

# الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Ibn Khaldoun -Tiaret-  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière: "Biologie"

Spécialité: "Biotechnologie microbienne"

## THEME

**Etude de la résistance des bactéries Gram négatifs isolées des infections post partum**

Présenté par :

Mlle Bessas Faiza

Mme Saffar Amel

Mlle Hamiani Zadjia

Jury:

Promoteur: Mme Chaalal Wafaa

Examineur: Mme Medjber Nacéra

Année Universitaire 2017-2018

## **Remerciements**

*Avant tout nous remercions **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté, la patience et la santé durant toutes ces années d'études et que grâce à lui ce travail à pu être réalisé*

*Tout d'abord, nous tenons à exprimer nous plus vifs remerciements et notre sincère gratitude à notre promotrice **Madame Chaalal Wafaa**, qui nous a aidée dans la réalisation de ce travail par leurs précieux conseils, son soutien, ses encouragements qu'il n'hésitera jamais à nous proposer dans les moments difficiles et ses efforts immenses qui ont contribué dans la bonne marche de ce travail.*

*Nous remercions chaleureusement **Madame Chaalal Nadia** pour sa disponibilité, ses informations, son aide et ses orientations apportées au profit du travail effectué.*

*Un grand remerciement pour **Madame Medjeber Nacéra** pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de l'examiner. Vous acceptez l'expression de nos sincères remerciements.*

*Enfin, nos sincères remerciements sont destinés à tous le personnel du laboratoire de microbiologie de la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, de l'Université Ibn Khaldoun-Tiaret.*

## ***Liste des abréviations***

***A. boumannii*** : *Acinetobacter boumannii*.

**ADH** : Arginine dihydrolase

**AK** : Amikacine

**AMC** : Amoxicilline

**AX** : Amoxicilline

**CA-SFM** : Comité de l'antibiogramme, de la société Française de microbiologie.

**CAZ** : Ceftazidime

**CN** : Gentamicine

**CRO** : Ciprofloxacine.

**CT** : Colistine

**CTX** : Céfotaxime

***E. coli*** : *Escherichia coli*.

**FEP** : Cefepime,

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Eau oxygénée.

**H<sub>2</sub>S** : Hydrogène sulfuré.

**IPM** : Imipénème

**LDC** : Lysine décarboxylase.

**LPS** : lipopolysaccharide.

**ODC** : Ornithine décarboxylase.

**OMP** : Outer Membrane Porin.

**ONPG** : Ortho-nitrophényl-β-galactoside.

***P. aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*

**PLP** : Protéines de Liaison aux Pénicillines.

**RA** : Rifampicinet

**RM** : Rouge de méthyle

**SXT** : Amoxicilline + acide clavulanique

**TIC** : Ticarcilline

**TOB** : Tobramycine

**TSI** : Triple Sugar Iron

**UFC** : Unité formant colonie.

**VP** : Vosges-Proskauer.

## ***Liste des tableaux :***

<b>Tableau I:</b> les résultats de la galerie biochimique classique.....	21
<b>TableauII ;</b> Identification des entrobactéries fermntaires par galerie Api 20E.....	24
<b>Tableau III:</b> Identification des entrobactéries non fermntaires par galerie Api 20NE.....	24
<b>Tableau IV:</b> Résultats obtenus de l'antibiogramme pour les 14 souches et leurs interprétations.....	27

## *Liste des figures :*

<b>Figure 01 :</b> la carte géographique de la zone d'étude.....	03
<b>Figure 02 :</b> Diagramme récapitulatif de la procédure expérimental.....	05
<b>Figure 03 :</b> Prélèvement du liquide utérin d'une vache laitière.....	06
<b>Figure 04 :</b> test d'oxydase.....	08
<b>Figure 05 :</b> test de catalase.....	09
<b>Figure 06 :</b> Milieu de mannitol.....	09
<b>Figure 07 :</b> Milieu de citrate de simmons.....	10
<b>Figure 08 :</b> Disque d'ONPG.....	11
<b>Figure 09 :</b> Milieu de TSI.....	12
<b>Figure 10 :</b> Milieu de clark et lubs.....	13
<b>Figure 11 :</b> Milieu des décarboxylases.....	15
<b>Figure 12 :</b> Galerie API.....	16
<b>Figure 13:</b> la spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	18
<b>Figure 14 :</b> la cible de la spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	18
<b>Figure 15 :</b> Aspect des colonies sur MacConkey + ertpénème.....	20
<b>Figure 16 :</b> Aspect des colonies sur MacConkey +colistine.....	20
<b>Figure 17 :</b> Coloration de Gram objectif x100.....	20

<b>Figure 18 :</b> mise en evidence des tests biochimiques par galerie classique.....	22
<b>Figure 19:</b> mise en evidence des tests biochimique par galerie API.....	23
<b>Figure 20 :</b> Identification des isolas par le spectromètre MALDI-TOF-MS.....	25
<b>Figure 21 :</b> Résultats de sensibilité des souches vis-à-vis les antibiotiques.....	26
<b>Figure 22:</b> Profil de la résistance et la sensibilité d' <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques.....	28
<b>Figure 23 :</b> Profil de la résistance et de la sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques.....	28

## Résumé :

Après la mise-bas, l'utérus bovin est envahi par une variété de bactéries. On estime en moyenne qu'au cours des vélages normaux, 90% des utérus sont contaminés spontanément dans les 15 premiers jours post-partum.

La flore bactérienne intra-utérine post-partum se compose de germes saprophytes et pathogènes, Gram-positifs et -négatifs en quantités équivalente. La composition de la flore est donc variée et propre à chaque animal. Par le présent travail, nous nous sommes intéressées aux bacilles à Gram négatifs dans les infections post-partum chez la vache laitière, notamment les souches multi-résistantes aux carbapénèmes et à la colistine. C'est dans ce contexte, nous nous sommes fixés les objectifs suivants : l'isolement et purification des souches résistantes aux carbapénème et à la colistine ; l'identification phénotypique des souches, l'étude de profil de sensibilité aux antibiotiques.

Un ensemble de 08 souches d'E coli et de 03 souches de *P. aeruginosa* a été isolé entre Janvier et Avril 2018. L'étude de la sensibilité in vitro de ces germes vis-à-vis de 14 antibiotiques par la méthode des disques selon les normes du CA-SFM.

Il en ressort de nos résultats que 37.5% des souches d'e coli étaient résistantes à la tobramycine , 25% à l'amoxicilline et à la ticarcilline et 12.5% à l'amikacine et céftazidime.

Et que 100% des souches de *P. aeruginosa* étaient résistante à la ceftriaxone, 66.6% triméthoprim et l'amoxicilline et 33.3% à la céfotaxime et céftazidime.

## Mots clés :

*E.coli* ,*P. aeruginosa*, Antibio- résistance, vaches laitières, écoulements vaginaux, Tiaret.

## الملخص

عند الولادة يتم غزو الرحم البقري من قبل مجموعة متنوعة من البكتيريا. تشير التقديرات إلى أن 90% من الرحم يصابون تلقائياً خلال الولادة الطبيعية في الأيام الخمسة عشر الأولى بعد الوضع.

تتكون البكتيرية بعد الولادة داخل الرحم من التلف من بكتيريا إيجابية الغرام و-سلبية الغرام، والتي تختلف من حيوان إلى آخر من خلال هذا العمل، نحن مهتمون إلى العصيات السلبية بعد الولادة لابلقار الحلوب المقاومة للكاريباينام و الكوليسيتين

في هذا السياق ، وضعنا أنفسنا للأهداف التالية: عزل وتنقية السلالات المقاومة للكاريباينيمو الكوليسيتين؛ تحديد المظاهر من سلالات ، دراسة خصائص الحساسية للمضادات الحيوية تم عزل مجموعة من 08 سلالات القولونية و 03 سلالات منالزنجارية بين يناير وأبريل و دراسة حساسيتها اتجاه 14 المضادات الحيوية .

ويبدو من نتائجنا أن 37.5% من سلالات القولونية كانت مقاومة للالتوبراميسين، و 25% لأموكسيسيلينوتيكارسيلين و

12.5% أميكاسينو السيفنازيديم. وكانت 100% من سلالات الزنجارية مقاومة سفترىكزان 66.6% تريمتريم ووأموكسيسيلين و 33.3% لسيفنازيديم

## كلمات البحث

مضاد حيوي - مقاومة - *P. aeruginosa* - *E. coli* - عزل - تنقية - تعريف مظهري

# ***Introduction***

## Introduction :

Pendant la gestation, la lumière utérine est considérée comme un milieu stérile, mais après la parturition l'utérus est contaminé par des bactéries en provenance de l'environnement, de la région périnéale, de la peau et des fèces de l'animal. Le développement d'une infection utérine dépend alors de la balance entre les capacités d'auto-défense de l'utérus et la pathogénicité des bactéries (**Watellie .,2010**).

De nombreuses études ont été consacrées à l'étude de la flore bactérienne du tractus génital au cours du postpartum. Les germes identifiés sont classiquement reconnus comme étant les facteurs déterminants responsables des infections utérines (**Watellier.,2010**). A la fin des années 70 et au début des années 80, plusieurs antibiotiques sont apparus sur le marché pour le traitement des infections causées par les bactéries Gram négatifs. Au cours des années 90, la résistance à ces antibiotiques s'est développée laissant comme seule possibilité de traitement les antibiotiques de la classe de carbapénèmes « Les carbapénèmes sont la classe d'antibiotiques la plus puissante parmi les  $\beta$ -lactamines. La première molécule découverte a été la thienamycine en 1976 à partir d'une bactérie à Gram positif, *Streptomyces cattleya*. Des dérivés ont été obtenus par synthèse : imipénème, méropénème, ertapénème et doripénème principalement. Comme toutes les  $\beta$ -lactamines, ils agissent en se liant aux Protéines de Liaison aux Pénicillines (PLP), en inhibant les réactions de transpeptidation nécessaires au maintien de la structure de la paroi bactérienne. La traversée de la membrane externe pour accéder au peptidoglycane composant la paroi est facilitée chez les bactéries à Gram négatif par des porines, aussi appelés OMP (Outer Membrane Porin) (**Julian., 2017**) ».

