</i> 1
S13	<i>Escherichia coli</i>	S51	<i>Escherichia coli</i> 1
S14	<i>Serratia odorifera</i> 1	S52	<i>Enterobacter cloacae</i>
S15	<i>Escherichia coli</i> 1	S53	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
S16	<i>Serratia odorifera</i> 1	S54	<i>Escherichia coli</i> 1
S17	<i>Escherichia coli</i> 1	S55	<i>Escherichia coli</i> 1
S18	<i>Kluyvera</i> spp	S56	<i>Serratia odorifera</i> 1
S19	<i>Kluyvera</i> spp	S57	<i>Serratia odorifera</i> 1
S20	<i>Serratia odorifera</i> 1	S58	<i>Serratia odorifera</i> 1
S21	<i>Kluyvera</i> spp	S59	<i>Enterobacter sakazakii</i>
S22	<i>Serratia odorifera</i> 1	S60	<i>Serratia odorifera</i> 1
S23	<i>Escherichia coli</i> 1	S61	<i>Serratia odorifera</i> 1
S24	<i>Citrobacter freundii</i>	S62	<i>Serratia odorifera</i> 1
S25	<i>Escherichia coli</i> 1	S63	<i>Serratia odorifera</i> 1
S26	<i>Kluyvera</i> spp	S64	<i>Serratia odorifera</i> 1
S27	<i>Salmonella arizonae</i>	S65	<i>Serratia odorifera</i> 1
S28	<i>Serratia odorifera</i> 1	S66	<i>Serratia odorifera</i> 1
S29	<i>Kluyvera</i> spp	S67	<i>Citrobacter freundii</i>
S30	<i>Serratia odorifera</i> 1	S68	<i>Escherichia coli</i> 1
S31	<i>Serratia odorifera</i> 1	S69	<i>Serratia odorifera</i> 1
S32	<i>Serratia odorifera</i> 1	S70	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
S33	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	S71	<i>Serratia odorifera</i> 1
S34	<i>Kluyvera</i> spp	S72	<i>Serratia odorifera</i> 1
S35	<i>Kluyvera</i> spp	S73	<i>Escherichia coli</i> 1
S36	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	S74	<i>Escherichia coli</i> 1
S37	<i>Serratia odorifera</i> 1	S75	<i>Serratia odorifera</i> 1
S38	<i>Kluyvera</i> spp		

Quelques exemples d'API 20^E de différentes souches, sont présentés dans les figures 16 à 24.



Figure 16 : Photographie de l'Api 20E de la souche 40 (*Serratia odorifera* 1).



Figure 17 : Photographie de l'Api 20E de la souche 15 (*Escherichia coli* 01).



Figure 18 : Photographie de l'Api 20E de la souche 11 (*Kluyvera* spp).

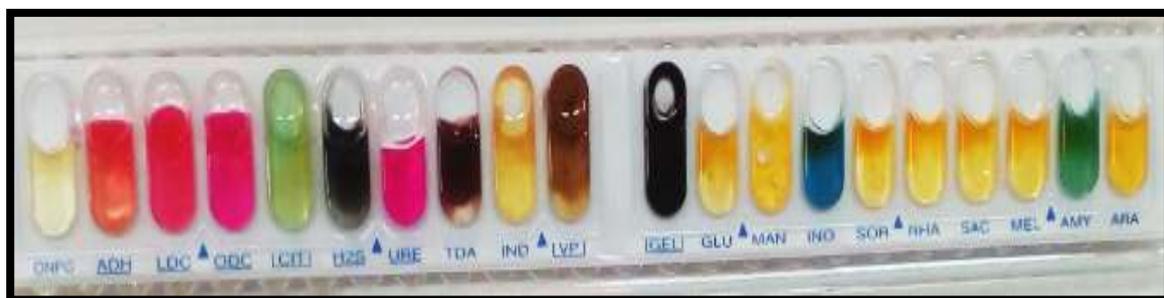


Figure 19 : Photographie de l'Api 20E de la souche 03 (*Salmonella arizonae*).



Figure 20: Photographie de l'Api 20E de la souche 53 (*Klebsiella ornithinolytica*).



Figure 21: Photographie de l'Api 20E de la souche 24 (*Citrobacter freundii*).



Figure 22: Photographie de l'Api 20E de la souche 45 (*Citrobacter koseri/farmeri*).



Figure 23: Photographie de l'Api 20E de la souche 58 (*Enterobacter sakazakii*).



Figure 24 : Photographie de l'Api 20E de la souche 51 (*Enterobacter cloacae*).

4-Répartition des souches selon les genres :

Les résultats ont montré que les souches appartiennent à 7 genres différents dont *Serratia* domine avec un pourcentage de 50.67 % (Figure 25). *Escherichia* occupe la deuxième position avec une fréquence égale 14.67 %, puis *Kluyvera* avec un pourcentage de 13.33 % tandis que les genres *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter* et *Enterobacter* ont présenté les taux les plus faibles : 08%, 6,67%, 4%, 2,67% respectivement.

Les genres auxquels appartiennent les souches isolées dans notre étude sont les mêmes rapportés dans une autre étude (Yulistiani *et al.*, 2017) sur la prévalence des Entérobactéries résistantes aux antibiotiques dans la viande de poulet, mais avec des pourcentages différents.

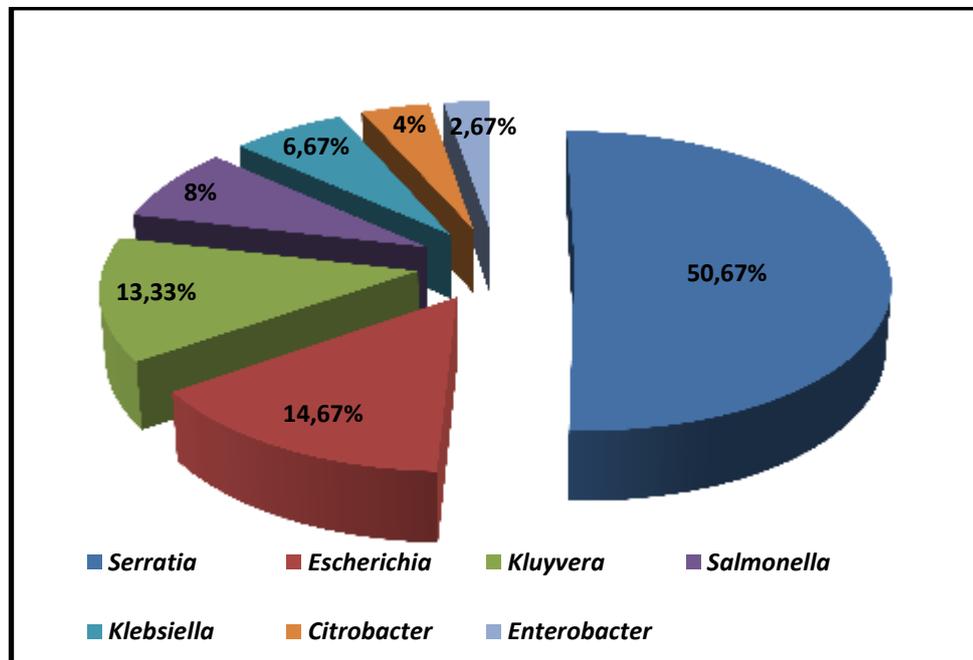


Figure 25 : Répartition des souches en fonction des genres.

