

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : Microbiologie Alimentaire et Santé



Réf : .....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

**Recherche des souches *Staphylococcus aureus*  
résistant à la méthicilline et des souches  
d'entérobactéries productrices de carbapénèmase  
dans différentes denrées alimentaires**

Présenté par : M<sup>elle</sup> TIGHILT Lilia

Soutenu le : **18 juin 2016**

Devant le jury composé de :

Mme. IDRES-KIRAMANE B	MAA	Présidente
Mr. TOUATI A	Professeur	Encadreur
Mme. TITELI F	MAA	Examinatrice

**Année universitaire : 2015/2016**

# Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

## Matériel et Méthodes

1. Échantillonnage ..... 7
2. Isolement..... 7
3. Etude de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux antibiotiques ..... 9
4. Recherche de la production d'une carbapénèmase ..... 10
5. Recherche de la production d'une métallo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ L) ..... 12
6. Déduction des phénotypes de résistances aux antibiotiques ..... 13
7. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices en milieu solide.. 15

## Résultats

1. Recherche du *S.aureus* résistant à la méticilline..... 16
2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ..... 16
3. Recherches des entérobactéries productrices de carbapénèmase ..... 19

Discussion et conclusion.....23

Références bibliographiques.....26

Annexes.....I

## **Remerciements**

Je tiens à remercier mes encadreurs, le Pr. A. TOUATI et M<sup>elle</sup> A. MAIRI pour m'avoir dirigé et guidé dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont aussi aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

*A mes deux amours, ma maman et mon petit frère*

# Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

**Introduction** 1

## Synthèse bibliographique

1. Résistance aux $\beta$ -lactamines	4
1.1. $\beta$ -lactamases à Spectre Etendu	4
1.2. AmpC	5
1.3. Carbapénèmases	6
2. Génétique de la résistance	7
2.1. Transfert inter-espèces des déterminants de la résistance	7
2.2. Plasmides et dissémination de la résistance	9

## Matériel et Méthodes

1. Souches bactériennes	11
2. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques	11
3. Détermination des phénotypes de résistance	12
3.1. Recherche de la production d'une $\beta$ -lactamase à Spectre Etendu	12
3.2. Recherche de la production d'une céphalosporinase	13
3.3. Recherche de la production d'une carbapénèmase	13
4. Transfert par conjugaison	14
5. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices en milieu solide	15

## Résultats

1. Souches bactériennes	16
2. Sensibilité des souches aux antibiotiques	16
3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	20
4. Analyse des phénotypes de résistance	21
5. Déduction des phénotypes de résistance	23
6. Taux de portage fécal des souches d' <i>E. coli</i> résistantes aux $\beta$ -lactamines à spectre étendu	26
7. Transfert par conjugaison	27

**Discussion et conclusion** 29

**Références bibliographiques** 33

**Annexes** I

# Liste des tableaux

<b>Tableau I*</b> : Schéma de la classification des $\beta$ -lactamases	<b>I</b>
<b>Tableau II*</b> : Types de BLSE rapportées chez les souches <i>E. coli</i> et autres entérobactéries isolées de chiens et de chats	<b>II</b>
<b>Tableau III*</b> : Types d'AmpC rapportées chez les souches d' <i>E. coli</i> et autres entérobactéries isolées de chiens et de chats	<b>III</b>
<b>Tableau IV</b> : Antibiotiques testés	<b>12</b>
<b>Tableau V</b> : Préparation de la gamme d'antibiotiques avec les différentes dilutions	<b>15</b>
<b>Tableau VI</b> : Prélèvements recueillis au cours de notre étude	<b>IX</b>
<b>Tableau VII</b> : Résultats des prélèvements recueillis	<b>16</b>
<b>Tableau VIII</b> : Lecture de la galerie API 20E	<b>XIV</b>
<b>Tableau IX</b> : Résultats de la sensibilité des 33 souches d' <i>E. coli</i> aux antibiotiques	<b>17</b>
<b>Tableau X*</b> : Concentrations minimales inhibitrices (mg/l) des 33 souches d' <i>E. coli</i>	<b>XV</b>
<b>Tableau XI</b> : Phénotypes de résistance probables aux $\beta$ -lactamines des souches d' <i>E. coli</i>	<b>25</b>
<b>Tableau XII</b> : Sensibilité aux antibiotiques, CMI et phénotypes de résistance obtenus des transconjugants	<b>28</b>

\* : Tableaux figurant en annexes

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Evolution des publications rapportant la résistance aux $\beta$ -lactamines à large spectre chez les animaux de compagnie.	<b>2</b>
<b>Figure 2</b> : Dissémination plausible ou avérée de la résistance aux antibiotiques à travers différents écosystèmes	<b>8</b>
<b>Figure 3</b> : Taux de résistance des souches d' <i>E. coli</i> aux $\beta$ -lactamines.	<b>18</b>
<b>Figure 4</b> : Taux de résistance des souches d' <i>E. coli</i> aux autres antibiotiques.	<b>18</b>
<b>Figure 5</b> : Comparaison entre les taux de résistance aux antibiotiques des souches d' <i>E. coli</i> isolées chez les chiens et chats.	<b>19</b>
<b>Figure 6</b> : Indices de multi-résistance calculés pour les 33 souches d' <i>E. coli</i>	<b>19</b>
<b>Figure 7</b> : Distribution des CMI vis-à-vis de la CAZ et du CTX des souches d' <i>E. coli</i> testées	<b>20</b>
<b>Figure 8</b> : Image de synergie obtenue dans le DD-test pour la souche S79	<b>21</b>
<b>Figure 9</b> : Image de synergie obtenue pour la souche S 174	<b>21</b>
<b>Figure 10</b> : Antibiogramme de la souche S65 sur gélose MH et gélose MH+cloxacilline	<b>21</b>
<b>Figure 11</b> : Résultat du test de Hodge pour les souches S99 et S100.	<b>22</b>
<b>Figure 12</b> : Résultat du Carba NP test modifié pour la souche 174.	<b>22</b>
<b>Figure 13</b> : Résultat du test à l'EDTA	<b>23</b>
<b>Figure 14</b> : Arbre décisionnel permettant d'interpréter les mécanismes de résistance des souches d' <i>E. coli</i> isolées d'animaux de compagnie aux $\beta$ -lactamines.	<b>24</b>

## Liste des Abréviations

**AAC** : Aminoglycoside Acetyl Transférase  
**AAD** : Aminoglycoside Adenyl Transférase  
**AK**: Amikacine  
**AMC**: Amoxicilline-clavulanate  
**AmpC** : Céphalosporinases  
**AN**: Acide nalidixique  
**APH** : Aminoglycoside Phosphotransférase  
**ATCC** : American Type Culture Collection  
**ATM**: Aztréonam  
**BLSE** : Bêta-Lactamases à Spectre Etendu  
**C1G**: Céphalosporines de première génération  
**C2G**: Céphalosporines de deuxième génération  
**C3G** : Céphalosporines de troisième génération  
**C4G** : Céphalosporines de quatrième génération  
**CASFM** : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie  
**CAZ**: Ceftazidime  
**CIP**: Ciprofloxacine  
**Cloxa** : Cloxacilline  
**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice  
**CTAB**: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide  
**CTX**: Céfotaxime  
**CTX-M** : Céfotaximase-Munich  
**DD-test** : Double Disc synergie test  
**EDTA** : Ethylène Diamine Tétra-Acétique  
**ERT**: Ertapénème  
**EUCAST** : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
**FEP**: Céfépime  
**FOX**: Céfoxitine  
**GN**: Gentamicine  
**I** : Intermédiaire  
**IMP**: Imipénème  
**KPC** : *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase  
**LB** : Luria Broth  
**M $\square$ L**: Métallo- $\square$ -Lactamases  
**MC** : Mac Conkey  
**MH** : Mueller Hinton  
**NDM** : New Delhi Metallo- $\square$ -lactamases  
**OXA** : Oxacilline