Depuis les dix dernières années, les bacilles à Gram négatifs ont développés une résistance à ces classes <sup>d'antibiotiques</sup> déjà considérée comme dernier recours (**Sandra., 2017**). Ces bactéries restent cependant habituellement sensibles aux polymyxines « la colistine », selon **Munoz (2015)** ; la colistine: est un groupe d'antibiotiques polypeptidiques constitué de 5 composants chimiquement différents (Polymyxines A-E), ont été découvertes en 1947. la colistine a été un des premiers antibiotiques doté d'une activité significative vis-à-vis des bactéries à Gram négatif (BGN) et particulièrement envers *Pseudomonas aeruginosa* (**Kipnis et al., 2010**). L'effet bactéricide des polymyxines est obtenu par action au niveau de la membrane cytoplasmique. Ces antibiotiques déplacent les ions  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  qui stabilisent les molécules du lipopolysaccharide (LPS), principaux constituants de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, modifiant ainsi la perméabilité de leur membrane externe (**Lee**

**et al., 2014**). Il s'en suit une fuite des composés cellulaires et la mort des bactéries (**Falagas et al., 2010**). Les polymyxines n'étaient jusqu'à présent utilisées essentiellement que dans le monde animal. Cependant, une augmentation de l'utilisation de la colistine explique pourquoi des entérobactéries résistantes à la colistine sont désormais isolées dans le monde entier (**Nordmann et al; 2016**).

Par le présent travail, nous nous sommes intéressées aux bacilles à Gram négatifs dans les infections post-partum chez la vache laitière, notamment les souches multi-résistantes aux carbapénèmes et à la colistine, molécules considérés comme traitement de choix des infections chez l'homme et l'animale. Cette résistance est à titre, particulièrement problématique puisqu'elle diminue de façon drastique les possibilités thérapeutiques.

C'est dans ce contexte que ce travail de master s'inscrit avec comme objectif principal d'étudier la résistance aux antibiotiques en utilisant trois approches:

- L'isolement et purification des souches résistantes aux carbapénème et à la colistine ;
- Identification phénotypique des souches ;
- Etude de profil de sensibilité aux antibiotiques.

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Introduction

# Sommaire

## Partie I : Matériels et méthodes

<b>I. Matériel et méthodes</b> .....	03
<b>I.1.</b> Rappel sur les objectifs.....	03
<b>I.2.</b> Zone et durée de l'étude.....	03
<b>I.3.</b> Données descriptives.....	04
<b>I.4.</b> Protocole expérimental.....	04
<b>I.5.</b> Méthodologie.....	06
<b>I.5.1.</b> Méthode de prélèvement.....	06
<b>I.5.2.</b> Conservation des échantillons.....	06
<b>I.6.</b> Recherche des bacilles Gram négatifs résistants aux carbapénèmes et à la colistine.....	07
<b>I.6.1.</b> Enrichissement.....	07
<b>I.6.2.</b> Isolement sélectif et purification.....	07
<b>I.6.3-</b> Identification.....	07
<b>I.6.3.1-</b> Coloration de GRAM.....	07
<b>I.6.3.2.</b> Tests biochimiques.....	08
<b>I.6.3.3.</b> Galerie API 20E et API 20NE.....	15
<b>I.6.3.4.</b> Identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF_MS...17	

I.6.3.5. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	18
---	----

## **Partie II : Résultats et discussion**

### **II. Résultats et discussion**

II. 1.Culture des prélèvements.....	20
II.2.Identification.....	20
II.2.1.Coloration de Gram.....	20
II.2.2.La galerie classique.....	21
II.2.3.L'identification des souches isolées par système API 20E et API 20NE.....	23
II.2.4. Identification et typage par MALDI-TOF-MS.....	24
II.3. L'antibiogramme.....	25
Discussion.....	30
Conclusion.....	31
Références Bibliographiques .....	32
Annexes .....	35

# ***Matériels et méthode***

## I. Matériel et méthodes :

### I.1. Rappel sur les objectifs :

L'étude que nous avons menée est centrée en premier sur isolement des souches Gram négatif résistantes aux carbapénèmes ou à la colistine à partir d'écoulement vaginaux chez la vache laitière, au cours du postpartum.

En second, sur le profil de résistance des souches isolées vis-à-vis de plusieurs antibiotiques.

### I.2. Zone et durée de l'étude :

L'étude s'est déroulée dans la région de Tiaret :

La wilaya de Tiaret a un caractère agro-pastoral avec une superficie agricole totale de 1.610.703 ha. Les effectifs bovins (39200 têtes dont 25750 vaches laitières) représentent l'autre volet important du système de production agricole de la Wilaya.

Notre étude a débuté en Janvier 2018 et a duré 4 mois. Les analyses ont été réalisées au niveau du laboratoire de Microbiologie de la faculté S.N.V, Université Ibn Khaldoune.



Figure 01 : la carte géographique de la zone d'étude.

**I.3. Données descriptives :**

Le total de 57 prélèvements a été prélevé à partir d'écoulements vaginaux chez des vaches laitières en postpartum, répartis sur 9 fermes. Les vaches étaient principalement des Holstein (70%) et le reste (30%) étaient des croisements. le rendement moyen du lait quotidien étaient entre (7-12 litres /jours).

**I.4. Protocol expérimental :**

La procédure expérimentale suivie au cours de cette étude est récapitulée dans l'organigramme suivant :

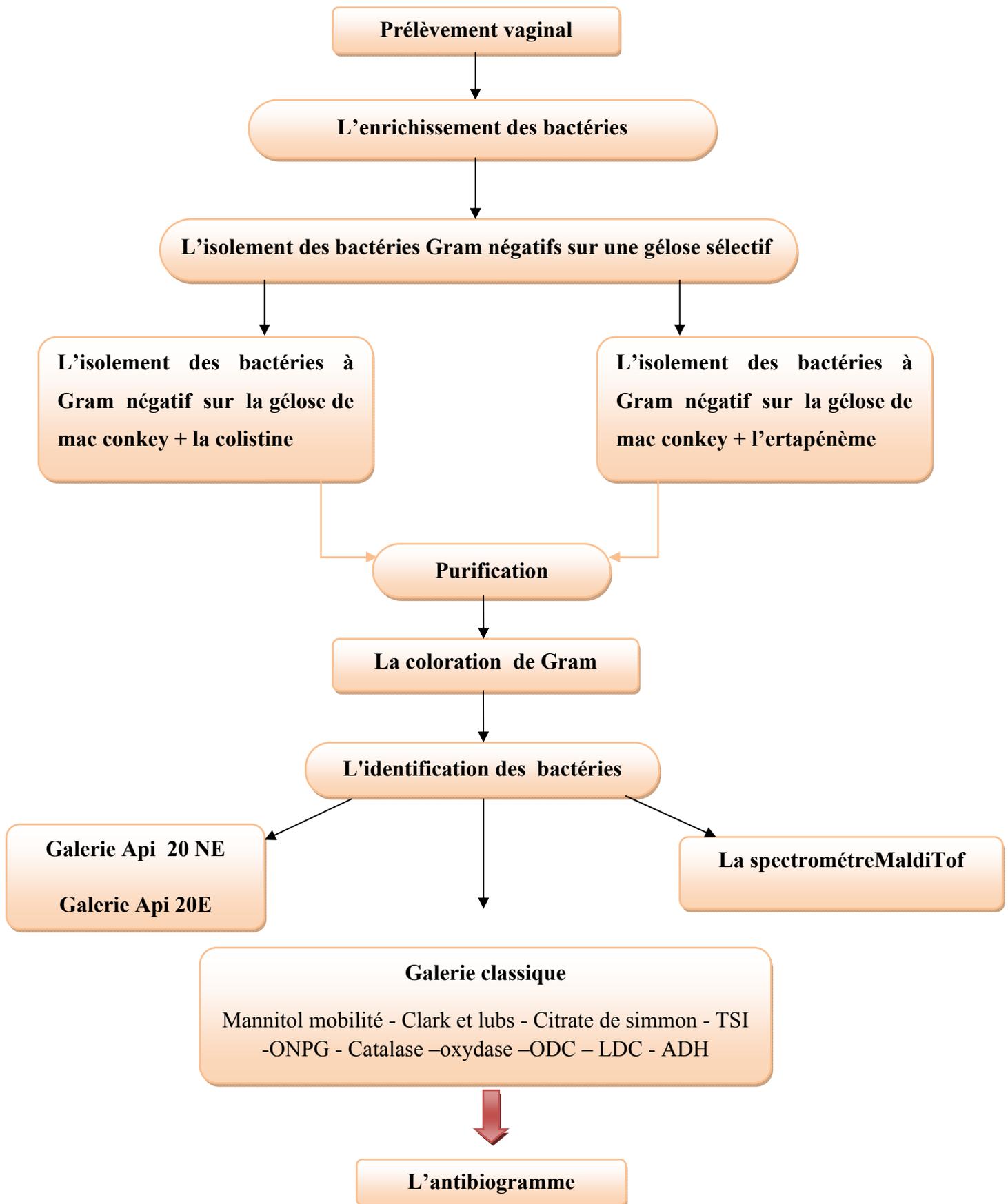


Figure 02 : Diagramme récapitulatif de la procédure expérimental

**I.5. Méthodologie :****I.5.1. Méthode de prélèvement :**

Classiquement, l'examen vaginal comprend la vidange manuelle du contenu vaginal à l'aide d'une main gantée et l'observation directe à l'aide d'un vaginoscope (en plastique) ou d'un spéculum. Une sonde intra-vaginale spécifique surmontée d'une cupule en silicone à fond noir afin de faciliter le recueil et l'examen des sécrétions.