5-Répartition des souches selon les espèces :

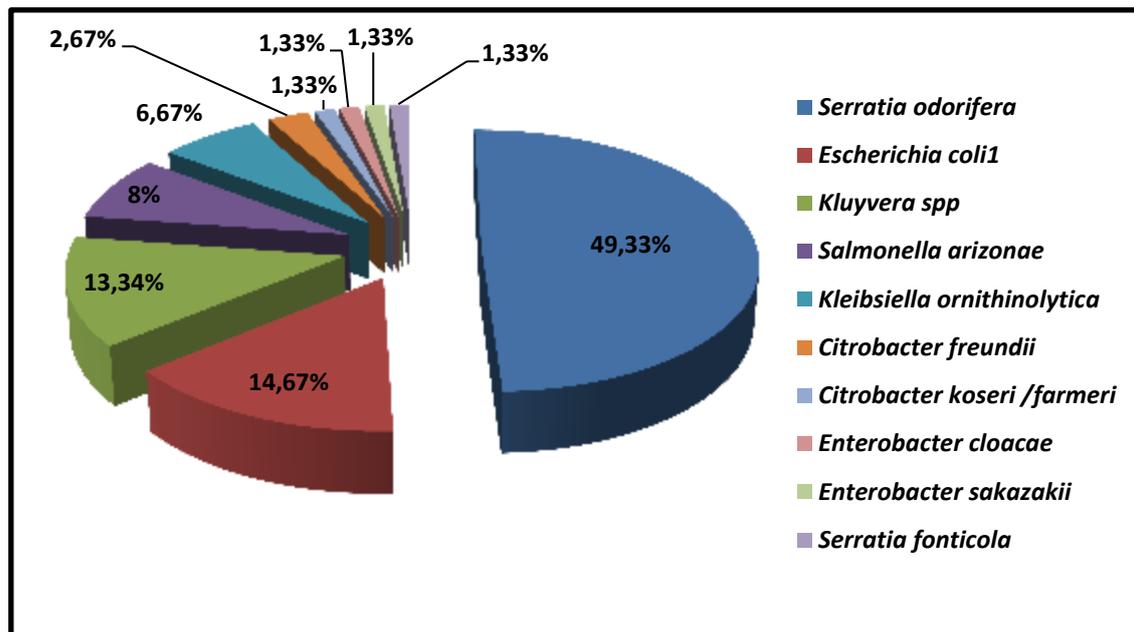


Figure 26 : Répartition des souches en fonction des espèces.

D'après la figure 26, on remarque que les souches appartiennent à 10 espèces différentes, l'espèce la plus fréquente étant *Serratia odorifera* 1 (49,33%), suivie par l'espèce *Escherichia coli* 01 avec une fréquence de 14.67%.

Kluyvera spp vient en troisième position avec une fréquence de 13.34%, puis *Salmonella arizonae* et *Klebsiella ornithinolytica* présentant 08% et 6,67% respectivement. Les autres espèces ont présenté des pourcentages faibles.

Les espèces trouvées dans notre étude peuvent avoir deux origines : origine endogène (l'animal, principalement à partir du tube digestif) ou origine exogène (manipulateur, matériel, environnement). Concernant leur pouvoir pathogène, certaines peuvent être incriminées dans des infections d'origine alimentaire plus ou moins graves selon l'agent responsable.

➤ **Serratia** : les espèces du genre *Serratia* sont représentées par *Serratia odorifera* et *Serratia fonticola* qui peuvent être isolées des plantes (légumes, champignons, mousses) du tube digestif des rongeurs et les petits mammifères sauvages, des insectes, de l'eau et de sol.

Des cas d'infections authentiques à *Serratia odorifera* ont été décrits chez des individus souffrant de pancréatites ou de diverses maladies chroniques. *Serratia fonticola* est

rarement mise en évidence dans les sécrétions bronchiques, les selles, le pus sans que son pouvoir pathogène soit démontré (**Benmesmoudi, 2015**).

➤ **Citrobacter** : ce genre est représenté par *Citrobacter freundii* et *Citrobacter koseri* qui sont fréquemment trouvées dans l'eau, le sol, la nourriture, et les intestins des animaux et des humains (**Benmesmoudi, 2015**). Les *Citrobacter* sont des agents pathogènes nosocomiaux opportunistes rares et peuvent persister dans la population hôte pour de longues périodes.

➤ **Salmonella** : il est représenté par *Salmonella arizonae*. La présence de *Salmonella* dans la viande de volaille indique que la contamination peut se produire pendant le processus d'abattage ou d'éviscération. Elles peuvent causer les toxi-infections d'origine alimentaire et constituent la cause la plus fréquente de maladies intestinales chez l'homme dans la plupart des pays (**Hamadou et al., 2017 ; Chaiba et al., 2017**).

➤ **E. coli** : les *E. coli* sont des entérobactéries considérées comme des hôtes normaux du tube digestif de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud, leur présence est un indicateur de contamination fécale (**Fofana, 2004**) et qui correspond à un défaut de la technique d'abattage, ou une contamination croisée, mais peut également être due à une contamination par les personnes manipulant les denrées alimentaires. Ces bactéries sont responsables d'infections digestives ou extra-digestives (**Ghafir et Daube, 2007**).

➤ **Kluyvera** : c'est une bactérie largement répandue dans l'environnement humide (eaux de boisson, eaux usées, sol, aliments, évier d'hôpital. . .) (**Bellaoui et al., 2008**). La plupart des infections à *Kluyvera spp* rapportées sont sporadiques et être à l'origine d'épidémie (**Thelea et al., 2017**) et des infections nosocomiales sévères : infections des voies urinaires, abcès intra-abdominales associées au cathéter, bactériémie et choc septique. Semblable à d'autres entreobacteriaceae, *Kluyvera spp* ont été impliqués dans des infections opportunistes chez les patients immunodéprimés (**Thelea et al., 2017**).

➤ **Enterobacter** : le genre *Enterobacter* est présenté par deux espèces : *Enterobacter sakazakii* et *Enterobacter cloacae*. Cette dernière est commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux, pouvant être rencontrée dans le sol et les eaux d'égouts. Certaines souches peuvent être responsables d'infections. C'est une cause rare mais connue de septicémie néonatale et d'une forme de méningite à évolution grave provoquant une mortalité de 10 à 80 % des infections nosocomiales (**Ghafir et Daube, 2007**).

➤ *Klebsiella ornithinolytica* : bactérie saprophyte isolée de l'homme, de l'eau, des plantes et du sol, naturellement présente sur la peau, les muqueuses et le tube digestif de l'homme. Les sources de contamination par cette bactérie sont : les muqueuses, la peau, les selles, l'eau, les mains et les objets contaminés (**Ghafir et Daube, 2007**).

Des enquêtes menées aux différents points de la filière de production (couvoirs, élevages, moyens de transport, chaînes d'abattage, ateliers de transformation...) ont permis de mettre l'accent sur le rôle possible des différentes étapes sur la contamination finale (**Lahellec, 1988**). Ainsi, les couvoirs peuvent devenir des sources de contamination si les conditions d'hygiène sont défectueuses dans les éclosiers et dans les incubateurs. En plus, les élevages sont des sites privilégiés d'inter contamination lorsque plusieurs paramètres peuvent apparaître potentiellement favorables (salmonelles résidentes, vecteurs animés, aliment, ...) (**Colin, 1988**).

Enfin les opérations ultérieures d'abattage et de transformation constituent aussi des étapes à risque pour l'introduction ou la diffusion des germes, notamment ceux résistants aux antibiotiques (**Lahellec, 1988 ; Cardinale et al ., 2000**).

6-Sensibilité des souches aux carbapénèmes :

Les résultats de test de sensibilité aux deux carbapénèmes : imipénème et ertapénème, ont permis de répartir les souches dans les trois catégories R, S, et I selon les pourcentages indiqués dans la **Figure 27**. Le comportement des 75 souches isolées vis-à-vis des carbapénèmes est présenté dans le **tableau D (Voir annexe 04)**.