**PMQR:** plasmid-mediated-quinolone-resistance

**R :** Résistant

**S :** Sensible

**SHV :** Sulfhydryl Variable

**ST:** Séquence Type

**SXT:** Triméthoprime-sulfaméthoxazole

**TE:** Tétracycline

**TEM :** Temoniera

**TIC:** Ticarcilline

**TOB:** Tobramycine

**TSA :** Trypticase Soja

**TSI :** Three Sugar Iron

**TZP:** Pipéracilline-tazobactam

**UFC:** Unité Formant Colonies

*A Tous ceux qui me sont chers*

# Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Denrées alimentaires analysées.....	7
<b>Tableau II</b> : Liste des antibiotiques testés.....	10
<b>Tableau III</b> : Interprétation des résultats du Carba NP test modifié.....	12
<b>Tableau IV</b> : Préparation de la gamme d'antibiotiques avec les différentes dilutions.....	15
<b>Tableau V</b> : Prévalence des souches de SARM dans les différentes denrées alimentaires.....	16
<b>Tableau VI</b> : Distribution des CMI's vis-à-vis des différents antibiotiques et des différentes denrées alimentaires.....	17
<b>Tableau VII</b> : Résultats de la sensibilité aux antibiotiques et de l'identification des souches d'entérobactéries.....	20

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Test de Hodge.....	11
<b>Figure 2</b> : Méthode des disques combinés.....	12
<b>Figure 3</b> : EDTA synergie test .....	13
<b>Figure 4</b> : Arbre prédictif permettant d'interpréter quelques mécanismes de résistance des souches d'entérobactéries.....	14
<b>Figure 5</b> : CMI des souches SARM vis-à-vis des antibiotiques testés.....	18
<b>Figure 6</b> : Taux de résistances des souches d'entérobactéries aux $\beta$ -lactamines.....	21
<b>Figure 7</b> : Taux de résistances des souches d'entérobactéries aux autres familles d'antibiotiques.....	21
<b>Figure 8</b> : Indices de multirésistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries.....	21
<b>Figure 9</b> : Résultat du test de Hodge pour la souche MZ 19.....	22
<b>Figure 10</b> : Résultat du Carba NP test pour la souche MZ 19.....	22
<b>Figure 11</b> : Résultat du test à l'EDTA pour la souche MZ 19.....	22

## Liste des Abréviations

**AK** : Amikacine

**AMC**: Amoxicilline-clavulanate

**AN**: Acide nalidixique

**ATCC**: American Type Culture Collection

**ATM**: Aztréonam

**BHR**: Bactéries Hautement Résistantes

**BMR**: Bactéries Multi-Résistantes

**CAZ**: Ceftazidime

**CIP**: Ciprofloxacine

**CMI**: Concentration Minimale Inhibitrice

**CTX**: Céfotaxime

**DD-test**: Double Disc synergie test

**EDTA**: Ethylène Diamine Tétra-Acétique

**EPC**: Entérobactéries Productrices de Carbapénèmase

**ERT**: Ertapénème

**EUCAST**: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**FEP**: Céfépime

**FOX**: Céfoxitine

**GEN**: Gentamicine

**IMP**: Imipinème

**KPC**: *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

**MBL**: Métallo- $\beta$ -Lactamases

**MEM**: Méropénème

**NDM**: New Delhi Metallo-lactamases

**OXA**: Oxacilline

**SARM**: *Staphylococcus aureus* Résistant à la Methicilline

**SCCmec**: Staphylococcal Cassette Chromosome mec

**SXT**: Co-timoxazol

**TGC**: Tigécycline

**TIC**: Ticarcilline

**TOB**: Tobramycine

Dans le monde entier, la propagation de micro-organismes pathogènes résistants est très préoccupante. Les réservoirs de ces organismes sont en augmentation, non seulement dans les hôpitaux, mais aussi dans la communauté et l'environnement. Un développement nouveau et important est la présence de ces organismes chez le bétail, les animaux de compagnie et les animaux sauvages (Beatriz *et al.*; 2015). L'augmentation rapide de la résistance aux antimicrobiens, liée à l'élevage industriel et l'utilisation des antimicrobiens dans l'agriculture, est une menace majeure pour la santé publique (Cosgrove, 2006).

Depuis leur découverte et leur utilisation lors de la seconde guerre mondiale, les antibiotiques ont permis de faire considérablement reculer la mortalité due aux maladies infectieuses au cours du XX<sup>e</sup> siècle. Cependant, l'utilisation massive et bien souvent irraisonnée de ces antibiotiques, chez l'Homme comme chez l'animal, a conduit à l'apparition accélérée de bactéries résistantes aux antibiotiques. Combinée à la raréfaction des nouveaux antibiotiques mis sur le marché ces dernières années. L'apparition récente de bactéries multi-résistantes (BMR) insensibles à la plupart, voire à tous les antibiotiques disponibles, fait craindre un retour à l'ère pré-antibiotique (Chardon et Brugere, 2014).

On parle d'antibiorésistance lorsque certaines bactéries ne sont ni tuées ni inhibées par les doses d'antibiotiques administrées. Ce sont bien les bactéries, hébergées par l'Homme ou l'animal, qui peuvent devenir résistantes à un traitement antibiotique et, en conséquence, rendre le traitement de leur hôte inefficace. Toute utilisation d'antibiotique engendre un effet de sélection de bactéries résistantes et crée une

## *Introduction*

pression favorable à leur développement : ces bactéries vont persister, se multiplier et devenir prépondérantes. L'accroissement de la multirésistance des bactéries aux antibiotiques est ainsi directement lié à « l'arsenal génétique » dont disposent ces bactéries pour acquérir et s'échanger les gènes de résistance via des éléments génétiques mobiles tels les plasmides, les transposons et les intégrons (EFSA,2012).

À ce jour, certaines familles d'antibiotiques ne sont déjà plus efficaces contre les BMR. Pour quelques bactéries, la multirésistance peut concerner la quasi-totalité des antibiotiques, on parle de bactéries hautement résistantes (BHR), voire la totalité des antibiotiques, on parle de bactéries toto résistantes. Il est donc important de détecter toute apparition d'une nouvelle résistance et une augmentation des niveaux de résistance le plus tôt possible (Chardon et Brugere, 2014).

La présence de ces BMR est en constante augmentation dans le monde en particulier dans les denrées alimentaires et surtout dans les produits d'origines animales est dû à l'utilisation des antibiotiques en élevage. La contamination des aliments peut se produire directement à partir d'animaux infectés ou peuvent résulter d'une mauvaise hygiène au cours des processus de production, de vente et de stockage des aliments. En tant que tels, les produits alimentaires ont été impliqués comme sources potentielles pour la transmission des agents pathogènes résistants pour l'être humain (Normanno *et al.*; 2007). En outre, les aliments contaminés par des bactéries résistantes aux antibiotiques représentent les véhicules idéaux pour la transmission croisée de souches résistantes aux antibiotiques (Phillips *et al.*; 2004).

## *Introduction*

Les  $\beta$ -lactamines est une famille d'antibiotiques qui comprend un très grand nombre de molécules qui comptent parmi elles les premiers antibiotiques utilisés en médecine. Les  $\beta$ -lactamines représentent également les antibiotiques les plus utilisés en ville et à l'hôpital. Leur structure moléculaire de base est le noyau  $\beta$ -lactame associé à un cycle thiazolidine (commun aux pénicillines) ou dihydrothiazine (commun aux céphalosporines). Cette famille inclut les dérivés de la pénicilline (ou pénèmes), les céphalosporines (céphèmes), les monobactames ( $\beta$ -lactamines monocycliques), les carbapénèmes et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Ces molécules ont un spectre d'activité plus ou moins large et agissent sur les bactéries en phase de multiplication en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines liant les pénicillines (PLP), enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane (PG). Il existe 4 types de mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines: absence ou perte de perméabilité membranaire (concerne les bactéries à Gram négatif), modification des PLP de faible affinité (concerne essentiellement les bactéries à Gram positif), hyperproduction de système d'efflux et hydrolyse enzymatique (Cattoir *et al.*; 2011).