L'étape de désinfection du matériel et de nettoyage de la région périnéale constitue un préalable indispensable à la bonne conduite du protocole.

Le prélèvement effectué est introduit dans un pot de prélèvement bien identifié (figure 03).

Nous avons réalisées 57 prélèvements de liquide vaginal.



**Figure 03 :** Prélèvement du liquide utérin d'une vache laitière.

**I.5.2. Conservation des échantillons:**

Une fois prélevés, les prélèvements sont placés dans une glacière à une température voisine à 4°C puis acheminés au laboratoire.

**I.6. Recherche des bacilles Gram négatifs résistantes aux carbapénèmes et à la colistine :****I.6.1. Enrichissement :**

Chaque prélèvement est introduit dans 5 ml de bouillon nutritif (cœur –cervelle) (annexes 01), il permet après une incubation à 37 °C pendant 24 h d'obtenir une multiplication des microorganismes (**Marchal et Bourdon, 1973**).

**I.6.2. Isolement sélectif et purification :**

L'isolement des souches a été réalisé sur le milieu Mac Conkey (annexes 02) additionnée à l'ertapénème ou à la colistine puis incubé à 37°C pendant 24 heures. La purification des colonies bactériennes est procédée par repiquage successif sur le même milieu afin d'obtenir des souches pures.

**I.6.3- Identification :**

Pour valider Les différents tests biochimiques, deux souches de référence sont utilisées :

*A.baumannii* (Acti 1) (**Chaalal et al., 2016**).

*E. coli* (O2) (**Chabou et al., 2016**).

**I.6.3.1- Coloration de GRAM :**

Avant l'identification biochimique des isolats, nous avons effectué une coloration de Gram pour chaque colonie isolés à partir des cultures réalisées sur le milieu Mac Conkey (annexe 16). L'observation microscopique des cellules est ensuite réalisée avec un objectif à immersion (Grx100).

La forme des cellules, la couleur, la taille et le mode d'association sont observés et notés.

### I.6.3.2. Tests biochimiques :

#### a- Identification du genre :

- **Test d'oxydase :**

- ✓ **Principe :**

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semiquinonique rose violacé. L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes. Dans ces réactions, l'oxygène est réduit en eau H<sub>2</sub>O ou en eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Meziani., 2012).



**Figure 04 :** Test d'oxydase.

- ✓ **Technique :**

- Prélever une colonie isolée et la faire diluer dans une goutte d'eau physiologique
- Ecraser par la suite cette colonie sur un disque d'oxydase (figure 04).

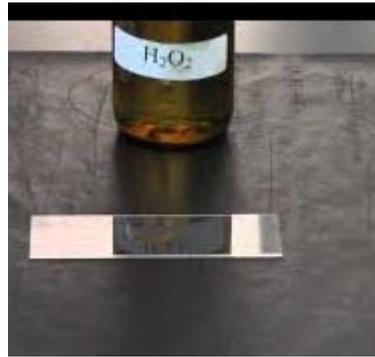
- ✓ **Résultat :**

Alors que l'apparition d'une coloration rose atteste la présence de l'oxydase notre résultat a été négatif par l'absence de coloration.

- **Test de catalase :**

- ✓ **Principe :**

La catalase est un enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec dégagement d'oxygène (Boudouda., 2015) (figure 05).



**Figure 05 :** Test de catalase.

✓ **Technique :**

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée à 10 volumes,
- A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien.
- Observer immédiatement.

✓ **Résultat :**

L'apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : **catalase +**

Pas de bulles : **catalase -**.

• **Test de fermentation Mannitol :**

✓ **Principe :**

Ce milieu semi solide (annexe 05) qui permet l'étude de la fermentation du mannitol et la mobilité de la souche ainsi que la recherche de la nitrate réductase (**Savadogo., 2016**) (figure 06).



**Figure 06 :** Milieu de mannitol.

✓ **Technique :**

- A l'aide d'une pipette Pasteur contenant quelques gouttes de la suspension bactérienne, réaliser une piqure centrale à travers le milieu,
- Incuber à l'étuve à 37°C durant 24 heures.

✓ **Résultat :**

L'apparition d'une coloration jaune atteste la fermentation du mannitol par contre notre résultat a été négatif par l'absence de coloration.

• **Test de citrat de simmons :**

✓ **Principe :**

Ce milieu permet l'étude de l'utilisation, par la bactérie, du citrate (acide organique) comme seule source de carbone (annexe 04) (**Boudouda., 2015**).



**Figure 07 :** Milieu de citrate de simmons.

✓ **Technique :**

Le milieu est présenté sous forme de gélose inclinée (figure 07).

- A l'aide d'une anse de platine stérile, prendre une goutte de la suspension bactérienne et la dépose sur le milieu citrate de Simmons incliné
- Ensemencer la pente par des stries longitudinales d'en bas vers l'haut.
- Ne pas visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux (en particulier élimination du dioxyde de carbone).
- -Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.

**✓ Résultat :**

Présence de culture bactérienne [Milieu bleu] : Les bactéries utilisent le citrate comme seule source de carbone avec alcalinisation du milieu, Les bactéries possèdent un citrate perméase elles sont dites citrate +

Absence de culture bactérienne [Milieu inchangé (vert)] : Les bactéries n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone, Les bactéries ne possèdent pas de citrate perméase elles sont dites citrate –

**• Test d'ONPG (La recherche de la  $\beta$ galactosidase) :****✓ Principe :**

Il s'agit d'une recherche particulière dans le cadre de l'étude de la dégradation de lactose. Le test ONPG consiste à rechercher la présence de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase (Savado., 2016).



**Figure 08 :** Disque d'ONPG.

**Technique :**

- Préparer une suspension dense d'une culture bactérienne à étudier dans un tube à essai stérile contenant 0.5ml d'eau physiologique, puis y ajouter un disque ONPG (figure08).
- Incuber 30 min à 37°C.

**✓ Résultat :**

Alors que l'apparition d'une coloration jaune atteste la présence de l'ONPG notre résultat a été négatif par l'absence de coloration.

**• Test TSI :****✓ Principe :**

C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations du : glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) et de gaz (Meziani., 2012) (figure 09).



**Figure 09 :** Milieu de TSI.

**✓ Technique :**

- A l'aide d'une anse de platine stérile, prendre une goutte de la suspension bactérienne et effectuer une piqueur en profondeur jusqu'à 3 à 5 mm du fond de tube puis des stries à la surface du milieu TSI incliné.
- Laisser dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

**✓ Resultat :**

Le rouge de phénol est l'indicateur colorant virant du rouge au jaune pour un résultat positif. Le noircissement du culot indique la présence de H<sub>2</sub>S.

- **Clark et lubs :**

- ✓ **Principe :**

Selon **Boudouda (2015)** ; le milieu de Clark et Lubs (annexe 06) permet l'étude des produits de fermentation du glucose: différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique » (figure 10).

- **Test RM (rouge de méthyle) :**

Ce test permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle (annexe 10), de la fermentation acide mixte par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

- **Test VP (Voges-Proskauer) :**

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxybutanone) (annexe 09) au cours de la fermentation butylène glycolique: en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d'a-naphtol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.



**Figure 10 :** Milieu de Clark et Lubs.

- ✓ **Technique :**

- Ensemencer un milieu Clark et Lubs avec quelques gouttes de la suspension bactérienne.
- Etuver 24 à 48 h à 37°C.
- Après 48 heures, verser le contenu dans deux tubes d'hémolyse
- ✓ **Tube 1 :** ajouter quelques gouttes de rouge de méthyle.

- ✓ **Tube 2** : ajouter quelques gouttes de VP1 .Attendre quelques secondes et rajouter deux ou trois gouttes de VP2
- Mettre les deux tubes dans une position inclinée pour bien observer le virage de couleur
- attendre quelques min à 1 heure.
- ✓ **Résultat** :

**Rouge de méthyle** : Il permet de détecter la production d'acides plus ou moins forts et

- Si les bactéries produisent des acides forts au cours de la fermentation. Le milieu reste acide et donc en rouge.

-Si les bactéries produisent des acides faibles le milieu s'est acidifié, puis ré-alcalinisé. Le milieu est donc jaune.

**Vp1 et VP2** : Il permet de détecter la production d'acétoïne, de dyacétyl et de butane-diol à partir de la fermentation du glucose. Le réactif ajouté (l'alpha naphthol) permet dans le cas d'un milieu basique et en présence de dioxygène, d'obtenir une coloration rosé ou rouge.

- **Recherche des décarboxylases « LDC, ODC et ADH » :**

- **Principe :**

La recherche des décarboxylases de l'ornithine, de la lysine, et de l'arginine forment trois tests biochimiques utiles dans le diagnostic différencié des entérobactéries. Ces trois tests peuvent être réalisés sur les bouillons « LDC- ODC- ADH » qui sont appelés les milieux de Moëller et qui permettent de montrer la présence des décarboxylases et dihydrolase bactériennes par la mise en évidence de l'acidification du milieu et sa réalcalinisation (**Meziani., 2012**) (figure 11).