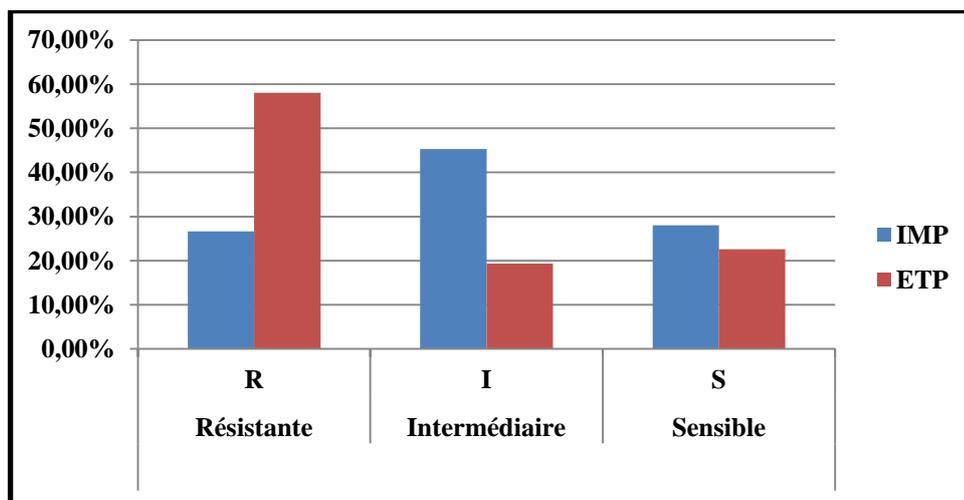


Figure 27 : Histogramme représentatif de la sensibilité aux carbapénèmes des souches isolées

NB : Parmi 75 souches, seulement 62 souches ont été testées à l’ertapénème vu le manque des disques d’antibiotique.

La figure 27 montre que les souches étudiées dans notre travail, expriment un taux de résistance élevé à l’ertapénème (**58,06 %**) et un taux de résistance modéré à l’imipénème (**26,67 %**). Ceci peut être expliqué par la capacité évidente des entérobactéries d’acquérir et d’échanger des gènes porteurs de facteurs de résistance et beaucoup des membres les plus importants de cette famille sont devenus de plus en plus résistants aux antibiotiques actuellement disponibles (**Yulistiani et al., 2017**).

Tableau 07 : Pourcentage de résistance aux carbapénèmes selon le genre

	<i>Escherichia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>
Effectif (%) des résistants à l’IMI	2 (18,18%)	4 (66,67%)	1 (33,33%)	10 (26,31%)	2 (20%)	0 (00%)	0 (00%)
Effectif (%) des résistants à l’ETP	6 (75%)	5 (83,33%)	1 (33,33%)	18 (58,06%)	5 (50%)	0 (00%)	2 (50%)

Dans la présente étude, les souches de *Citrobacter* ont présenté un taux de résistance égale à **33,33%** à l’imipénème (Tableau 09). Cette valeur est inférieure à celle rapportée par (**Shrestha et al., 2017**) qui était **32,6%**.

Concernant les souches des *Escherichia*, elles ont présenté une résistance à l’imipénème de **18,18%** et de **75%** pour l’ertapénème. Ces résultats diffèrent de ceux rapportés dans deux études similaires (**Shrestha et al., 2017; Randall et al., 2017**) où des souches isolées à partir de viande de poulet n’ont présenté aucune résistance aux carbapénèmes. Une autre étude sur les *E. coli* productrices de BLSE isolées chez les volailles vendues au détail (**Egea et al., 2012**) a montré la sensibilité totale des souches vis-à-vis au carbapénèmes.

Pour les souches de *Salmonella* qui présente une résistance de **66,67%** à l’imipénème et de **83,33%** à l’ertapénème. Ces résultats diffèrent de ceux rapportés par (**Shrestha et al., 2017**) dont aucune souche n’a présenté une résistance à l’imipénème.

D’après le tableau 09, on remarque que *Salmonella*, *Escherichia* et *Serratia* présentent les taux de résistance les plus élevés aux carbapénèmes. Ceci est possible en raison de *Salmonella* et *E. coli* sont les deux espèces dominantes de bactéries trouvées dans la

viande de poulet, ainsi les bactéries sont les plus exposées aux antibiotiques et peuvent survivre avoir la plus haute résistance (Yulistiani *et al.* , 2017) Ainsi, les souches d'*Enterobacter* et *Klebsiella* n'ont présenté aucune résistance à l'imipénème.

Il a été rapporté dans une autre étude concernant l'épidémiologie des Entérobacteriaceae résistantes aux carbapénèmes (ERC) de 2000 à 2012 en Asie, que la prévalence des ERC était encore faible pendant la période d'étude avec des taux moyens de résistance de 0,6- 0,8% à l'imipénème. Dans la même étude, *Serratia* spp a représenté la plus grande proportion (1,8%) parmi les isolats résistants à l'imipénème. Ce résultat se concorde avec celui trouvé dans notre travail où *Serratia* spp a présenté la plus grande proportion (50%) des souches résistantes à l'imipénème (Xu *et al.*, 2015)

7- Détection des EPC :

Dans notre étude, nous avons utilisé deux méthodes pour détecter la production de carbapénémases à savoir: le test biochimique Carba NP et le test de Hodge modifié. Il faut signaler que ce dernier test n'a été réalisé que pour les souches Carba NP positives. Il ne s'agit pas d'un test confirmatif, mais il a été réalisé dans le but de démontrer la sensibilité de test Carba NP par rapport au test de Hodge modifié.

7-1 Test Carba NP :

Le test de carba NP à été positif pour 6 souches parmi 75 souches étudiées (Tableau 10). Le taux des EPC parmi les entérobactéries totales est donc de 8%. Ce résultat est inférieur à celui rapporté par (Abdallah *et al.*, 2015) qui était 11,32%. Quelques photographies des résultats du test carba NP sont présentées dans les figures 28.

Tableau 08 : Résultats du test Carba NP

Résultats	Positif	Négatif	Non interprétable	Total
Nombre de souches	6	48	21	75
Pourcentage	8%	64%	28%	100%

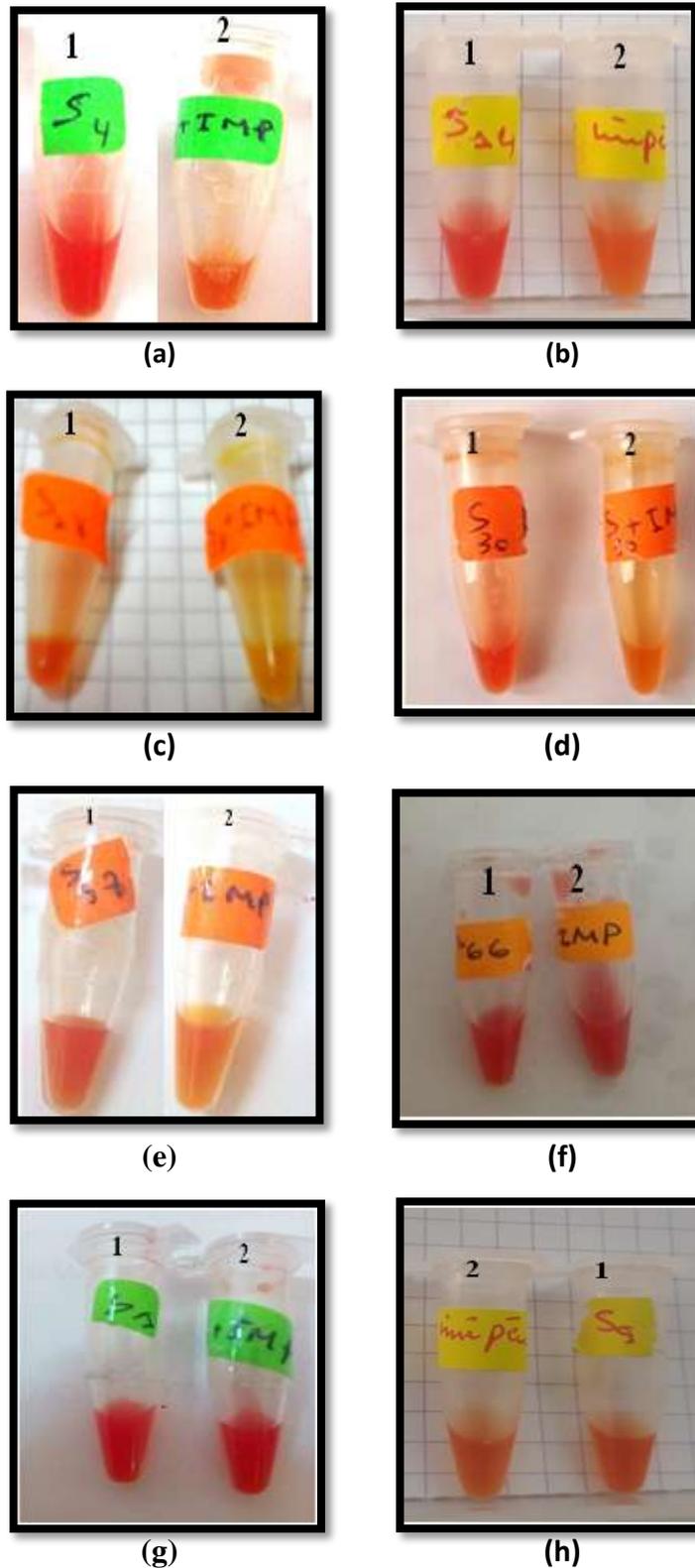


Figure 28 : Quelques exemples de résultats du test Carba NP

1 : Solution A, 2: Solution A + imipénème, (a), (b), (c), (d), (e) : résultats positifs, (f), (g) : résultats négatifs, (h) : résultat non interprétable.