Les  $\beta$ -lactamases sont la principale cause de la résistance bactérienne aux antibiotiques chez les bactéries Gram négatives. La classification la plus largement utilisée des  $\beta$ -lactamases est la classification d'Ambler qui divise les  $\beta$ -lactamases en quatre classes (A, B, C et D) en fonction de leurs séquences d'acides aminés (Bush et Jacoby, 2010). Les carbapénèmes sont des antibiotiques de dernière ligne contre les infections causées par les bactéries Gram négatives, ils ne sont pas hydrolysés par la plupart des  $\beta$ -lactamases y compris les  $\beta$ -Lactamases à Spectre Étendu. Ces



## *Introduction*

molécules sont hydrolysées par les carbapénèmases. (Nordmann *et al.*; 2013). Ces carbapénèmases sont identifiées de façon croissante chez les entérobactéries dans le monde entier, les plus courantes sont KPC,NDM,OXA-48 –like (Nordmann *et al.*; 2013). Les isollements des entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC), principalement *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, ont augmenté à l'échelle mondiale et sont considérés comme des menaces pour la santé publique (Matsumura *et al.*; 2016). Les infections à entérobactéries productrices de carbapénèmases sont difficiles à traiter et peuvent être la source d'impasses thérapeutiques (Nordmann *et al.*; 2013).

Depuis les années 60 les bactéries multirésistantes ont émergé : d'abord les *S.aureus* résistants à la méthicilline, puis les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) et enfin les entérobactéries productrices de carbapénémases.

*Staphylococcus aureus* fait partie de la flore normale de la peau et les membranes muqueuses des êtres humains et des animaux à sang chaud, et a souvent été isolé à partir de divers produits alimentaires (Irlinger, 2008). Cependant il est également considéré comme un pathogène opportuniste. Les infections à *Staphylococcus aureus* sont facilitées par l'expression de plusieurs facteurs de virulence, qui comprennent plusieurs groupes de toxines telles que la Leucocidine de Panron-Valentine (LPV), la toxine du syndrome du choc toxique, adhésines, hémolysines, toxines exfoliative (ETA et ETB), et entérotoxines staphylococciques. L'ingestion de *S.aureus* à des doses élevées dans des produits alimentaires contaminés par des

## *Introduction*

entérotoxines staphylococciques peut produire une intoxication alimentaire. Pour cela, la présence de souches de *S.aureus* portant des gènes d' entérotoxine dans les aliments constitue un risque sanitaire pour les consommateurs (Chairat *et al.*; 2015).

En outre, *S.aureus* est capable d'acquérir une résistance multiple, qui limite les options thérapeutiques. Le SARM a été fréquemment rapportés dans les produits laitiers, généralement à faible prévalence. Le clone ST398 est particulièrement impliqué dans des cas de mammites subcliniques et cliniques. (Locatelli *et al.*; 2016). La présence du SARM ou ses entérotoxines dans les aliments est généralement indicative d'une mauvaise hygiène lors de la production alimentaire (Alarcon *et al.*; 2006).

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, retrouvés partout dans le sol, dans l'eau, et surtout dans l'intestin de l'Homme et des animaux. Elles comprennent un nombre très élevé de genres et d'espèces. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, la rapidité de leur multiplication, l'acquisition fréquente de mécanismes de résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus souvent impliquées en pathologie infectieuse humaine.

Les entérobactéries productrices de carbapénèmase (EPC), principalement *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, sont de plus en plus rapportées à l'échelle mondiale et sont considérées comme des menaces pour la santé. Les carbapénèmases les plus courantes sont KPC, NDM, OXA-48-like, mais leur répartition et leur prévalence varie selon les pays (Matsumura *et al.*; 2016).

Au cours de ces dernières années, l'émergence de ces BMR dans les denrées alimentaires a fait l'objet de plusieurs études dans le monde, mais peu d'études ont été réalisées à ce sujet en Algérie. Pour cela nous avons effectué cette étude dans le but d'étudier la prévalence de ces bactéries multirésistantes isolées de diverses denrées alimentaires.

## 1. Échantillonnage

Un total de 414 prélèvements de différentes denrées alimentaires incluant des unités de merguez, d'abats de poulets, de carcasses de poulets, d'œufs, de végétaux et de pâtisseries dans différents commerces, marchés et fermes ont été achetés et analysés pendant la période qui s'étend du 13 février 2016 au 25 avril 2016 au niveau de la wilaya de Bejaia. (Tableau n°I)

En plus de ces prélèvements, 50 échantillons de lait de vache ont été collectés durant la même période au niveau du centre de recherche des résidus d'antibiotiques Danone (Amizour). Ces échantillons proviennent de différentes communes de la wilaya de Bejaia.

**Tableau n° I : Denrées alimentaires analysées**

<b>Echantillons</b>	<b>Nombre</b>	<b>Lieu</b>
Abats	93	Marchés/commerces
Carcasses de poulets	28	Marchés/commerces
Merguez	50	Marchés/commerces
Lait de vache	50	CRRA Danone
Œufs	40	Commerces
Pâtisseries	66	Pâtisseries
Végétaux	87	Marchés
<b>Total</b>	<b>414</b>	

## 2. Isolement

### 2.1. Enrichissement

Un enrichissement est d'abord effectué pour toutes les denrées alimentaires excepté pour le lait de vache.

- L'enrichissement pour les abats, carcasses, merguez et pâtisseries a été fait en dissociant 1g de l'échantillon dans 5ml de Bouillon Trypticase Soja (TSB).

- Pour les végétaux, l'enrichissement a été fait par écouvillonnage pour certains (ex: tomates...) et pour d'autres (ex: persils...) en mettant le végétal dans un volume de 200ml de TSB.
- Pour les œufs, l'écouvillon de surface a été introduit dans 5ml de TSB et 1ml du contenu a été ajouté dans 5ml de TSB.

Après homogénéisation, les mélanges ont été incubés à 37°C pendant 1h.

## **2.2. Isolement du *S.aureus* résistant à la méticilline**

Un volume de 50µl du milieu a été ajouté à 180 µl du bouillon Giolitti Cantoni additionné de colistine (10 µg/ml) et d'oxacilline (4 µg/ml) et de tellurite de potassium.

Après 48H d'incubation à 37°C, les tubes dans lesquels un noircissement est obtenu ont été ensemencés sur gélose Baird Parker additionnée des mêmes antibiotiques que ci-dessus. Les boîtes ensemencées ont été incubées à 37°C pendant 48h en condition d'anaérobiose. Les souches du *S.aureus* résistant à la méticilline apparaissent sous forme de colonies noires, brillantes et entourées d'un halo transparent.

Les souches présumées *S.aureus* résistant à la méticilline ont été purifiées puis conservées.

## **2.3. Isolement des entérobactéries productrices de carbapénémases**

Un volume de 50µl du pré-enrichissement a été ajouté à 180 µl du TSB additionné de la vancomycine [32 µg/ml] et de l'ertapénème [0,5 µg/ml]. L'isolement se fait après 24h d'incubation à 37°C sur gélose Mac Conkey additionnée des mêmes antibiotiques que ci-dessus. Les colonies roses poussant sur gélose Mac Conkey ont ensuite été ré-isolées sur gélose Hektoen pour être purifiées.

L'identification des souches d'entérobactéries a été obtenue par l'emploi de galeries API20E (Biomérieux, France).

### **3. Etude de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux antibiotiques**

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité Européen de l'Antibiogramme ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

Les diamètres d'inhibition ont été interprétés en accord avec les recommandations de l'EUCAST 2016 (Tableau n°II).