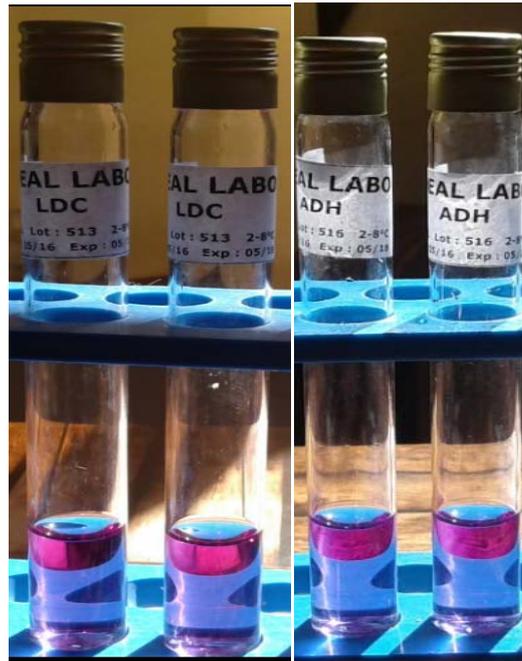


Figure 11 : Milieu des décarboxylases.

✓ **Technique :**

- Ensemencer le milieu de Moeller avec une goutte de la suspension bactérienne.
- Agiter (si le tube n'est pas plein le recouvrir de vaseline stérile).
- Fermer le tube entièrement afin de créer une anaérobiose relative.
- Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.

✓ **Résultat :**

Le milieu d'étude contient du glucose, l'indicateur coloré et l'acide aminé. Chez les bactéries la fermentation du glucose entraîne une baisse de pH suffisante pour favoriser la synthèse de l'enzyme ; l'alcalinité due à l'amine entraîne ensuite le virage de l'indicateur au violet après une courte phase de jaunissement. Si la bactérie étudiée ne possède pas de décarboxylases, le milieu restera acide, donc jaune.

**b- Identification de l'espèce :**

**I. 6. 3.3. Galerie API 20E et API 20NE :**

• **Principe :**

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Elle permet l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les Entérobactérie.

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux (ex. Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium, Moraxella, Vibrio, Aeromonas, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données.



**Figure 12 :** Galerie API.

- **Préparation de l'inoculum :**

- Ouvrir une ampoule d'un tube d'eau distillée stérile.
- Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé Mac Conkey.
- Réaliser une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle Mc Farland)
- Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests selon la méthodologie recommandée par les notices techniques de la galerie API 20E et API 20NE (annexe 12, 14).

- **La lecture :**

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (annexe 13, 15).

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.

**I. 6. 3.4. Identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MS :**

- **Principe :**

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une nouvelle technologie apparue ces dernières années en microbiologie. Si les techniques conventionnelles d'identification des différents germes se basent sur leurs aspects phénotypiques, il est possible aujourd'hui d'identifier les microorganismes en analysant directement leurs protéines spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge (**Seng *et al.*, 2009**) (figure 13).

- **Technique:**

- a) Préparation des souches :**

L'identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) a été faite en ensemençant les souches sur gélose Columbia au sang de mouton à 5 % (bioMérieux) et les incubant pendant 24 heures à 37 °C.

- b) Préparation de la cible :**

En utilisant des embouts stériles, prendre une colonie et l'étaler sur le cercle graver sur la cible (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne). Ensuite, deux microlitres de la solution de la matrice ont été ajoutés sur les taches cibles de l'analyse. Après que la cible est sèche, elle est placée dans l'appareil (MALDI-TOF-MS Bruker Microflex Daltonics, Bremen, Allemagne) (**Seng *et al.*, 2009**) (figure14).



**Figure 13:** la spectrométrie de masse  
MALDI-TOF



**Figure 14 :** la cible de la spectrométrie  
de masse MALDI-TOF

#### **I.6.3.5. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques :**

La méthode utilisée est la technique de la diffusion des disques, sur un milieu gélosé. Les antibiogrammes des souches ont été réalisés sur des boîtes de Muller-Hinton suivant la technique recommandée par le comité de l'antibiogramme, de la société Française de microbiologie (CA-SFM).

Les géloses ont étéensemencées à l'aide d'un écouvillon à partir d'une suspension de germes à 0.5 Mac Farland (une densité optique égale 0.2 à 650 nm) diluée au 1/10 de façon à obtenir une concentration finale de  $10^7$  UFC/ml, conformément aux recommandations de la CA-SFM ([www.sfm.asso.fr](http://www.sfm.asso.fr)). Des disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses, à l'aide d'un distributeur automatique. Les antibiotiques testés sont les suivants :

Ticarcilline (TIC 75 µg), Ceftazidime (CAZ 30 µg), l'Imipénème (IPM10 µg), l'Amikacine (AK 30 µg), la Tobramycine (TOB 10 µg), la Gentamicine (CN 500 µg), la Ciprofloxacine (CRO 30µg) et la Colistine (CT 50µg), céfotaxime (CTX 30 µg), Amoxicillin + ClavulanicAcid (SXT 1,25 µg), Amoxicilline (AMC 30 µg), Cefepime (FEP 30 µg), Rifampicin( RA 30 µg) et amoxicilline (AX 25 µg).

Les boîtes ont été mises à incuber pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

À l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés par deux fois. L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CA-SFM (**Communiqué du CA-SFM, 2017**).

# *Résultats et Discussion*

## II. 1.Culture des prélèvements :

Durant notre étude, 57 prélèvements de liquide utérin de vaches laitières de 09 fermes sis au niveau de la wilaya de Tiaret ont été analysés au niveau de laboratoire de Microbiologie de la faculté SNV, Université Ibn Khaldoune.

Après culture sur milieu Mac Conkey additionné à l'ertapénèmes ou à la colistine, 11 prélèvements ont manifestés une croissance bactérienne sur le Mac Conkey dont 09 isolats étaient résistant a la colistine et les deux autres étaient résistant aux carbapénèmes (Figure 15, 16).



**Figure 15** : Aspect des colonies sur MacConkey + ertapénème.

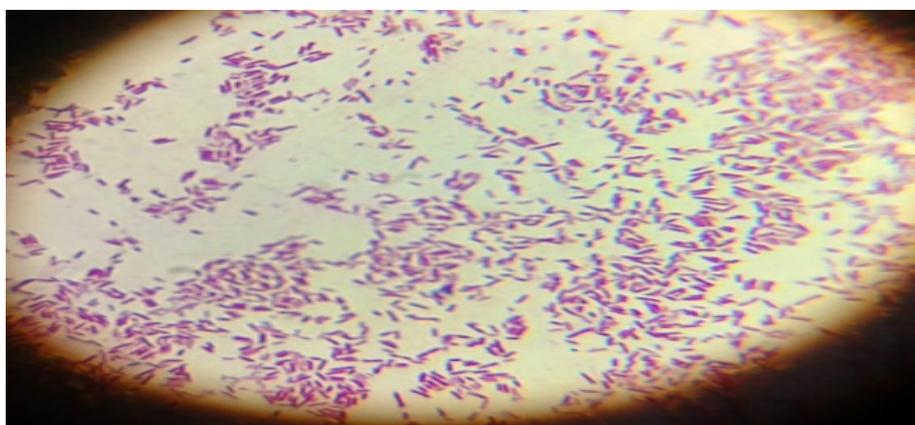


**Figure 16** : Aspect des colonies sur MacConkey +colistine.

## II.2.Identification :

### II.2.1.Coloration de Gram :

Après la coloration de Gram les isolats purifiés sont apparues sous forme des bacilles roses Gram négatif (Figure 17).



**Figure 17** : Coloration de Gram objectif x100.

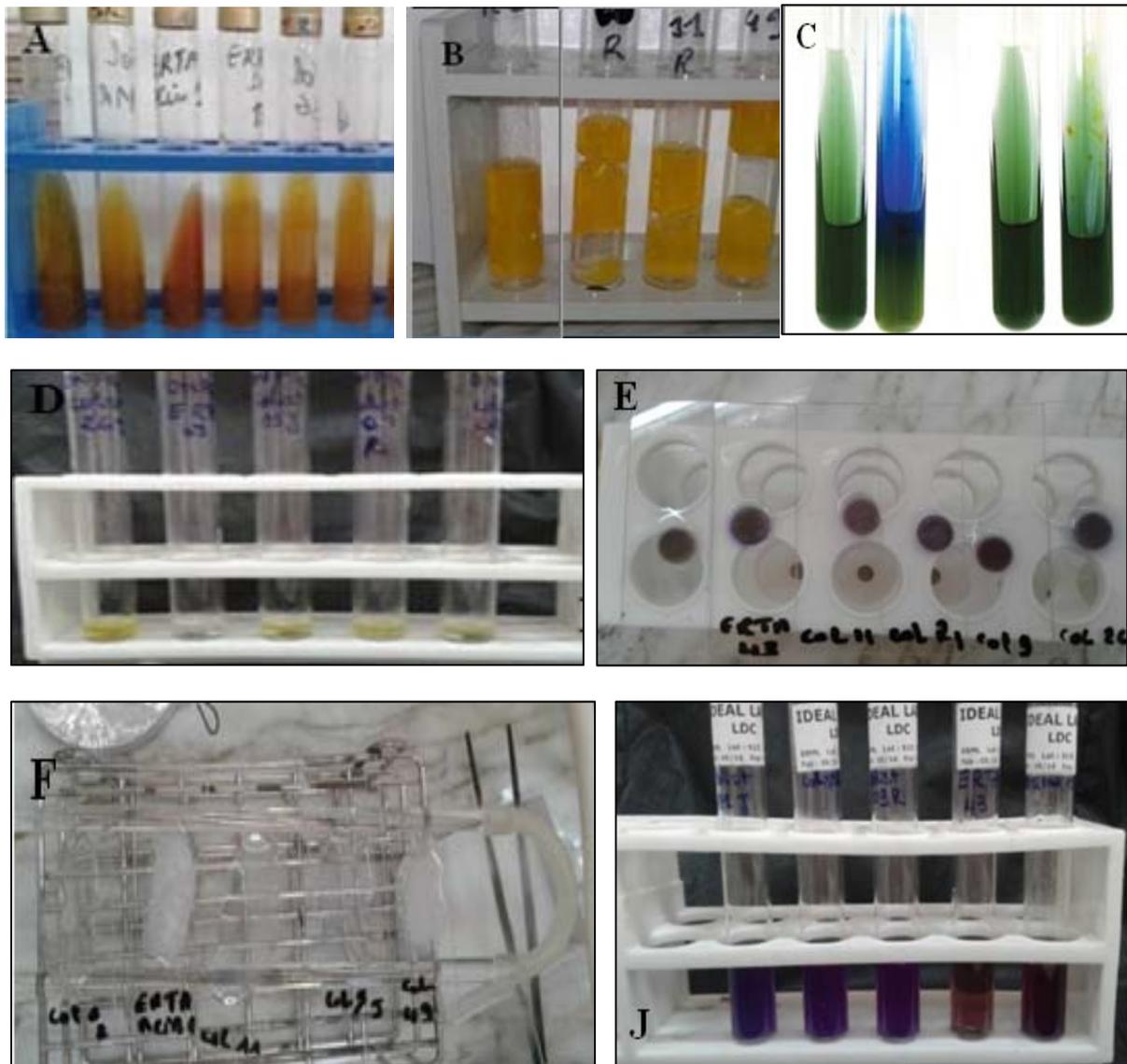
## II.2.2.La galerie classique :

Tableau I : les résultats de la galerie biochimique classique.