7-1-1 Répartition des EPC en fonction des espèces :

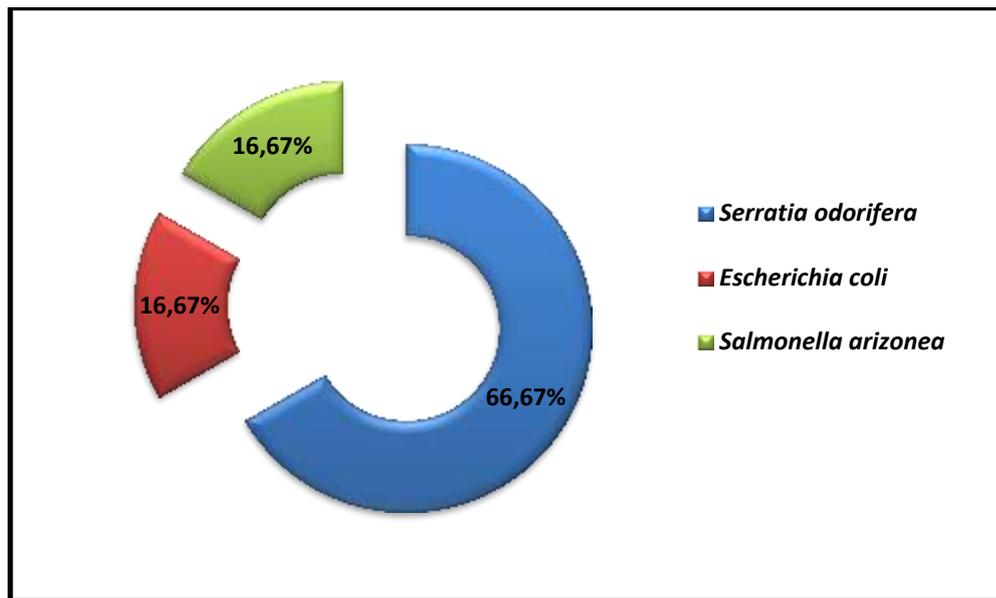


Figure 29 : Répartition des EPC en fonction des espèces

Serratia odorifera a occupé la première position parmi les EPC, *E. coli* et *Salmonella arizonae* occupent la deuxième position avec des pourcentages égaux (16,67%).

Ces résultats différents de ceux rapportés par (**Randall et al., 2017**).

Les souches d'*E.coli* isolée à partir des différents types de viande (volaille, porc...) ne produire aucune type de carbapénèmase.

La dissémination rapide des gènes de carbapénèmases au sein des entérobactéries peut être due à plusieurs facteurs. D'une part, les Entérobactériaceae sont des habitants de la flore intestinale et des pathogènes importants dans les milieux nosocomial et communautaire et elles se propagent facilement entre les humains par les mains, de même que par les aliments et l'eau contaminée. D'une autre part, elles ont également une propension à acquérir du matériel génétique par transfert horizontal de gènes, principalement par des plasmides et des transposons et parmi les principaux mécanismes responsables de la résistance aux carbapénèmes chez les Entérobactériaceae, l'acquisition de gènes spécifiques codant pour les carbapénèmases joue le rôle le plus important. En effet, de nombreux travaux de recherche ont montré que les gènes codant pour les carbapénèmases sont principalement localisés dans les plasmides et associés à diverses structures génétiques mobiles, telles que les transposons ou les intégrons, une telle caractéristique accélère certainement la dissémination inter / intra spécifique des gènes des carbapénèmases.

Ainsi, la prévalence élevée des bactéries productrices des BLSE et les options thérapeutiques limitées pour les infections dues aux souches multi résistantes, augmentent la consommation de carbapénèmes. Donc les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes sont les résultats de la pression sélective des antibiotiques (Xu *et al.*, 2015).

7-2 Test de Hodge modifié :

Le test de Hodge effectué sur les souches Carba NP positives s'est révélé négatif (Figure 30)

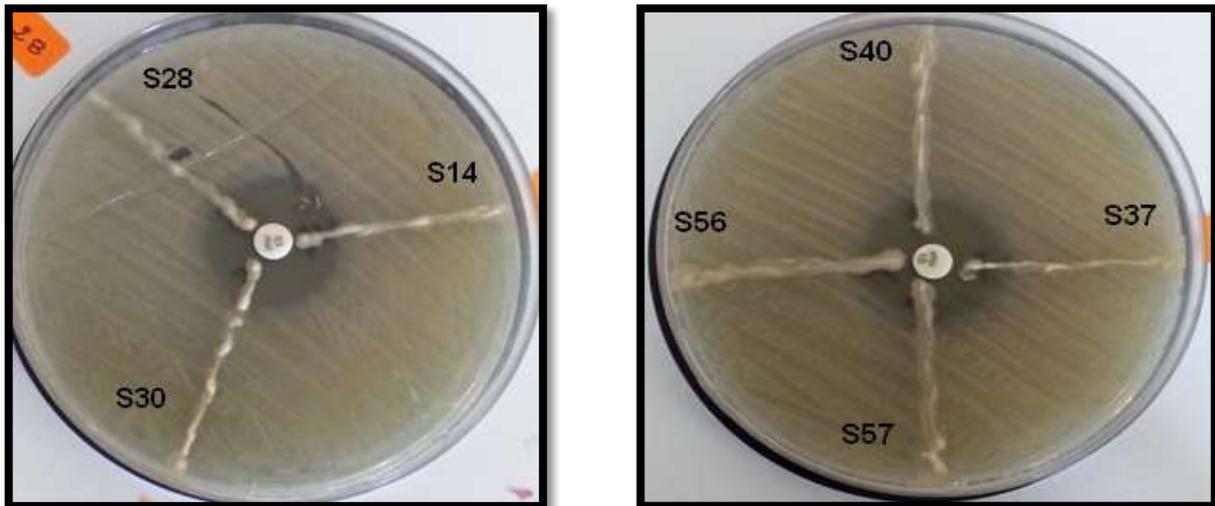


Figure 30: Résultats du test de Hodge modifié.

Ce résultat peut indiquer des cas de faux négatifs qui peuvent être observés avec des souches produisant une NDM.

8 -L'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire et la diffusion des souches multi résistantes :

La présente étude a montré un taux élevé des ERC, ainsi qu'un pourcentage non négligeable des EPC dans les viandes de volailles commercialisées à Tébessa. Ces résultats pourraient être justifiés par l'utilisation abusive des antibiotiques chez le poulet de chair.

Depuis les années 1950, chez l'animal, les agents antibactériens sont utilisés, soit comme médicaments destinés à la prévention et au traitement d'infections bactériennes, soit en tant qu'additifs alimentaires comme facteurs de croissance.

Les molécules utilisées pour traiter les infections bactériennes appartiennent aux mêmes familles d'antibiotiques que celles qui sont utilisées en médecine humaine. Les antibiotiques sont aussi utilisés de façon préventive, notamment dans les élevages industriels où sont rassemblés un très grand nombre d'animaux dans des espaces restreints. Cette

utilisation est fréquente dans les grands élevages, devant une circonstance pouvant occasionner un « stress » avec un risque infectieux élevé. Certains antibiotiques à spectre étroit ont été utilisés comme promoteurs de croissance, après la découverte fortuite de leur effet zootechnique à des doses infra-thérapeutiques. Ces additifs augmentent la vitesse de croissance des animaux de 3 à 7 %. La supplémentation des aliments avec un facteur de croissance concerne 96 % des dindons, 68 % des poulets de chair, 81 % des pintades et 20 % des poules pondeuses.