**Tableau n°II : Liste des antibiotiques testés**

Antibiotiques	Abréviation	Charge (µg)	Famille	Diamètres critiques	
				S	R
<b>Ceftazidime</b>	CAZ	30	β-lactamines	≥22	<19
<b>Céfotaxime</b>	CTX	30	β-lactamines	≥20	<17
<b>Céfépime</b>	FEP	30	β-lactamines	≥24	<21
<b>Céfoxitine</b>	FOX	30	β-lactamines	≥19	<19
<b>Imipénème</b>	IMP	10	β-lactamines	≥22	<16
<b>Méropénème**</b>	MEM	10	β-lactamines	≥25	<25
<b>Ertapénème</b>	ERT	10	β-lactamines	≥25	<22
<b>Ticarcilline</b>	TIC	75	β-lactamines	≥23	<23
<b>Pipéracilline-tazobactam</b>	TZP	30+6	β-lactamines	≥20	<17
<b>Amoxicilline-clavulanate</b>	AMC	20+10	β-lactamines	≥16	<16
<b>Aztréonam</b>	ATM	30	β-lactamines	≥24	<21
<b>Acide nalidixique*</b>	AN	30	Quinolones	≥19	<14
<b>Ciprofloxacine</b>	CIP	5	Fluoroquinolones	≥22	<19
<b>Co-trimoxazole</b>	SXT	1,25+23,75	Sulfamides	≥16	<13
<b>Tigécycline</b>	TGC	15	Tétracycline	≥18	<15
<b>Tobramycine</b>	TOB	10	Aminoglycosides	≥17	<14
<b>Amikacine</b>	AK	30	Aminoglycosides	≥18	<15

\*L'interprétation des diamètres de l'Acide nalidixique a été effectuée selon les recommandations de l'EUCAST, 2015.

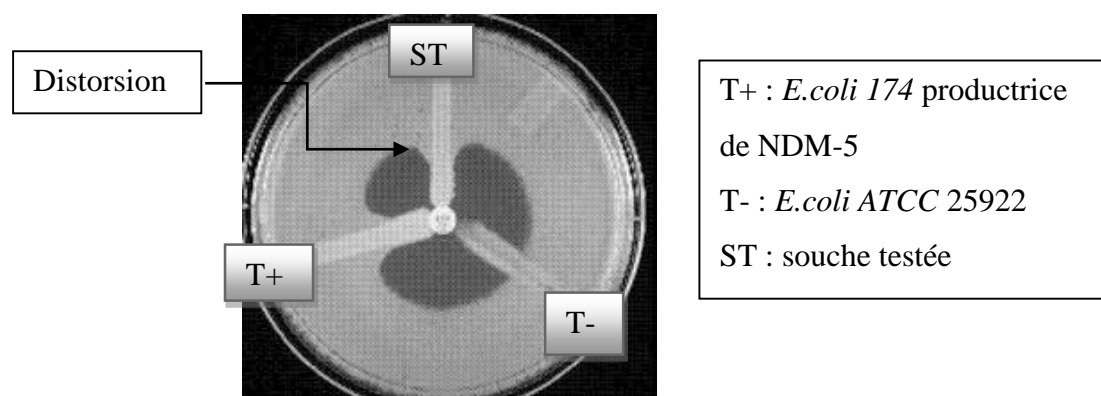
\*\*L'interprétation des diamètres du méropénème a été effectuée selon les recommandations de Maurer et al,2015.

#### 4. Recherche de la production d'une carbapénémase

##### 4.1. Test de Hodge

Un disque d'imipénème a été déposé au centre d'une gélose MacConkey préalablement ensemencé avec une souche de référence sensible aux carbapénèmes (*E.coli* ATCC 25922). Ensuite la souche à tester (ST), le témoin négatif (*E.coli* ATCC 25922) et le témoin positif (*E.coli* 174) ont été ensemencées sur la gélose sous forme de stries déposées à partir du disque d'imipénème jusqu'à la périphérie de la boîte (Figure n°1).

Après 24h d'incubation à 37°C, la production d'une carbapénémase se traduit par une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème (Lee et al.2010).



**Figure 1 : Test de Hodge**

##### 4.2. Carba NP teste modifié

Le principe de ce test repose sur la mise en évidence d'une acidification du milieu lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase. Nous avons utilisé le protocole du Carba NP test modifié (Bakour et al. ; 2015), décrit ci-dessous :

Un volume de 200µl de tampon de lyse (CTAB 0.02 %) a été placé dans un tube Eppendorf. Des colonies bactériennes ont été prélevées par une ose calibrée et ont été dissociées dans le tampon de lyse. Après homogénéisation, un volume de 100 µl du lysat a été réparti dans 2 tubes Eppendorf "A" et "B". Ensuite, 100µl de la solution



A (Annexe II) ont ensuite été ajoutés dans le tube "A" et 100µl de la Solution A+ imipénème 6mg/ml dans le tube Eppendorf "B". L'incubation a été réalisée à 37°C pendant un maximum de 2h.

La lecture visuelle de la couleur a été réalisée dans chaque tube Eppendorf et l'interprétation des résultats a été effectuée selon le tableau N°III.

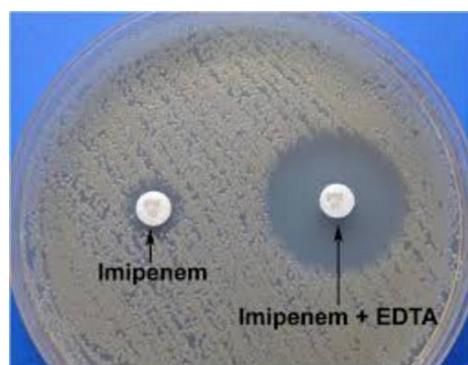
**Tableau III : Interprétation des résultats du Carba NP test modifié**

<b>Tubes A (Sans IMP)</b>	<b>Tubes B (Avec IMP)</b>	<b>Interprétation</b>
<b>Rouge</b>	Rouge	Pas de production de carbapénémase
<b>Rouge</b>	Orange/Jaune	Production de carbapénémase
<b>Jaune</b>	Jaune	Non interprétable

## **5. Recherche de la production d'une métallo-β-lactamase (MβL)**

### **5.1. Méthode des disques combinés**

Deux disques d'imipénème (IMP, 10µg) ont été déposés séparément sur la gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée avec la souche à tester. Un volume de 5µl d'une solution d'EDTA (0.5 M, pH 8) a été ajouté à l'un des disques. Après 18h d'incubation à 37°C, les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IMP-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IMP seul, d'au moins 6 mm, sont considérées comme souches productrices de MβL (Yong et al, 2002) (Figure 2).



**Figure 2 : Méthode des disques combinés**

### 5.2. Test de synergie (EDTA-test)

Un disque d'imipenème (IMP, 10 $\mu$ g) a été déposé à 15 mm d'un disque vierge imbibé de 10  $\mu$ l de la solution d'EDTA (0,5 M, pH8). La présence d'une M $\beta$ L est détectée par la visualisation d'une image de synergie entre le disque d'IMP et celui d'EDTA (Jeong et al, 2006) (Figure 3).

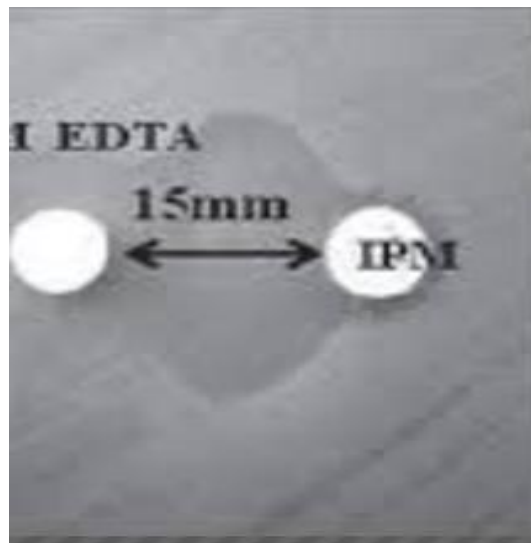


Figure 3 : EDTA synergi test

### 6. Déduction des phénotypes de résistances aux antibiotiques

Une carbapénémase de type métallo- $\beta$ -lactamase est suspectée si le test à l'EDTA est positif. Tandis que les carbapénémases de type OXA-48 sont sensibles aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération contrairement aux types M $\beta$ L et KPC qui y sont résistants, dans le cas où l'enzyme OXA-48 n'est pas associée à d'autres mécanismes (Figure 4).