Code	Clark et lubs		citrate de simon	TSI	ONPG	Catalase	Oxydase	ODC	LDC	ADH	Mannitol mobilité	
	RM	VP									Mannitol	mobilité
col O2	+	-	-	+	+	+	+	/	/	/	+	+
R1	+	-	-	+	+	/	+	/	/	/	+	+
Acimi1	+	-	+	-	/	+	-	/	+	/	-	+
Col 09R	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Col 09J	+	-	-	+	+	+	+	/	/	/	-	+
Col 11J	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Col 11R	+	-	-	+	+	+	+	/	/	/	+	+
Col 12	+	+	+	-	-	-	+	/	/	+	-	+
Col 26J	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Col 26R	+	-	-	+	+	+	+	/	/	/	-	+
Col 49	+	-	-	+	+	+	+	-	/	-	+	+
Col 56	+	-	-	+	+	+	+	/	/	/	+	+
Erta 12	+	+	+	-	-	-	+	/	/	/	-	+
Erta 43	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+

*A.baumannii* (*Acti 1*) (Chaalal et al., 2016).

*E. coli* (*O2*) (Chabou et al., 2016).



**Figure 18 :** Mise en évidence des tests biochimiques par galerie classique.

**A :** Test de TSI.

**E :** Test d'oxydase.

**B :** Test de mannitol mobilité.

**F :** Test de catalase.

**C :** Test de citrate de simons.

**J :** Test de décarboxylase.

**D :** Test d'ONPG.

### II.2.3.L'identification des souches isolées par système API 20E et API 20NE :

Les souches isolées d'écoulements vaginaux des vaches laitières post partum sont identifiées par le système Api 20 E dédié l'identification des entérobactéries fermentaires et API 20NE aux bactéries non-fermentaires. La lecture repose sur le changement de la coloration initiale des différents milieux. Cette lecture se fait soit directement, soit après l'addition des réactifs de révélation. Les résultats sont référenciées dans un tableau de lecture et d'identification Api 20 E et API 20NE (figure 19).



**Figure 19:** mise en evidence des tests biochimique par galerie API.

**Tableau II** ; Identification des entrobactéries fermntaires par galerie Api 20E.

Code	ONPG	ADH	LDC	ODC	CTT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	API 20E CODE
Souche de référence <i>O2E. coli</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	7114577
Souche de référence <i>R1E. coli</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	7114577
Col 09R	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	7114457
Col 09J	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	7114457
Col 11J	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	7114167
Col 11R	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	7114167
Col 12	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	6110006
Col 26J	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	7114757
Col 26R	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	7114757
Col 49	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	7114757
Col 56	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	7114757

**Tableau III**: Identification des entrobactéries non fermntaires par galerie Api 20NE.

Code	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ASC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CTT	PAC	API 20 NE code
Souche de référence Acti 1	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6400000
Erta 12	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2400004
Erta43	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2500004

#### II.2.4. Identification et typage par MALDI-TOF-MS

Les 11 souches identifiées par API 20E et 20NE, ont été correctement identifiées par MALDI-TOF-MS comme étant 08 isolats appartenant à l'espèce *Escherichia coli* toutes résistantes à la colistine, et les trois restantes font partie de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, dont une est résistante à la colistine et les deux autres sont résistantes aux carbapénèmes avec un score compris entre 1,9 et 2,2 (figure 20).

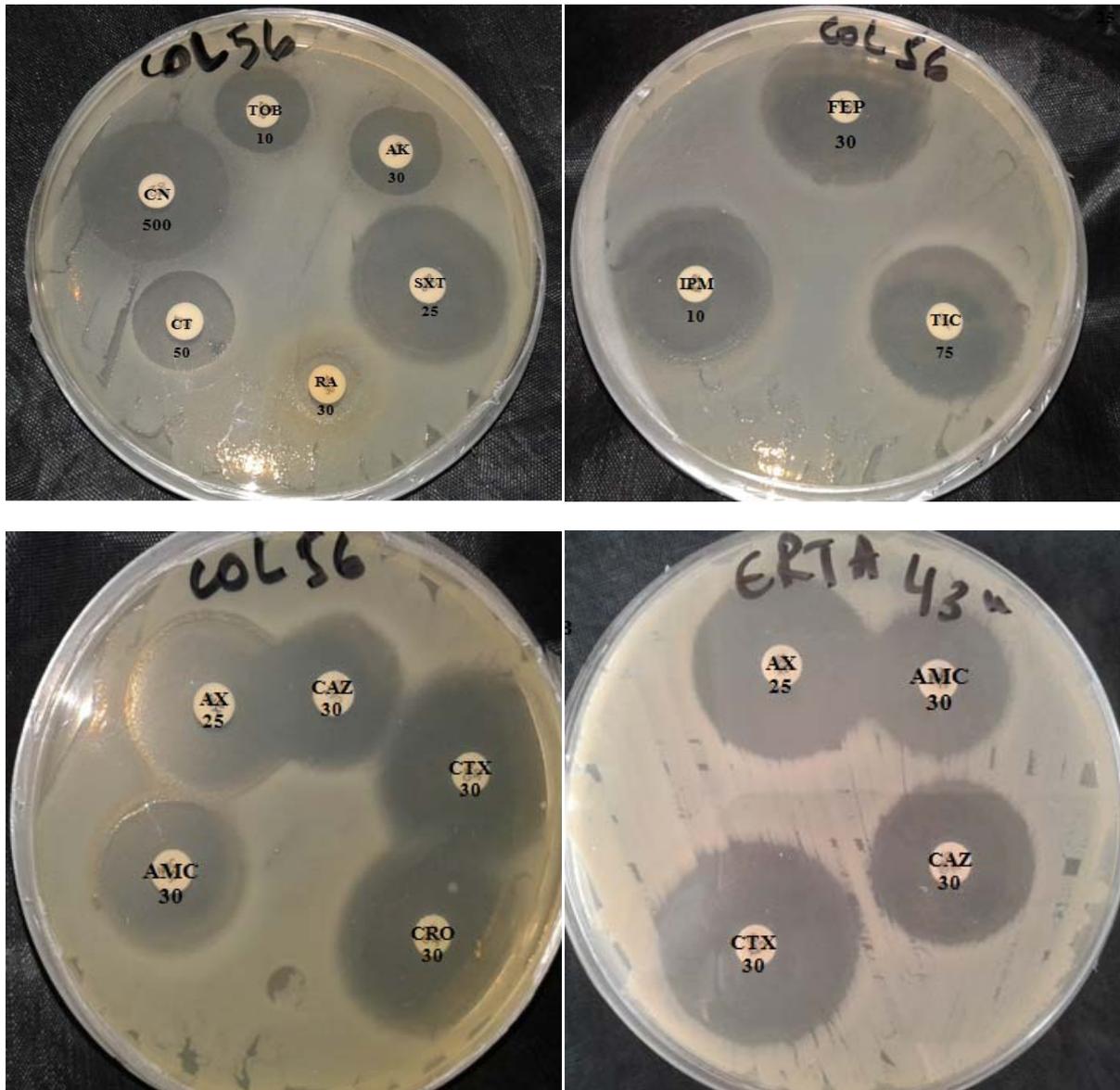
Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<a href="#">C1</a> (++)(A)	C1	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.108	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.107
<a href="#">C2</a> (+++)(A)	C2	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.111	Escherichia coli	2.111
<a href="#">C3</a> (++)(A)	C3	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.113	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.103
<a href="#">C4</a> (++)(A)	C4	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.063	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.064
<a href="#">C5</a> (++)(A)	C5	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.102	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.071
<a href="#">C6</a> (++)(A)	C6	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.112	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.093
<a href="#">C7</a> (++)(A)	C7	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.111	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.114
<a href="#">C8</a> (+++)(A)	C8	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.173	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.168

**Figure 20** : Identification des isolas par le spectromètre MALDI-TOF-MS.

## II.2. L'antibiogramme

Les isolats d'*E.coli* et *P. aeruginosa* étaient testés vis à vis de 14 molécules d'antibiotiques dont 6 antibiotiques appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines (amoxicilline +acide clavulanique, Ticarcilline, Ampicilline, Cefoxitine, Cefotaxime, Ceftazidime, Cefépime) et trois molécules appartenant à la famille des aminosides (gentamicine, Amikacine, Tobramycine) et vis-à-vis d'autres molécules (colistine, Trimetho-sulfa, Rifampicine).