Dans les années 1960, une commission mixte sur l'usage des antibiotiques en élevage et en médecine humaine reconnaissait déjà que l'administration d'antibiotiques, particulièrement à doses infra-thérapeutiques, présentait un risque pour la santé animale et humaine. Ces différentes utilisations des antibiotiques en élevage ont amélioré l'état sanitaire des animaux, mais leur utilisation importante a eu pour conséquence la sélection de bactéries résistantes au sein des espèces qui composent la flore intestinale des animaux (**Carole *et al.* , 2003**).

La fréquence de l'antibiorésistance aussi bien parmi les germes pathogènes que saprophytes, qui constituent les flores de l'animal, pose des problèmes thérapeutiques et hygiéniques que ce soit pour l'animal ou l'Homme.

Premièrement chez l'animal, la résistance chez les agents pathogènes des animaux varie grandement de 0 à 90% selon l'antibiotique testé, les espèces hôtes de l'animal et l'emplacement géographique. L'antibiorésistance est une préoccupation pour la santé animale, lorsque les antibiotiques perdent leur efficacité pour le traitement ou la prophylaxie des infections bactériennes, entraînant ainsi une morbidité et une mortalité accrues chez les animaux. Ceci conduit à l'utilisation de médicaments plus coûteux, augmentant les coûts de soins de santé des animaux (**Tancrede ,1983 ; Jouy *et al.* , 2002**).

Chez l'Homme, le transfert de bactéries résistantes des animaux à l'homme est bien documenté dans la littérature. L'homme peut acquérir des bactéries résistantes suite à une exposition directe, en élevages. Des enquêtes récentes montrent que les fréquences de portage intestinal d'entérobactéries résistantes à différentes classes d'antibiotiques sont significativement plus grandes chez les personnes travaillant dans des élevages que chez des sujets vivant en zone urbaine. Les bactéries du tube digestif des animaux peuvent contaminer le sol souillé par les matières fécales, ce qui peut favoriser la dissémination des bactéries résistantes dans l'eau et chez les plantes. De plus, les bactéries résistantes sélectionnées dans

les élevages peuvent entrer dans la chaîne alimentaire et contaminer l'homme. La flore fécale des animaux peut contaminer les denrées alimentaires et contribuer à la flore microbienne de nombreux aliments. L'ensemble de la chaîne de production n'est pas stérile et de nombreuses voies permettent le transfert de ces bactéries tout au long de la chaîne.

Un autre facteur d'apparition de résistance chez l'homme est lié aux antibiotiques eux-mêmes et non plus aux bactéries. Ils peuvent en effet laisser des résidus dans la viande ou le lait. Avec les additifs, il n'y a pas de résidus, car les antibiotiques autorisés sont utilisés à faible dose dans l'alimentation des animaux et ont une faible biodisponibilité par voie orale. En revanche, dans les traitements vétérinaires, la dose thérapeutique est plus forte et certains antibiotiques ont une bonne biodisponibilité par voie orale. Si on abat l'animal sans respecter le délai d'attente légal avant abattage, des résidus d'antibiotiques peuvent être présents dans la viande. Bien que ces résidus antibiotiques ne semblent pas favoriser la sélection des bactéries résistantes dans l'intestin de l'homme, ils peuvent faire courir un risque allergique chez les consommateurs.

De plus, l'aliment médicamenteux, sous forme de poudre ou de granulés, pourrait être inhalé du fait de poussières en suspension dans les locaux de stockage et à l'occasion de la distribution de l'aliment. Il exercerait ainsi une pression sélective sur la flore des personnes manipulant ces produits.

Le véritable danger de l'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation des animaux ne provient pas des résidus ingérés par le consommateur mais plutôt de la sélection, dans le tube digestif de l'animal, de bactéries résistantes aux antibiotiques susceptibles de se transmettre à l'homme à travers les aliments ou de transmettre leur gène de résistance. Le premier risque est lié à la sélection de bactéries pathogènes pour l'homme résistantes à des antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine (**Carole *et al.* , 2003**).

Face à l'augmentation de la prévalence des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques, aussi bien en médecine humaine que vétérinaire, la mise en place de réseaux qui permettent de suivre cette évolution est indispensable (**agence française de sécurité alimentaire, 2000; Jouy *et al.* , 2002**).

Ces réseaux permettent la détection de nouveaux phénotypes de résistance et l'étude des mécanismes correspondants, ainsi qu'une meilleure connaissance globale de l'antibiorésistance dans les élevages et donc une meilleure orientation thérapeutique.

La comparaison des souches résistantes isolées dans les élevages d'animaux, les laboratoires de diagnostic vétérinaires, d'industrie alimentaire, d'hygiène, de bactériologie médicale devrait permettre de mieux définir la pratique d'emploi des antibiotiques (**Tancrede ,1983**) Ces études épidémiologiques pourraient être entreprises avec la participation des pouvoirs publics et des fabricants d'antibiotiques. Des réseaux de surveillance de l'antibiorésistance ont vu le jour dans de nombreux pays, à la fois en médecine vétérinaire et humaine.

Enfin, on peut dire que la résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques n'est pas un phénomène nouveau dans la pratique de la médecine humaine et vétérinaire, mais c'est un problème qui devient de plus en plus dangereux et doit être contenu pour protéger et prolonger l'efficacité et la durée de conservation des antibiotiques disponibles. Ceci est très important en raison de la lenteur de la recherche et du développement de nouveaux antibiotiques et d'autres antimicrobiens capables d'apaiser efficacement le problème de résistance que les bactéries pathogènes expriment in vivo contre les antibiotiques (**Chinwe et al ., 2014**).

Conclusion
et
Perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif de notre travail a été d'évaluer la contamination des viandes de volailles commercialisées dans la région de Tébessa, par les entérobactéries productrices des carbapénèmes (EPC) qui constituent un problème pour la santé animale et humaine.

Au cours de notre étude, 75 souches d'entérobactéries ont été identifiées, révélant une certaine diversité des genres et des espèces. Les genres les plus fréquents sont : *Serratia* (50,67%), *Escherichia* (14,67%) et *Kluyvera* (13,33%). Les genres *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter* et *Enterobacter* ont présenté des fréquences plus faibles : 8%, 6,67%, 4% et 2,67 % respectivement. L'espèce prédominante a été *Serratia odorifera* (49,33%), suivie par *Escherichia coli* 1 (14,67%) et *Kluyvera spp* (13,34%).

L'étude de la sensibilité aux carbapénèmes nous a permis de constater un taux de résistance important à l'ertapénème (58,06%) et un taux moindre vis-à-vis de l'imipénème (26,76%).

Les résultats du test Carba NP nous ont permis de cribler 6 souches d'EPC soit 8% parmi les entérobactéries totales, avec une prédominance de l'espèce *Serratia odorifera* (66,67%). *Escherichia coli* et *Salmonella arizonae* ont présenté des pourcentages égaux (16,67 %).

Les taux élevés de résistance aux carbapénèmes marqués dans notre travail reflète l'usage antérieur des antibiotiques dans les élevages de poulets de chair à titre curatif ou prophylactique. Cette situation alarmante soulève un sérieux problème de santé publique, puisque les EPC peuvent être transmises à l'homme via la chaîne alimentaire. Par conséquent la colonisation de l'intestin ou l'infection par ces bactéries pourrait poser des difficultés thérapeutiques. Un meilleur contrôle de l'évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques n'est donc possible qu'en disciplinant l'usage de ces produits simultanément chez l'homme et chez l'animal.

Donc quelques propositions peuvent être retenues dans ce contexte et elles concernent l'homme et l'animal:

- ✓ Lutter contre la contamination des viandes de volailles par les entérobactéries, en se basant sur l'hygiène irremplaçable à tous les maillons de la chaîne alimentaire.
- ✓ Suivre l'utilisation des antibiotiques en élevages, comme facteur de croissance, à titre préventif ou curatif, ce qui devrait permettre de promouvoir un recours raisonné des antibiotiques.
- ✓ Surveiller l'évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques de façon coordonnée chez l'homme et chez l'animal.