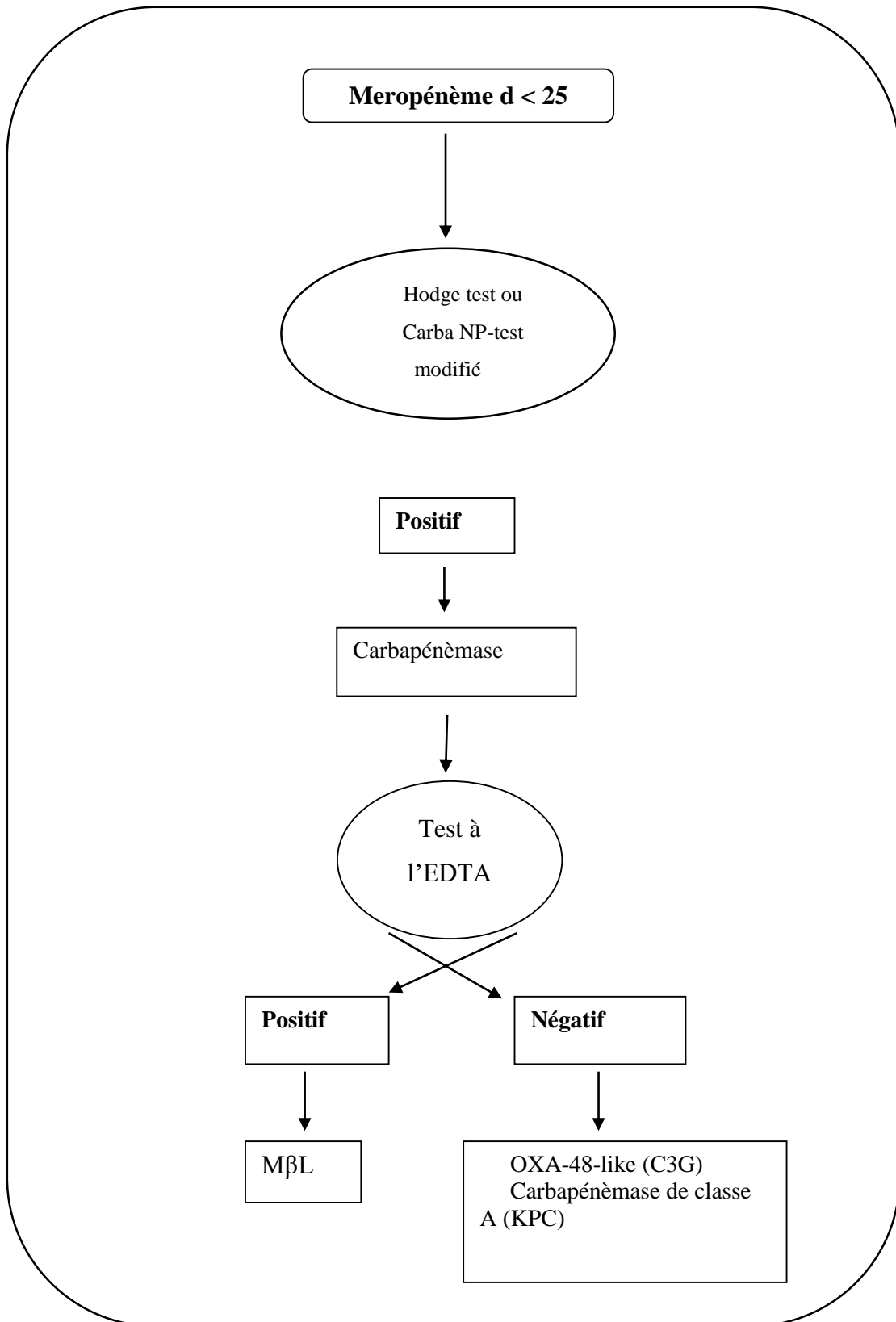


Figure 4 : Arbre prédictif permettant d'interpréter quelques mécanismes de résistance des souches d'entérobactéries

## 7. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices en milieu solide

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été effectuée pour les souches SARM.

Une solution mère de 10240 mg/l a été préparée à partir d'une poudre d'antibiotiques (oxacilline, céfoxitine et vancomycine) pour solutions injectables et aussi à partir d'antibiotiques en solution (gentamicine, ciprofloxacine et cortimoxazol). A partir de la solution mère, des dilutions (à raison de deux) ont été préparées (tableau n°IV).

**Tableau n°IV** : Préparation de la gamme d'antibiotiques avec les différentes dilutions

Solution initiale (mg/L)	Volume de solution d'ATB (ml)	Volume du Diluant (ml)	Volume total (ml)	Concentrations	
				Obtenu (mg/L)	Finale (mg/L) Dans le milieu
10240	4	4	8	5120	256
10240	2	6	8	2560	128
2560	4	4	8	1280	64
2560	2	6	8	640	32
2560	1	7	8	320	16
320	4	4	8	160	8
320	2	6	8	80	4
320	1	7	8	40	2
40	4	4	8	20	1

Après avoir préparé une série de dilutions des antibiotiques, comme ci-dessus, 1ml de ces dilutions a été incorporé dans 19 ml de gélose de Mueller Hinton en surfusion. Un inoculum bactérien d'environ 2µl a été préparé, l'ensemencement a été fait par spot et l'incubation s'est faite à 37°C / 24h (EUCAST/ESCMID, 2000).

## 1. Recherche du *S.aureus* résistant à la méticilline

Un total de 47 souches de SARM a été obtenu à partir de 414 prélèvements donnant ainsi une prévalence de 11.35%. Le tableau N°V illustre les résultats obtenus pour les différentes denrées alimentaires analysées.

**Tableau N°V : Prévalence des souches de SARM dans les différentes denrées alimentaires.**

Echantillons	Nombre de prélèvements	Nombre de SARM isolés	Prévalence
Abats	93	05	5,37%
Carcasses de poulets	28	07	25%
Merguez	50	17	34%
Lait de vache	50	17	34%
Œufs	40	00	00%
Pâtisseries	66	00	00%
Végétaux	87	01	1,15%

D'après le tableau ci-dessus, la prévalence des souches SARM dans le lait de vache et dans le merguez est élevée (34%) contrairement aux autres denrées alimentaires étudiées dont la prévalence est très faible (01% pour les végétaux et 5.37% pour les abats) voir nulle (pour les œufs et la pâtisserie).

## 2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les CMI ont été déterminées pour les 47 souches de SARM vis-à-vis de plusieurs antibiotiques, les résultats sont présentés dans le tableau N°VI et figure 5.

Tableau n°VI : Distribution des CMI vis-à-vis des différents antibiotiques et des différentes denrées alimentaires

Antibiotiques	Oxacilline						Céfoxitine				Vancomycine				Gentamicine					Ciprofloxacine					Co-timoxazol			
	2	4	8	16	32	>32	2	4	8	>8	2	4	8	>8	2	4	8	16	>16	2	4	8	16	>16	2	4	8	>8
Concentrations μg/ml																												
Aliments																												
Lait de vache	0	0	0	0	14	3	0	0	0	17	0	13	3	1	0	0	0	16	1	0	0	4	9	4	0	0	0	17
Merguez	0	0	0	1	15	1	1	0	0	16	0	3	4	10	0	1	0	12	4	0	0	1	13	3	0	2	0	15
Carcasses de poulet	0	0	0	0	4	3	0	0	2	5	0	2	1	4	0	0	0	5	2	0	0	1	3	3	0	0	0	7
Abats	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	1	0	4	0	1	0	4	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5
Végétaux	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>37</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>44</b>	<b>0</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>37</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>29</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>45</b>