**Figure 21 :** Résultats de sensibilité des souches vis-à-vis les antibiotiques.

AMC:Amoxicilline+acide clavulanique, TIC:Ticarilline, AX:Ampicilline, CTX:Cefotaxime, CRO:Ceftriaxone, SXT: Triméthoprimesulfaméthoxazole, TOB:Tobramycine, CT:Colistine, AK:Amikacine, CN:Gentamicine, CAZ:Ceftazidime., RA : Rifampicine, FEP : céfépime

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *E. coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* a permis d'obtenir les résultats suivants que nous présentons au tableau suivant :

**Tableau IV:** Résultats obtenus de l'antibiogramme pour les 14 souches et leurs interprétations

ABT Code	Souches	TOB	AK	SXT	CT	CN	RA	CRO	CTX	CAZ	AX	AMC	TIC	IPM	FEP
R1	Souche de référence <i>E. coli</i>	S	S	R	R	S	R	S	S	I	R	R	R	S	S
Col 09R	<i>E. coli</i>	R	S	S	R	S	R	S	S	I	R	R	S	S	S
Col 09J	<i>E. coli</i>	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S
Col 11J	<i>E. coli</i>	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Col 11R	<i>E. coli</i>	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
Col 12	<i>P. aeruginosa</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S
Col 26J	<i>E. coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S
Col 26R	<i>E. coli</i>	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
Col 49	<i>E. coli</i>	R	S	S	R	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S
Col 56	<i>E. coli</i>	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Erta 12	<i>P. aeruginosa</i>	S	/	R	S	S	S	/	S	S	R	R	R	R	S
Erta 43	<i>P. aeruginosa</i>	S	/	S	R	S	R	/	S	S	S	S	S	R	S

AMC:Amoxicilline+acide clavulanique, TIC:Ticarcilline, AX:Ampicilline, CTX:Cefotaxime, CRO:Ceftriaxone, SXT: Triméthoprimésulfaméthoxazole, TOB:Tobramycine, CT:Colistine, AK:Amikacine, CN:Gentamicine, CAZ:Ceftazidime., RA : Rifampicine, FEP : céfépime R: Résistante, S: Sensible, I : Intermédiaire.

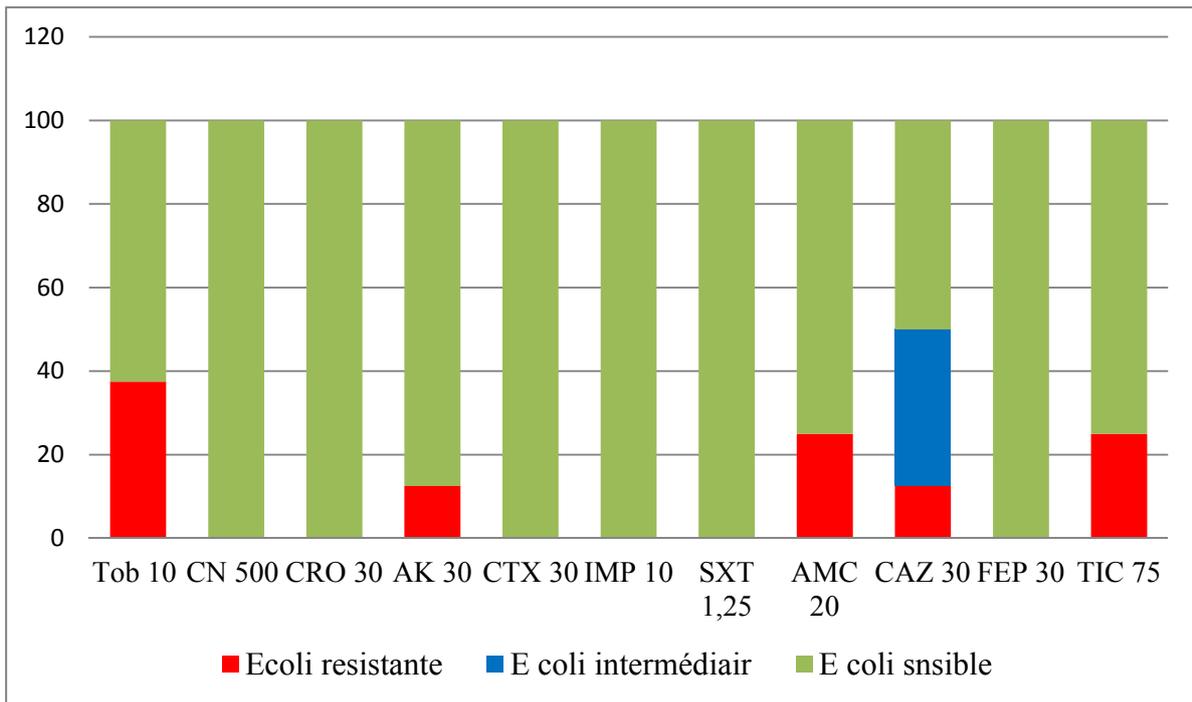


Figure 22: Profil de la résistance et la sensibilité d'Escherichia coli aux antibiotiques.

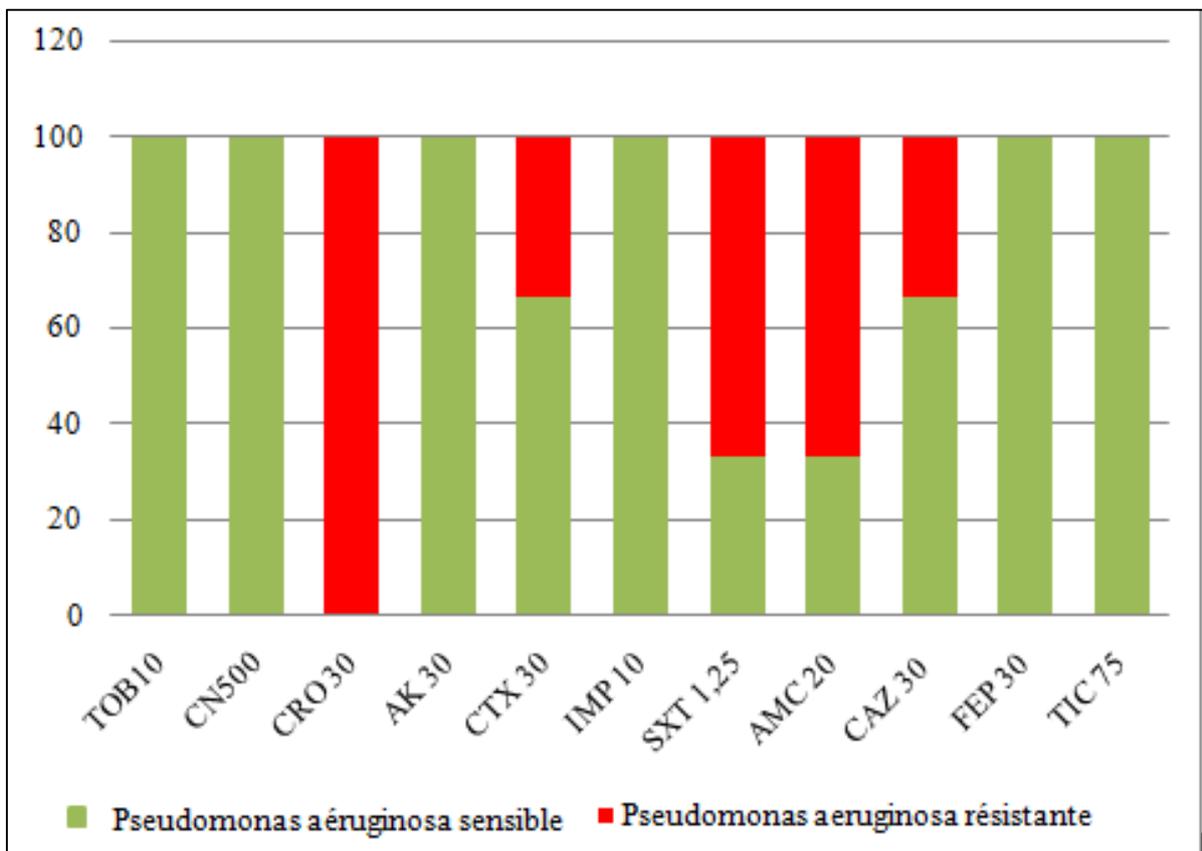


Figure 23 : Profil de la résistance et de la sensibilité de Pseudomonas aeruginosa aux antibiotiques

- **Discussion :**

Depuis déjà une trentaine d'années, les bactéries à Gram négatif sont considérées comme des pathogènes opportunistes, émergents, multi-résistants. Le plus souvent, ils sont responsables d'infections nosocomiales difficiles à contrôler et à traiter, en particulier dans les unités des soins intensifs (**Van et Goossens, 2004**).

Le *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli* sont des bactéries peut-être responsables d'infections graves (pulmonaires, septicémiques, urinaires) nécessitant l'utilisation d'antibiotiques coûteux et le plus souvent en association (**Bertrand et al., 2003**).

L'utilisation intensive d'agents antimicrobiens chez l'homme comme les animaux d'élevage est l'un des facteurs qui contribue à l'émergence des souches multi-résistantes, insensibles à une large gamme d'antibiotiques, y compris la nouvelle génération, à large spectre des  $\beta$ -lactamines, les aminosides et les Fluoroquinolones.

Les carbapénèmes et la colistine ont une puissante activité contre les souches Gram négatives jusqu'à nos jours. Ils étaient souvent utilisés pour traiter les infections causées par ces souches multi-résistantes. Malheureusement, ces dernières années, l'émergence et la propagation de la résistance aux carbapénèmes et à la colistine ont été rapportées.