Notre travail ouvre de nombreuses perspectives :

- Etudier les gènes responsables de ces résistances pour mieux comprendre les mécanismes de résistance aux carbapénèmes.
- Identifier le support génétique de ces gènes afin de voir les possibilités de transfert entre les bactéries.
- Etudier la relation clonale entre les EPC d'origine aviaire (animaux) et celles d'origine cliniques (patients).

Il faut signaler que notre travail constitue la première étude faite sur l'investigation de la présence des EPC dans les viandes de volailles commercialisées à Tébéssa.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

- 1) Abdellah C, Fouzia R. Prévalence de la contamination par *Salmonella* des élevages de poulet de chair au Maroc (en ligne). 2016. p 8. Disponible sur : www.cahiersagricultures.fr
- 2) Agence française de sécurité alimentaire, Rapport «Alimentation et sécurité sanitaire des aliments ». 2000, 177p
- 3) Aïssatou F. Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella spp* et *Escherichia coli* isolées de la viande de poulet de chair au Sénégal .Discipline. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 2004, p 30.
- 4) Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, *et al.* Carbapenem- hydrolyzing oxacillinase OXA-48, persists in Istanbul, Turkey. *Chemother* 2008; 54:101-6.
- 5) Ambler R.P. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1980, 289, 321-331.
- 6) Arlet G. Quel avenir pour les carbapénèmases ? Le point sur les méthodes de détection. 13ème journée Maurice Rapin; 2012.
- 7) Baba Ahmed-Kazi Tani Z, Arlet G. Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie* 2014; 62 (3) : 169-178.
- 8) Bakour S, Kempf M, Touati A, *et al.* Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J Med Microbiol* 2012; 61:1341–3.
- 9) Barbier F, Ruppé E, Giakkoupi P, *et al.* Genesis of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* after in vivo transfer from an imported Greek strain. *Euro Surveill* 2010, V15, n°1 ,p3,pii 19457.
- 10) Bellaoui N, Belabbes H, Lahsoune M, *et al.* Bactériémies à *Kluyvera* : à propos d'une épidémie dans un CHU au Maroc. (en ligne). 2008, vol. n°, p 135. Disponible sur Internet le 17 novembre 2008
- 11) Benmesmoudi N. 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. 2014 – 2015. p 84.
- 12) Bogaerts P, Rezende de CR, Roisin S, *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Anti-microb Chemother* 2012;67:1552–3.
- 13) Boulanger A, Naas T, Fortineau N, *et al.* NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:2214–5.
- 14) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimic Agent and Chem*, 1995; 39: 1211-33.
- 15) Bush K, Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol* 2010; 13: 558-64.

- 16) Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, V 54,n°03 , p 969-976.
- 17) Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, *et al.* Controlling the spread of carbapenemase producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:102-11.
- 18) Carole M, Nadège B, Florence D, *et al.* l'utilisation des antibiotiques en pratique vétérinaire et ses risques pour la santé humaine. *Environnement Risques et santé*, 2003. V2, n° 2.
- 19) Carrèr A, Poirel L, Yilmaz M, *et al.* Spread of OXA-48-encoding plasmid from Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1369-73.
- 20) 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*, p 12.
- 21) Centre national de recherche. Détection biochimique rapide de l'activité carbapénèmase des entérobactéries
- 22) Chinwe N, Thomas A, Ifeanyichukwu I *et al.* Cloacal fecal carriage and occurrence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in chicken grown with and without antibiotic supplemented feed, 2014, 6(3), 91-94.
- 23) Cuzon G, Naas T, Nordmann P. *Pathologie Biologie.* V 58 ,n1, 2010, P39- 45.
- 24) Cuzon G., NAAS T P. World wide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg. Infect. Dis.* 2010, V16, n9, p1349-56.
- 25) Day KM, Pike R. Use of Faropenem as an Indicator of Carbapenemase Activity in the Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2013, V51, n 6 p 881-6.
- 26) Decousser J-W, Poirel L, Nordmann P, *et al.* Recent advances in biochemical and molecular diagnostics for the rapid detection of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae : a focus on β -lactam resistance. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(4):327- 50.
- 27) Décré D. *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation. *Rev Fr Lab* 2012;441:43–52.
- 28) Delaere B, Glupczynski Y. Les carbapénèmes: aujourd'hui... et demain. UCL séminaire de pathologie infectieuse 2002, p 42.
- 29) Delarras C. Microbiologie. 90 heures de Travaux pratiques. *Gaëtan Morin, France*, 1998, p 276.
- 30) Dortet L, Poirel L, Nordmann P, *et al.* Epidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénèmases. *Feuill Biol.* 2013; p 312.
- 31) Doumith M, Ellington MJ, Woodford N ,*et al.* Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2009 ; 63 : 659-67.

- 32) Drissi M, Poirel L, Mugnier PD *et al.* Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:1457–8.
- 33) Egea P, López-Cerero L, Torres E *et al.* Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain , *International Journal of Food Microbiology* , 2012,V 159,n°2 , p 69–73.
- 34) Endimiani A, Hujer AM, Perez F, *et al.* Characterization of *blaKPC*containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:427-37.
- 35) Gauzit R, Gutmann L. Recommandations de bon usage des Carbapénèmes. *Antibiotiques*. déc. 2010, V12, n° 4, p 183-189.
- 36) Gauzit R *et al.* Utilisation des carbapénèmes dans les établissements de santé en 2011 – Journées Nationales d’Infectiologie - Tours. SPILF, ONERBA; 2012.
- 37) Ghafir Y.1, Daube G. Le point sur les méthodes de surveillance de la contamination microbienne des denrées alimentaires d’origine animale. 2007, v175, p 79-100.
- 38) Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? *Drugs* 2009;69:1879-901.
- 39) Girlich D., Poirel L., Nordmann p, *et al.*: Value of the Modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 2011, V50, n°2,
- 40) Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, *et al.* Genetic organization of transposase regions surrounding *blaKPC* carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1998- 2004.
- 41) Grall N, Andremont A,. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *J Anti-Infect.* 2011;V50 , p 102.
- 42) Grall N, Muller-Serieys C. Carbapénèmes. *EMC - Mal Infect.* févr. 2013 ; V25, n°1, p 10
- 43) Guery BP. Doripenem: need for a new carbapenem. *Med Mal Infect* 2009;V39, n°12 p 871.
- 44) Hamadou A, Marius K. SOMD A ,*et al.* Prévalence et susceptibilité aux antibiotiques des souches de *Salmonella* spp. non typhiques isolées de la viande de poulets au Tchad (en ligne). 2017, vol, n°, p117. Disponible sur : <http://ajol.info/index.php/ijbcs>
- 45) Heritier C, Poirel L, Fournier PE, *et al.* Charac-terization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4174–9.
- 46) Jouy E, Meunier D, Martel J.L *et al.* Méthodologie du réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les principales bactéries pathogènes des animaux de rente (RESAPATH). 2002, *Bull. Acad. Vét. De France*, 155, (3/4) : 277-282

- 47) Kantati YT. Détection des résidents d'antibiotiques dans les viandes des bovins prélevées aux abattoirs de Dakar Ecole Inter-Etat des sciences et Médecin vétérinaires de Dakar (E. I. S. M. U), 2011, Mémoire de Master, Dakar.
- 48) Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, *et al.* Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2012;7:e31676.
- 49) Kitchelk B, Rasheed JK, Patel JB, *et al.* Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in the United States: clonal expansion of MLST sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 3365-70.
- 50) Laurent D, Cuzon G. CNR Résistance aux antibiotiques, Dr. Note technique : Détection des souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénémase. Publiée en mars 2015. Disponible sur : http://www.cnr-resistanceantibiotiques.fr/ressources/pages/Note_technique_v4_03_15.pdf
- 51) Leavitt A, Chmelnitsky I, Ofek I, *et al.* Plasmid pKqIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:243-8.
- 52) Lee K, Chong Y, Shin HB, *et al.* Modified Hodge and EDTA-disc synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 88-91.
- 53) Marchal .N. Bourdou .J.L. Richard .C, *et al.* Les milieux de cultures. Edition Doin , 1982 , p 482.
- 54) Martinez-Martinez L. Extended-spectrum b-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect* 2008 ; 14 Suppl 1 : 82-9.
- 55) Maurer FP, Castelberg C, Quiblier C, *et al.* Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with *Enterobacteriaceae* and development of a practical diagnostic algorithm. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 95-104.
- 56) Mendaci A, Mihoubi S. Profil de sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries uropathogènes (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* [en ligne]. Mémoire de Master : Microbiologie Générale et biologies Moléculaire des microorganismes. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine , 2015 , P 88 , Disponible sur : <http://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mmf/2015/199-2015.pdf>.
- 57) Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, *et al.* Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int J Infect Dis* 2013;17:e739-43.
- 58) Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, *et al.* Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010;16: 112-22.