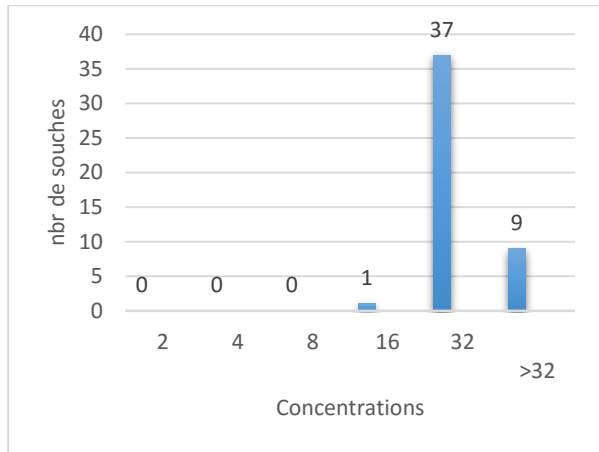


Figure 5.a : CMI des souches SARM vis-à-vis de l'OXA la VAN

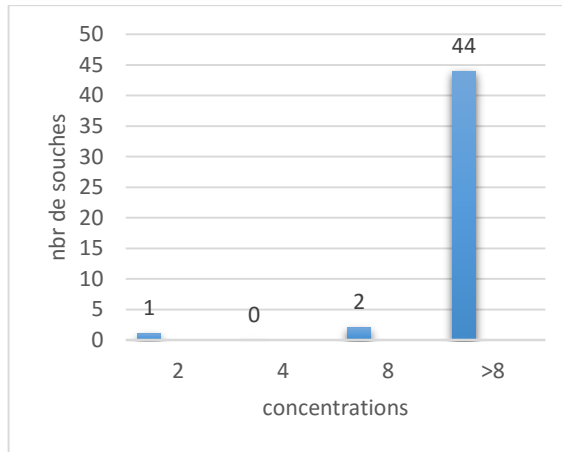


Figure 5.b : CMI des souches SARM vis-à-vis de la FOX

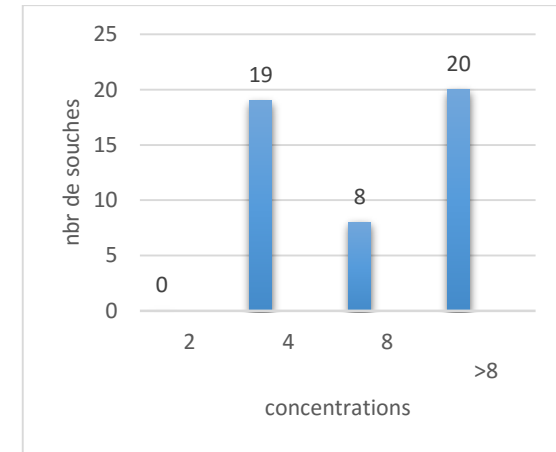


Figure 5.c : CMI des souches SARM vis-à-vis de la GEN

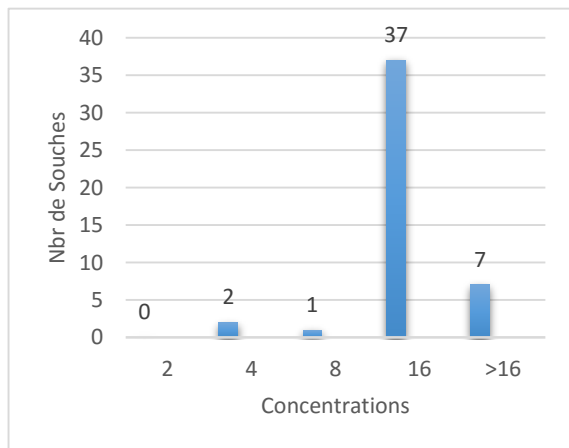


Figure 5.d : CMI des souches SARM vis-à-vis de la CIP

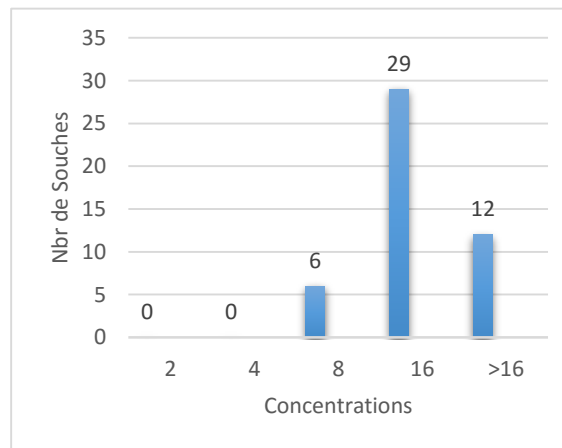


Figure 5.e : CMI des souches SARM vis-à-vis de la SXT

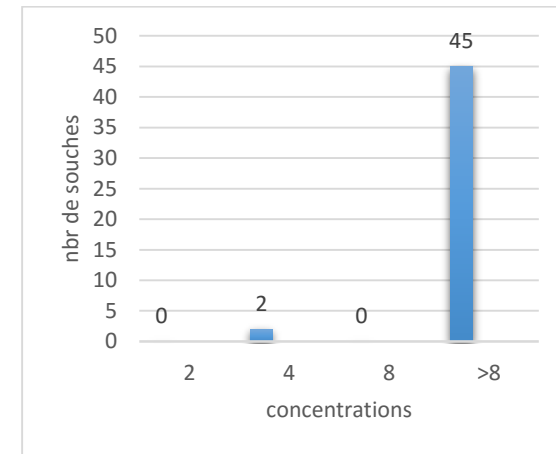


Figure 5.f : CMI des souches SARM vis-à-vis de la FOX

Figure 5 : CMI des souches SARM vis-à-vis des antibiotiques testés

### **3. Recherches des entérobactéries productrices de carbapénémase**

#### **3.1. Souches bactériennes**

Les résultats d'identification obtenus par galeries API20E ont permis d'identifier les 08 souches isolées comme étant *Klebsiella pneumoniae* (06 souches), *Enterobacter cloacae* (01 souche) et *Raoultella ornitholitica* (01 souche) (Tableau N°VII).

#### **3.2. Sensibilités des souches aux antibiotiques**

Les résultats de la sensibilité des 08 souches d'entérobactéries aux antibiotiques testés sont présentés dans le Tableau n°VII et les Figures 6 et 7. Il est à noter que toutes les souches testées sont résistantes au méropénème, amoxicilline-clavulanate, pipéracilline-tazobactam, Ticarcilline, céfoxitine et à l'ertapénème et que 87,5% des souches sont résistantes à la céfépime et 75% sont résistantes au céfotaxime et à la tobramycine et 50% au co-trimoxazole. Pour le reste des antibiotiques, les taux varient de 37,5% pour l'imipénème et l'acide nalidixique ,25% pour l'aztréonam et 12,5% pour la ceftazidime, la ciprofloxacine et la tigécycline. On note aussi que toutes les souches sont sensibles à l'amikacine.

#### **3.3. Indice de multirésistance**

L'indice de multi résistance aux antibiotiques nous renseigne sur la multirésistance de la souche. Il est calculé selon le rapport du nombre d'antibiotiques auxquels la souche est résistante sur le nombre total d'antibiotiques testés (17 dans notre étude). La figure 8 donne la distribution des 08 souches testées par rapport à leurs indices de multi résistance. On observe ainsi que cet indice varie de 0.41 à 0.82.