Durant notre travail, on a déterminé la résistance des antibiotiques sur une série de souches prélevés de liquide utérin de vaches laitières à Tiaret. On a caractérisé phénotypiquement la résistance pour des carbapénèmes et la colistine ainsi les résistances associées (aminoside, fluoroquinolones et rifampicine).

Dans notre recherche bibliographique, nous avons remarqué qu'il y avait très peu de données disponibles sur la résistance des *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli* d'origine animale aux carbapénèmes et à la colistine en Afrique du nord, notamment en Algérie.

Nous avons enregistré une résistance aux  $\beta$ -lactamines des groupes des cephèmes, pénèmes, en moyenne de 36.3% ce qui représente le taux le plus élevé. Quant à l'imipénème du groupe carbapénèmes, une résistance de 27,2%. Pour les aminosides 27,2% et la rifampicine 81.8%.

Durant, ces dernières décennies, les souches *P. aeruginosa* et *E. coli* résistent à un nombre croissant d'antibiotiques et d'une manière de plus en plus fréquente. L'imipénème et la colistine sont alors considérés comme des antibiotiques de première intention, dans les infections, car c'est les antibiotiques les plus efficaces.

Ces bactéries constituent, ainsi, un problème majeur de santé publique, d'autant plus que très peu de nouvelles molécules sont mises sur le marché par l'industrie pharmaceutique.

Ainsi, plusieurs auteurs ont tiré la sonnette d'alarme face à ce problème de résistance (**Mendes *et al.*, 2009**). Devant, ces bactéries multi-résistantes, il est nécessaire et essentiel de rechercher les supports génétiques et le type de résistance.

Par ailleurs, des mesures de contrôle devraient être envisagées rapidement afin d'instaurer un système de veille nationale, pour superviser l'émergence et la propagation des bactéries multi résistantes dans nos fermes.

Nos résultats mettent l'accent sur l'apparition de souches résistantes aux carbapénèmes et a la colistine chez *P. aeruginosa* et *E. coli*, ce qui nous incite à mettre en place une stratégie permanente pour anticiper l'apparition de ce type de résistance chez les animaux producteurs d'aliments.

***Conclusion***

## Conclusion

La flore bactérienne intra-utérine post-partum se compose de germes saprophytes et pathogènes, Gram-positifs et -négatifs en quantités équivalente. La composition de la flore est donc variée et propre à chaque animal.

L'usage immodéré de céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, apparues dans les années 80, a notamment conduit à l'émergence de souches d'entérobactéries résistantes à ces molécules par production à haut niveau de céphalosporinases, mais aussi par production de BLSE. Ainsi, dans le traitement des infections dues à des bacilles Gram négatif, et en particulier à des entérobactéries, les carbapénèmes sont progressivement apparus comme des molécules de recours, en quelque sorte des molécules de « dernière ligne » (**Arlet et al. 2003, Philippon et al. 2005**).

L'émergence de souches résistantes aux carbapénèmes est d'actualité et souligne l'importance qu'il y a, d'une part, à en contrôler l'évolution et celle de développer, d'autre part, de nouvelles molécules notamment actives sur des souches produisant des enzymes (carbapénémases) capables d'hydrolyser les carbapénèmes. Le développement de nouvelles molécules actives sur ce type de microorganismes n'est cependant pas, du moins à l'heure actuelle, à la hauteur des attentes du thérapeute.

En outre, La colistine est un antibiotique utilisé depuis longtemps en médecine vétérinaire, principalement pour le traitement oral de groupes d'animaux de rente. Malgré l'utilisation de cet antibiotique depuis de nombreuses années, seule une faible résistance à la colistine a été observée en Suisse dans des isolats provenant d'animaux de rente.

L'objectif de cette étude était l'évaluation de la résistance des bacilles Gram négatifs (multirésistants à la carbapénèm et à la colistine) aux antibiotiques.

Notre étude a révélé que 37.5 % d'E coli étaient résistantes à la Tobramycine soit 25% à l'amoxicilline 20 ug et 12.5 % à la ceftazidime 30 ug et à l'amikacine 30ug. Les souches de P. aeruginosa ont montré différents niveaux de résistance vis-à-vis ceftriaxone à 100%, 66.6% à la triméthoprime et l'amoxicilline et 33.3% à la céfotaxine et céftazidim,

***Références***  
***Bibliographiques***

---

## ***Références bibliographiques :***

- 1- **Arlet G., Philippon A. (2003).** Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue Française des Laboratoires* 352, 41-55
- 2- **Bertrand X, Blasco G, Belle E, et al. (2003).** [*Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission]. *Ann FrAnesthReanim*; 22: 505-9.
- 3- **Boudouda R, (2015).** Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse de *Pseudomonas aeruginosa*, Université des Frères Mentouri Constantine pp 32/ 33
- 4- **Bradford BJ, Yuan K, Farney JK, Mamedova LK, Carpenter AJ (2015).** Invited review: inflammation during the transition to lactation: new adventures with an old flame. *J Dairy Sci.*;98: 6631–6650.
- 5- **Chaalal W<sup>1</sup>, Chaalal N<sup>2</sup>, Bakour S<sup>3</sup>, Kihal M<sup>4</sup>, Rolain JM<sup>5</sup>(2016).** First occurrence of NDM1 in *Acinetobacter baumannii* ST85 isolated from Algerian dairy farms. *J Glob Antimicrob Resist.* Dec;7:150-151
- 6- **Chabou S<sup>1</sup>, Leangapichart T<sup>1</sup>, Okdah L<sup>1</sup>, Le Page S<sup>1</sup>, Hadjadj L<sup>1</sup>, Rolain JM<sup>1</sup>. (2016).** *New Microbes New Infect.* ;13:71-4. Real-time quantitative PCR assay with Taqman(®) probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance.
- 7- **Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommendation, (2017).**
- 8- **Falagas,M.E., Rafailidis,P.I., and Matthaiou,D.K. (2010)** Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat* 13: 132-138.

- 
- 9- Julian. W (2017).** « Exploration au laboratoire de la résistance aux carbapénèmes chez *Enterobacter* sp. » UNIVERSITÉ TOULOUSE III – Paul SABATIER thèse 2017 TOU3 1702 Pp15.
- 10- Kipnis E., Cuery BP. (2010).** Réévaluation de la colistine. *Antibiotiques*. 12: 205-227
- 11- Le Blanc S. J Reprod (2010).** Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Dev.*;56: S29–S35.
- 12- Lee,J.Y., Na,I.Y., Park,Y.K., and Ko,K.S. (2014).** Genomic variations between colistin-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates and their effects on colistin resistance. *J Antimicrob Chemother* 69: 1248-56.
- 13- Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Vankampen CL, Wagter L, Wilkie BN (1998).** Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J DairySci.*;81:585–595.
- 14- Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN (2009).** Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. In Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother*;63: 55-9.
- 15- Meziani .M (2012).** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas* pp 16.
- 16- Munoz.G (2015).** La colistine : dernière ligne thérapeutique contre les bactéries multiresistantes , Thèse n° 089, vetagro sup campus vétérinaire de Lyon pp66.
- 17- Nordmann.P, Jayol. A., Poirel. L (2016).** Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Infect Dis.Paris*. 32 : 1038-1043.

- 
- 18- Philippon A., Arlet G. (2005).** Les  $\beta$ -lactamases chez les bacilles à Gram négatif : que de nouveautés en 15 ans ! Elsevier Masson Paris Antibiotiques 7, 247-259.
- 19- Salma. H. (2008).** Isolement et caractérisation biochimique et moléculaire de *Listeria monocytogenes* à partir des denrées alimentaires. INSA Toulouse.Pp23.
- 20- Sandra. B (2017).** Les bacilles à Gram négatifs reproducteurs de carbapénémase (BGNPC) Québec. Vol. 24 n 7,
- 21- Savadogo. M (2016).** Isolement et étude de quelques entérobactéries pathogènes dans les eaux usées de oued Boumerzoug à Constantine.Pp 32-33.
- 22- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, Jean M., Raoult, D (2009).**Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* 49, 543-551.
- 23- Van LM, Goossens H (2004).** Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect*;10: 684-704.
- 24- Watellier. P (2010).** Etude bibliographique des métrites chroniques chez la vache, *Journal of african cancer*. Ecole nationale vétérinaire de Lyon, 44.

***Annexes***

# Annexes

---

## Annexe 01 :

- **Formule de bouillon cœur cervelle**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Extrait de cœur.....	5,00
Extrait de cervelle.....	12,50
Peptone .....	10,00
Glucose.....	2,00
Chlorure de sodium.....	5,00
Phosphate disodique.....	2,50
pH final à 25°C : 7,4 ± 0,2	

## Annexes 02 :

- **Formule de milieu Mac conkey :**

- Peptone bactériologique.....	20 g
- Sels biliaires.....	1,5 g
- Chlorure.....	5 g
- Lactose.....	10 g
- Rouge neutre.....	0,03 g
- Crystal violet.....	0,001 g
- Agar.....	15 g
- pH.....	7,1

# Annexes

---

## Annexes 03 :

- **Gélose de Mueller Hinton Biomérieux**

-Infusion de viande bœuf .....	300g
-Bio-Case.....	17,5g
-Amidon .....	1.5g
-Agar .....	17g
-Eau distillé.....	1000ml

## Annexes 04 :

- **Citrate de Simmons**

-Magnesium sulfate MgSO4.....	0,2g
-Ammonium dihydrogène phosphate (NH <sub>4</sub> ) H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1g
-Phosphate dipotassium K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
-Citrate de Sodium ou acétate de sodium .....	2g
-Chlorure de sodium (NaCl).....	5g
-Agar.....	15g
-Bromothymolblue.....	0,08g
-Eau distillé.....	1000ml
-Ph 6,9 ± 0,2 à 25°C	