- 59) Mugnier PD, Poirel L, Naas T, *et al* . Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010;16:35–40.
- 60) Naas T, Cuzon G, Babics A, *et al*. Endoscopy-associated transmission of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1305-6.
- 61) Neuwirth C., Siébor E., Duez J.M., *et al* , Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1995, 36, 335-342.
- 62) Nordmann P., Cuzon G., Naas T, *et al.*: The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.*, 2009, V9, n°4, p 228-236.
- 63) Nordmann P, Poirel L. Résistances aux antibiotiques émergents et importants chez les bactéries Gram négatif: épidémiologie, aspects théoriques et détection. *Mal Infect.* 2014;427(16):p 902–907.
- 64) Pagès J.M., James C.E. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, V6, n°12 : p 903.
- 65) Paradis S, Boissinot M. Phylogeny of the Enterobacteriaceae based one Patrice Nordmann, Gaelle Cuzon, Thierry Naas. *The Lancet Infectious Diseases*. Volume 9, Issue 4, 2009, p 236.
- 66) Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, *et al*. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, V47, n°6, p1639.
- 67) Paton R, Miles RS, Hood J, *et al*. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993;2:81–7.
- 68) Poirel L, Pitout JD, Nordmann P, *et al*. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007;2:501-12.
- 69) Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1597–606.
- 70) Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, *et al*. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:348-52
- 71) Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440-58.
- 72) Randall L.P, Lodge M.P, Elviss N.C., *et al*. Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, 2017, Volume 241 , numéro 283–290.
- 73) Riethmuller J. La résistance des entérobactéries aux carbapénèmes. thèse de doctorat d'état en pharmacie. Université de Strasbourg faculté de pharmacie de strasbourg, 2013 ,162p.

- 74) Roland T, Heidi G, Louise B, et al. Draft genome sequence of *Kluyvera intermedia* isolate from a patient with a pancreatic abscess (en ligne). 2017, vol, n°, p 2. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.007>
- 75) Rolinson G. N. Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother* . 1998, V41, n°6,
- 76) Shrestha A, Muni Bajracharya A, Subedi H *et al* .Multi-drug resistance and extended spectrum beta lactamase producing Gram negative bacteria from chicken meat in Bharatpur Metropolitan, 2017,V10,n°75.
- 77) Souli M, Galani I, Giamarellou H, *et al*. Emergence of extensively drug-resistant and pan drug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill* 2008;V13, n°47,pii 19045.
- 78) Tancrede C. Antibiothérapie en médecine vétérinaire et risques pour la santé humaine. 1983, *Rec. Med. Vét*, 159 (6) : 591-594
- 79) Thibaut C. les Bêta-lactamine DUCIV Lyon [en ligne]. (2016), Disponible sur <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/du/lyon/betalactamineschallan-belval-duciv-2016.pdf>
- 80) Thomson KS. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. 2010, V48 ,n°4, p1025
- 81) Tzouveleki LS, Tzelepi E, Mentis AF. Consecutive mutations leading to the emergence in vivo of imipenem resistance in a clinical strain of *Enterobacter aerogenes*. *J Med Microbiol* 1994 ; 40 : 403-7.
- 82) Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, *et al*. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-25.
- 83) Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis* 2008; V21, p 367-71.
- 84) Wolff M, Joly-Guillou M-L, Pajot O. *et al*. Le point sur les carbapénèmes comparative review of carbapenems. 2008, V17, p242-250.
- 85) Xu Y, Gu B, Huang M *et al*. Epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae (CRE) during 2000-2012 in Asia, 2015, V 7 n°3, p 376–385.
- 86) Yong D, Toleman MA, Giske CG, *et al*. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5046-54.
- 87) Yulistiani R, Praseptianga D, Supyani *et al*. Prevalence of Antibiotic-resistance *Enterobacteriaceae* strains Isolated from Chicken Meat at Traditional Markets in Surabaya, Indonesia. International Conference On Food Science and Engineering, 2017, Volume 193, p 6

Les sites :

- 88)** l'auteur AVIS sur la mise en place d'un plan de surveillance sur les carcasses de volailles portant sur les critères indicateurs d'hygiène du procédé d'abattage. 2009, vol27, n°31, 2009-SA-0046. p 13.
- 89)** Bêta-lactamines (pénicillines - céphalosporines). Pharmacomédicale.org, Copyright, 2017, Disponible sur : <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/beta-lactamines-penicillines-cephalosporines>

Annexes

Annexe 01 :

Tableau A: Bêta-lactamines actuellement disponibles sur le marché classées par noyaux et sous-famille

noyau	Famille	Molécule
pénames	pénicillines g et v	pénicilline g pénicilline v (po)
	pénicillines a	ampicilline (po), amoxicilline (po) pivmecillinam (po)
	pénicillines m	oxacilline (po), cloxacilline (po)
	carboxypénicillines	ticarcilline, temocilline
	uréidopénicillines	mezlocilline,
	inhibiteurs de bêta-lactamases	acide clavulanique (+ amoxicilline (po)+ ticarcilline) sulbactam (seul ou + ampicilline) tazobactam (+ pipéracilline) avibactam (+ ceftazidime)
pénèmes	Carbapénèmes	Imipénem (associé à la cilastatine, inhibiteur de la déhydropeptidase rénale), Méropénème, Ertapénème
monobactames	Monobactame	Aztréonam
céphèmes	c1g (1ère génération)	céfalotine, céfalexine (po), céfapirine, céfazoline, céfadroxil (po), céfaclor(po), céfatrizine (po), céfradine (po)
	c2g (2ème génération)	céfamandole, céfuroxime (po), céfoxitine, céfotétan
	c3g (3ème génération)	céfotaxime, ceftizoxime, céfopérazone, ceftriaxone, ceftazidime, cefsulodine céfixime (po), cefpodoxime proxétyl(po), céfotiam hexétyl (po)
	c4g (4ème génération)	céfépime, cefpirome
	c5g (5ème génération)	ceftaroline, ceftobiprole, ceftolozane

Po : molécules administrées par voie orale

Annexe 02

Tableau B : Classification des β -lactamases d' après Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995)