Tableau N°VII: Résultats de la sensibilité aux antibiotiques et de l'identification des souches d'entérobactéries

Aliment	Code	Identification	CAZ	CTX	FEP	FOX	IMP	MEM	ERT	TIC	TZP	AMC	ATM	AN	CIP	SXT	TGC	TOB	AK	Indice
Végétaux	Vgt 20.4	<i>E.cloacae</i>	27 (S)	< 17 (R)	14 (R)	< 19 (R)	26 (S)	< 25 (R)	17 (R)	< 23 (R)	< 17 (R)	< 16 (R)	16 (R)	10 (R)	33 (S)	< 13 (R)	22 (S)	18 (S)	22 (S)	<b>0,65</b>
	Vgt 21.1	<i>K.pneumoniae</i>	29 (S)	17 (I)	20 (R)	< 19 (R)	23 (S)	< 25 (R)	16 (R)	< 23 (R)	< 17 (R)	< 16 (R)	31 (S)	24 (S)	32 (S)	< 13 (R)	20 (S)	16 (I)	21 (S)	<b>0,59</b>
	Vgt 54	<i>K.pneumoniae</i>	27 (S)	19 (I)	20 (R)	9 (R)	21 (I)	< 25 (R)	15 (R)	< 23 (R)	< 17 (R)	< 16 (R)	29 (S)	24 (S)	29 (S)	26 (S)	20 (S)	16 (I)	20 (S)	<b>0,59</b>
	Vgt 60	<i>K.pneumoniae</i>	27 (S)	21 (S)	20 (R)	9 (R)	21 (I)	< 25 (R)	16 (R)	< 23 (R)	< 17 (R)	< 16 (R)	29 (S)	22 (S)	30 (S)	26 (S)	19 (S)	16 (I)	20 (S)	<b>0,53</b>
	Vgt 69	<i>K.pneumoniae</i>	30 (S)	23 (S)	23 (I)	10 (R)	23 (S)	< 25 (R)	17 (R)	< 23 (R)	< 17 (R)	< 16 (R)	33 (S)	22 (S)	30 (S)	< 13 (R)	16 (I)	18 (S)	21 (S)	<b>0,53</b>
Merguez	Mz 19	<i>R.ornitholitica</i>	30 (S)	28 (S)	28 (S)	10 (R)	25 (S)	< 25 (R)	21 (R)	< 23 (R)	< 17 (R)	< 16 (R)	35 (S)	< 14 (R)	32 (S)	29 (S)	21 (S)	17 (S)	21 (S)	<b>0,41</b>
Lait de vache	LV 6	<i>K.pneumoniae</i>	17 (R)	< 17 (R)	8 (R)	14 (R)	24 (S)	< 25 (R)	18 (R)	8 (R)	< 17 (R)	< 16 (R)	10 (R)	18 (I)	18 (R)	< 13 (R)	21 (S)	< 14 (R)	18 (S)	<b>0,82</b>
Pâtisseries	Ps 4	<i>K.pneumoniae</i>	28 (S)	16 (R)	16 (R)	< 19 (R)	20 (I)	< 25 (R)	14 (R)	< 23 (R)	< 17 (R)	< 16 (R)	32 (S)	23 (S)	37 (S)	24 (S)	20 (S)	15 (I)	19 (S)	<b>0,59</b>

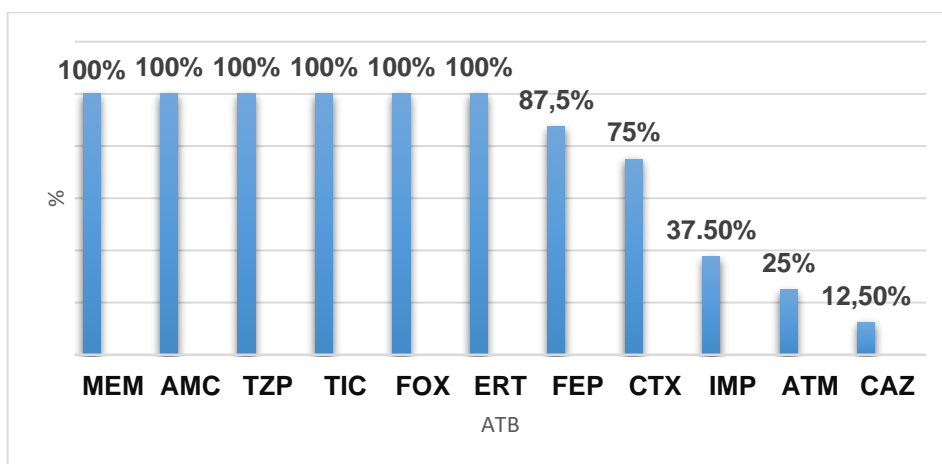


Figure 6 : Taux de résistances des souches d'entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines

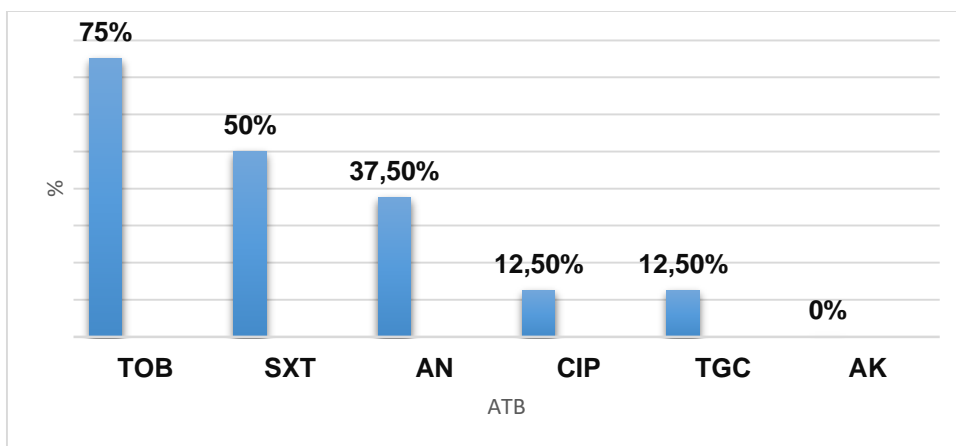


Figure 7 : Taux de résistances des souches d'entérobactéries aux autres familles d'antibiotiques

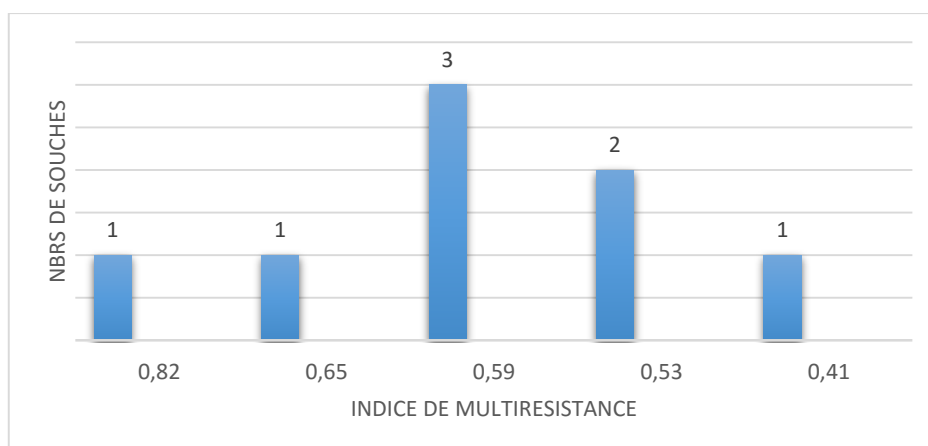


Figure 8 : Indices de multirésistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries

### 3.4. Détermination des phénotypes de résistance aux carbapénèmes

Le test de Hodge et le Carba NP test modifié ont été positifs pour les 8 souches d'entérobactéries, indiquant la production probable d'une carbapénémase (figure 9 et 10), non inhibées par l'EDTA (Figure 11), ce qui signifie que nos souches sont de type OXA-48.