# Annexes

---

## Annexes 05 :

- **Bouillon De Mannitol**

-Peptone pancréatique de caséine.....	10g
-D-Mannitol.....	5g
-NaCl.....	5g
-Rouge de phénol.....	0.018g
-Eau distillé.....	1000ml

pH = 7,2 ± 0,2 à 25°

## Annexes 06:

- **Milieu Clark et Lubs**

-Peptone tryptique de viande.....	6g
-Glucose.....	5g
-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	5g
-Eau distillée.....	1000ml

## Annexes 07 :

- **Réactif de catalase**

-Eau oxygénée H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	3%
---	----

## Annexes 08 :

- **Réactif de l'oxydase**

-Diméthyle-para-phénylène diamine.....	1%
--	----

# Annexes

---

## Annexes 09 :

- **Réactifs du Barritt (VP)**

### Réactif 1:

Alpha- Naphtol.....	5%
-Alpha-Naphtol.....	50g
-Ethanol.....	1000ml

### Réactif 2:

Hydroxyde de potassium (KOH), 40% :

-Hydroxyde de potassium.....	40g
------------------------------	-----

## Annexes 10 :

- **Réactif du RM**

-Le rouge de méthyle.....	0.15mg
-Eau distillé.....	1000ml

## Annexes 11 :

- **Réactif de Kovac**

-N-amyle ou isoamyle alcool.....	150ml
-Acide hydrochlorique concentré.....	50ml
-p-diméthylaminobenzaldéhyde.....	10g

# Annexes

## Annexes 12 :

- Fiche technique de la galerie Api 20E

FICHE TECHNIQUE	<b>GALERIE API 20E</b> ®	MICRO-GALERIE
-----------------	--------------------------	---------------

### PRINCIPE :

Le système API® BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.

Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la microgalerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

Elle permet l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les *Entérobactéries*. Elle comprend 20 tests biochimiques.

### TECHNIQUE :

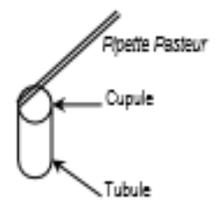
#### ⇒ Préparation de la galerie

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

#### ⇒ Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule de Suspension Medium (ou un tube d'eau distillée stérile)
- Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé
- Réaliser une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle Mc Farland)

#### ⇒ Inoculation de la galerie

Remplir les tubules et les cupules des tests du type <b>CIT</b>		<b>Remplissage des tubes :</b> 
Remplir les tubules des tests du type <b>ADH</b> et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine, pour créer l' <b>anaérobiose</b> .		
Remplir uniquement les <b>tubules</b> des tests restants		

**Remarque :** il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat. De plus l'apparition de bulles après incubation apportera un caractère d'identification supplémentaire (GAZ+)

# Annexes

## Annexes 13 :

- Tbleau de lecture de la galerie miniaturée API 20E

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E					
Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	$\beta$ -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' $\alpha$ -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> / N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> )	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

## Annexes 14:

- **Fiche technique de la galerie Api 20 NE**

---

### CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

### ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 20 NE ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements cliniques ou autres.

Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté (ex. gélose Trypase Soja) selon les techniques usuelles de bactériologie.

### MODE OPERATOIRE

#### Test Oxydase

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21<sup>ème</sup> test d'identification à noter sur la fiche de résultats.

#### Sélection des colonies

API 20 NE doit être utilisé avec des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux.

**NOTE 1 :** certaines espèces de bacilles à Gram négatif non entérobactéries qui sont oxydase négative (*S. maltophilia*, *Acinetobacter...*) sont parfaitement identifiées avec API 20 NE. On s'aidera du contexte clinique ou bactériologique pour utiliser cette galerie.

**NOTE 2 :** Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API 20 NE. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

#### Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

#### Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit ou utiliser un tube contenant 2 ml de solution saline à 0,85 %, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSlpette, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique, par aspirations ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

**NOTE :** Pour le bon fonctionnement des tests de la

### Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO<sub>2</sub> à PNPg avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSlpette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests [GLU] à [PAC] en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 29°C ± 2°C pendant 24 heures (± 2 heures).

### LECTURE ET INTERPRETATION

#### Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
  - Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPg).
  - La révélation des deux tests NO<sub>2</sub> et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO<sub>2</sub> et TRP.
  - **Test NO<sub>2</sub> :**
    - Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO<sub>2</sub>.
    - Après 5 mn, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche de résultats.
    - Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO<sub>2</sub>.
    - Après 5 mn, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc.
- La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO<sub>2</sub> ou de N<sub>2</sub>) est positive.
- La production de N<sub>2</sub> peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.
- **Test TRP :**
  - Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose

# Annexes

## Annexes 15 :

- Tableau de lecture de la galerie miniaturée API 20NE

api® 20 NE

07615K - fr - 2009/11

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
			réduction des Nitrates en azote	incolore	rose-rouge
				Zn / 5 min	
				rose	incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRYPTOPHANE)	JAMES / Immédiat	
				incolore vert pâle / jaune	rose
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUCOSE)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCULINE)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-β-D- galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-β-D- Galactopyranosidase)	incolore	jaune
[GLU]	D-glucose	1,56	assimilation (GLUCOSE)	transparence	trouble
[ARA]	L-arabinose	1,4	assimilation (ARABINOSE)	transparence	trouble
[MNE]	D-mannose	1,4	assimilation (MANNOSE)	transparence	trouble
[MAN]	D-mannitol	1,36	assimilation (MANNITOL)	transparence	trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-ACÉTYL-GLUCOSAMINE)	transparence	trouble
[MAL]	D-maltose	1,4	assimilation (MALTOSE)	transparence	trouble
[GNT]	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GLUCONATE)	transparence	trouble
[CAP]	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPRIQUE)	transparence	trouble
[ADI]	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIPIQUE)	transparence	trouble
[MLT]	acide malique	1,56	assimilation (MALIQUE)	transparence	trouble
[CIT]	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITRATE)	transparence	trouble
[PAC]	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PHÉNYLACÉTIQUE)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

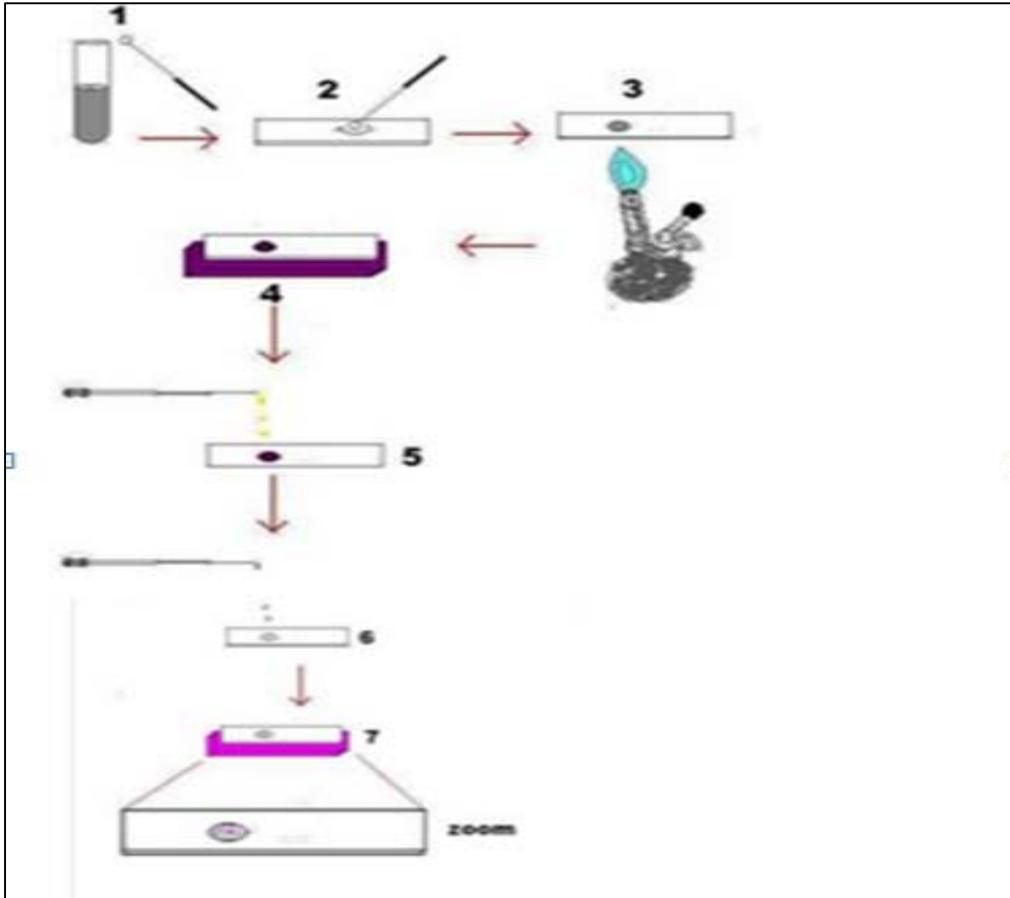
- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale notamment peptone bovine/porcine.

# Annexes

---

## Annexe 16 :

Cette coloration de Gram se réalise en 7 étapes:



- 1- On réalise un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne: on agite la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube. Avec l'aide d'une anse que l'on aura préalablement stérilisé (en la passant sous le bec benzène), on prélève un peu de la solution bactérienne en plongeant le fil de platine de la anse dans le tube à essai.
- 2- On dépose ensuite ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage.
- 3- On procède à la fixation du frottis soit avec de l'éthanol à 90° (5 minutes) puis on enflamme la lame ou on passe directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen.
- 4- La coloration au violet de Gentiane (colorant basique): la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes (en fonction de la concentration) dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau déminéralisée.

## Annexes

---

- 5- Mordançage au lugol (solution iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.
- 6- Décoloration à l'alcool: verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.
- 7- Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine: laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes. Les bactéries Gram- sont colorées en rose.