Classe moléculaire (Ambler)	Groupes fonctionnels (Bush & al.)	Type de β -lactamase et exemples représentatifs	Bactéries impliquées	Inhibition par acide clavulanique	Inhibition par EDTA	β -lactamines hydrolysées	β -lactamines stables
β -lactamases à sérine active Classe A	2a	Pénicillinases	Bactéries à Gram positif	++	-	Pénicillines sauf pénicillines M	Pénicillines M, C1G, carbapénèmes
	2b	β -lactamase à large spectre TEM-1 & 2, SHV-1 plasmidiques et chromosomiques	Bactéries à Gram négatif	++	-	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G	Céphamycines, C3G, moxalactam, carbapénèmes, aztreonam
	2be	β -lactamases à spectre élargi aux C3G et à l'aztreonam SHV-2 à 9, TEM-3 à 29, VEB-1, plasmidiques	Entérobactéries, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	-	Idem 2b + C3G et aztreonam	Céphamycines, moxalactam, carbapénèmes
	2br	β -lactamases à large spectre résistant à l'ac clavulanique TRI : dérivé TEM-30 à -41, plasmidiques	Entérobactéries	-	-	Idem 2b + associations aux inhibiteurs de β -lactamases	Idem 2b
	2c	Carbénicillases PSE-1, PSE-3, PSE-4 plasmidiques	Bactéries à Gram négatif	+	-	Idem 2b	Idem 2b
	2e	Céphalosporinases chromosomiques inhibées par l'acide clavulanique - Cefuroximase Cum A (<i>P. vulgaris</i>), - L2 (<i>S. maltophilia</i>)	Bactéries à Gram négatif (surtout entérobactéries)	++	-	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G, certaines C3G	Ceftazidime, céphamycines, aztreonam, carbapénèmes
	2f	Carbapénémases à site actif sérine et inhibées par l'acide clavulanique Ex : IMI-1, NMC-A, chromosomiques	Entérobactéries	+	-	Idem 2b + aztreonam, carbapénèmes et certaines C3G	Certaines C3G
Classe C	1	Céphalosporinase AmpC chromosomiques (Entérobactéries*, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.) et plasmidiques (CMY, FOX, MOX, MIR-1...)	Bactéries à Gram négatif	-	-	Toutes les β -lactamines sauf les carbapénèmes	Carbapénèmes
Classe D	2d	Oxacillinases OXA-1 à -20 plasmidiques et chromosomiques	Bacilles à Gram négatif	V	-	Idem 2b (+ parfois C3G, aztreonam ou carbapénème)	Variable
Pas de classe attribuée	4	Enzymes indéterminées Ex : enzymes chromosomiques de <i>C. jejuni</i> , <i>C. cepacia</i> ...	Espèces variées	-	-	Variable	Variable
β -lactamases Zinc-dépendances Classe B	3	Métallo- β -lactamases IMB-1/3 chromosomiques ou plasmidiques, enzymes chromosomiques de <i>Aeromonas</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>S. maltophilia</i> L1	Bactéries à Gram négatif	-	++	Large profil de substrats dont les carbapénèmes	Variable
Inhibition : inhibiteur fort++, inhibiteur modéré+, négligeable -, V : variable * <i>E. coli</i> (bas niveau), <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>M. morgani</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. rettgeri</i>							

Annexe 03 :

Tableau C : Résultats des tests de l'identification biochimique réalisée par l'API 20 E.

Test Isolat	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OXYD ASE	ESPÈCE
01	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Salmonella arizonae</i>
02	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Salmonella arizonae</i>
03	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Salmonella arizonae</i>
04	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Salmonella arizonae</i>
05	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Salmonella arizonae</i>
06	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
07	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
08	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
09	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
10	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
11	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Kluyvera spp</i>
12	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Kluyvera spp</i>
13	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli 01</i>
14	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>

La suite de tableau C :

Test Isolat	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OXYD ASE	ESPÈCE	
15	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli 01</i>	
16	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
17	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli 01</i>	
18	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Kluyvera spp</i>
19	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Kluyvera spp</i>
20	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
21	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Kluyvera spp</i>
22	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
23	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>Escherichia coli 01</i>
24	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Citrobacter freundii</i>	
25	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli 01</i>	
26	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Kluyvera spp</i>
27	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>Salmonella arizonae</i>	
28	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>

La suite de tableau C :

Test Isolat	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OXYD ASE	ESPÈCE	
29	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Kluyvera spp</i>
30	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
31	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
32	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
33	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
34	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Kluyvera spp</i>
35	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Kluyvera spp</i>
36	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
37	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
38	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Kluyvera spp</i>
39	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
40	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
41	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
42	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>

La suite de tableau C:

Test Isolat	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OXYD ASE	ESPÈCE
43	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
44	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia fonticola</i>
45	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Citrobacter koseri/ farmeri</i>
46	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
47	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
48	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
49	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
50	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
51	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli 01</i>
52	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
53	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
54	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli 01</i>
55	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli 01</i>
56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>

La suite de tableau C:

Test Isolat	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OXYD ASE	ESPÈCE
57	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
59	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Enterobacter sakazakii</i>
60	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
62	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
63	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
64	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
65	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
66	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
67	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Citrobacter freundii</i>
68	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli 01</i>
69	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
70	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>

La suite de tableau C:

Test Isolat	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OXYD ASE	ESPÈCE
71	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
72	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>
73	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli 01</i>
74	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli 01</i>
75	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera 1</i>

Annexe 04 :

Tableau D : Résultats de test de sensibilité aux carbapénèmes, test Carba NP et test de Hodge modifié.

N° de souche	Imipénème	Ertapénème	Test Carba NP	Test de Hodge modifié
S1	I	R	Négatif	NT
S2	I	R	Négatif	NT
S3	R	R	Négatif	NT
S4	R	R	Positif	NT
S5	R	R	Négatif	NT
S6	I	R	Non interprétable	NT
S7	I	R	Non interprétable	NT
S8	R	R	Non interprétable	NT
S9	R	R	Non interprétable	NT
S10	R	R	Non interprétable	NT
S11	S	I	Non interprétable	NT
S12	S	R	Non interprétable	NT
S13	S	R	Non interprétable	NT
S14	R	R	Positif	Négatif
S15	S	R	Non interprétable	NT
S16	S	R	Non interprétable	NT
S17	I	I	Négatif	NT
S18	I	I	Négatif	NT
S19	R	R	Négatif	NT
S20	I	R	Négatif	NT
S21	I	R	Négatif	NT
S22	I	R	Non interprétable	NT
S23	I	R	Non interprétable	NT
S24	R	R	Négatif	NT
S25	I	R	Négatif	NT
S26	R	R	Non interprétable	NT
S27	R	I	Non interprétable	NT
S28	R	R	Positif	Négatif
S29	I	I	Négatif	NT
S30	R	R	Positif	NT
S31	R	R	Négatif	Négatif
S32	I	R	Négatif	NT
S33	I	I	Négatif	NT
S34	I	I	Négatif	NT
S35	S	S	Négatif	NT
S36	S	R	Négatif	NT
S37	S	I	Négatif	Négatif
S38	S	R	Négatif	NT
S39	I	R	Négatif	NT
S40	I	R	Négatif	Négatif
S41	S	S	Négatif	NT
S42	I	S	Négatif	NT
S43	S	S	Négatif	NT
S44	I	S	Négatif	NT

La suite de tableau D

N° de souche	Imipénème	Ertapénème	Test Carba NP	Test de Hodge modifié
S45	I	S	Non interprétable	NT
S46	I	R	Négatif	NT
S47	I	S	Non interprétable	NT
S48	I	S	Non interprétable	NT
S49	I	S	Non interprétable	NT
S50	R	S	Non interprétable	NT
S51	R	S	Négatif	NT
S52	I	I	Négatif	NT
S53	I	R	Négatif	NT
S54	I	R	Négatif	NT
S55	R	R	Positif	NT
S56	I	R	Positif	Négatif
S57	S	R	Négatif	Négatif
S58	S	I	Négatif	NT
S59	S	S	Non interprétable	NT
S60	I	S	Négatif	NT
S61	I	S	Négatif	NT
S62	I	S	Négatif	NT
S63	S	NT	Négatif	NT
S64	I	NT	Négatif	NT
S65	R	NT	Négatif	NT
S66	I	I	Négatif	NT
S67	I	I	Non interprétable	NT
S68	S	NT	Négatif	NT
S69	S	NT	Négatif	NT
S70	S	NT	Négatif	NT
S71	I	NT	Négatif	NT
S72	S	NT	Négatif	NT
S73	S	NT	Négatif	NT
S74	S	NT	Négatif	NT
S75	R	NT	Négatif	NT

NT : Non Tester.

Annexe : 05

Milieux de culture utilisés

Les compositions sont données pour un litre de milieu.

1) Gélose Mac Conkey

Composition

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

PH final 7,4 ± 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.

2) 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.

3) 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.

4) Bouillon nutritif :

Composition

- peptone 5g
- Extrait de viande 3 g

PH = 6,8

Préparation

Suspendre 8 g de milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et dissoudre en chauffant avec agitation. Faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complète. Mettre dans des flacons ou des tubes et stériliser à l'autoclave à 121 ° C pendant 15 minutes.