Figure 9 : Résultat du test de Hodge pour la souche MZ 19

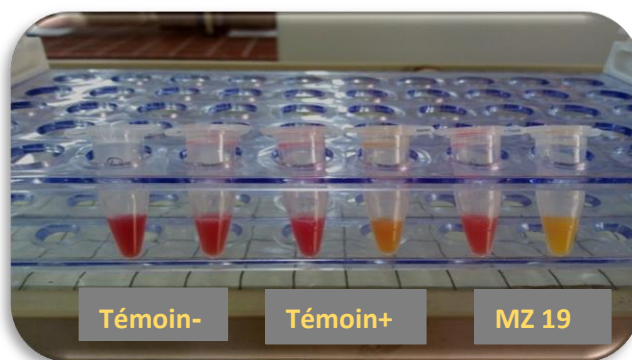


Figure 10 : Résultat du Carba NP test pour la souche MZ 19

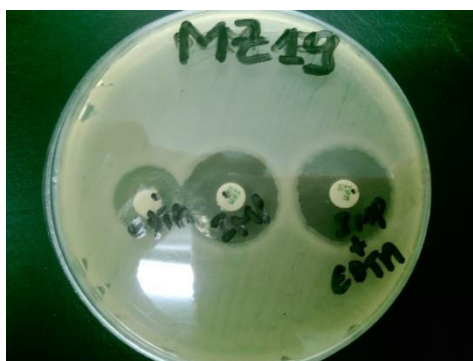


Figure 11 : Résultat du test à l'EDTA pour la souche MZ 19

L'objectif principal de notre étude est l'isolement et l'identification de BMR (SARM et EPC) dans certaines denrées alimentaires obtenues de différents commerces de la région de Bejaia. La motivation principale de notre étude est que la présence de ces bactéries pathogènes dans les denrées alimentaires pourrait être à l'origine de plusieurs infections d'origine alimentaire.

Au cours de notre étude, la prévalence des souches SARM dans les aliments analysés est de 11.35%. La présence de cet organisme dans les denrées alimentaires a été rapportée par plusieurs auteurs dans différents pays. Par conséquent, cela indique qu'il y a une possibilité de transmission de SARM et les gènes de virulence associés aux consommateurs quand ces produits sont consommés crus ou mal cuit comme le cas du lait ou des végétaux.

Les données concernant la prévalence de SARM en Algérie chez les animaux sont très limitées et la détermination de sa présence dans les produits carnés et le lait peut fournir une indication sur les risques sanitaires associés à la consommation de ces produits.

Le pourcentage de SARM dans le poulet (abats et carcasses) au cours de notre étude est de 10%. Cette prévalence est supérieure à celle rapportée par (Boost et al, 2013) tandis qu'elle est inférieure à celles rapportées par (Fessler et al, 2011 ; Sallam et al, 2015).

Concernant, la présence de SARM dans la viande, nous avons rapporté un pourcentage de 34% qui est supérieure à celui rapportés par (Chairat et al, 2015),

Pour le lait de vache, nous avons obtenu une prévalence de 34% qui est très supérieur à ceux rapportés dans d'autre pays : 2.5% en Italie (Parisi et al, 2016). Cependant, ce taux reste inférieur à celui rapportés en Egypte (El-Ashmawy et al, 2016).

La présence de ces pathogènes dans les aliments souligne l'importance du stricte encadrement des pratiques d'élevage et des procédures sanitaires durant les processus de stockage, manipulation et transport des aliments qui sont considérés comme des points critiques de la contamination croisée par *S. aureus* et les entérobactéries.

Les souches de SARM et EPC rapportées dans notre étude montrent une multirésistance aux antibiotiques. Les gènes de résistance associés peuvent ainsi avoir un impact négatif dans le traitement des infections causées par ces souches, spécialement chez les sujets immunodéprimés, les personnes âgées et les enfants. Le développement de cette multirésistance peut être attribuée à l'acquisition d'éléments génétiques mobiles codant pour de multiples gènes de résistance. Ainsi la résistance de SARM est liée à la présence dans les éléments SCCmec de plusieurs gènes de résistance comme la résistance à l'oxacilline, gentamicine...etc. Pour les EPC, différents plasmides sont connus pour véhiculer les gènes carbapénèmases associées aux autres gènes de résistance comme la résistance aux aminosides et aux quinolones.

L'utilisation des antibiotiques en élevage est connue pour être le facteur majeur responsable de l'émergence de bactéries multirésistantes dans le monde. Les pénicillines sont très largement utilisées dans les fermes au niveau de la wilaya de Bejaia pour soigner les animaux malades (bovins, ovins ou caprins), mais aussi comme des antibiotiques prophylactiques dans l'élevage de volaille. De plus, les souches résistantes aux pénicillines peuvent avoir des résistances croisées aux autres  $\beta$ -lactamines incluant les céphalosporines et les carbapénèmes.

En conclusion, dans la présente étude, des souches multirésistantes de SARM et d'EPC ont été isolées à partir d'échantillons de différentes denrées alimentaires avec

une proportion élevée dans certaines denrées. Il est évident que la présence des gènes de résistance chez ces souches est associée à l'usage incontrôlé des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, l'incidence des souches multirésistantes de SARM et d'EPC dans les aliments doit être étroitement surveillée.

Pour que notre étude soit exhaustive et significative, un certain nombre de points doivent être pris en compte:

- ✓ Augmenter le nombre d'échantillon pour chaque denrée alimentaire et élargir la zone géographique au niveau national.
- ✓ Etudier l'origine de la contamination par les BMR d'origine alimentaire et établir les points critiques.
- ✓ Etudier la clonalité des souches pour voir si ces clones sont communs à ceux isolés chez les humains et les animaux d'élevage.

**Angulo, F.; Nargund, V.; Chiller, T.** (2004). Evidence of an Association between Use of Anti-microbial Agents in Food Animals and Anti-Microbial Resistance among Bacteria Isolated from Humans and the Human Health Consequences of Such Resistance. *J. Vet. Med.* **51**, 374–379.

**Alarcón J, Foncea L, Aguila S, Alderete JB.** (2006). Biotransformation of tryptophan by liquid medium culture of *Psilocybe coprophila* (Basidiomycetes). *Z Naturforsch C.* **61**, 806-8.

**Bakour S, Olaitan AO, Ammari H, Touati A, Saudi S, Saudi K, Rolain JM.** (2015). Emergence of Colistin- and Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 Clinical Isolate in Algeria: First Case Report. *Microb Drug Resist.* **21**, 279-85

**Beatriz A, Naujorks AA, da Silva AO, Lopes Rda S, de Albuquerque S, Marques MR, de Lima DP.** (2015). Novel naphthoquinone derivatives and evaluation of their trypanocidal and leishmanicidal activities. *Org Biomol Chem.* **13**, 428-37.

**Boost, M. V., A. Wong, J. Ho, and M. O'Donoghue.** (2013). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from retail meats in Hong Kong. *Foodborne Pathog. Dis.* **10**, 705–710.

**Bush K, Jacoby GA.** (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**, 969-76

**Carmeli, Y.; Troillet, N.; Karchmer, A.W.; Samore, M.H.** (1999). Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Intern. Med.* **159**, 1127–1132.

**Cattoir V.** (2011). NXL04, un nouvel inhibiteur des B-lactamases à large spectre. *Journal des anti-infectieux.* **13**, 20-24.

**Chairat S, Gharsa H, Lozano C, Gomez-Sanz E, Gomez P, Zarazaga M, Boudabous A, Torres C, Ben Slama.** (2015). Characterization of *staphylococci aureus* from Raw Meat Samples in Tunisia: Detection of clonal Lineage ST398 from the African Continent. *Foodborne Pathog Dis.* **12**, 686-92.

**Chakraborty, S.P.; KarMahapatra, S.; Bal, M.; Roy, S.** 2015. Isolation and Identification of Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* from Post Operative Pus Sample. Available online: <http://ajms.alameenmedical.org/ArticlePDFs/AJMS.4.2.2011%20p%20152-168.pdf>

**Chardon H et Brugere H.** (2014). Usages des antibiotiques en élevage et filières viandes. Cahiers sécurité sanitaire santé animale, centre d'information des viandes (CIV).

**Cosgrove, S.E.** 2006 The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: Mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Genet. Mol. Res.* **42**, S82–S89

**de Boer, E., J. T. M. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit, X. W. Huijsdens, A. J. de Neeling, T. Bosch, R. A. A. van Oosteromb, A. Vila, and A. E. Heuvelink.** (2009). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int. J. Food Microbiol.* **134**,52–56.

**EFSA.**(2012).Europeen Food Safety.Les bactéries résistantes aux antibiotiques.  
**El-Ashmawy NE, Khedr EG, El-Bahrawy HA, Selim HM.** (2016).Nebivolol prevents indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Immunotoxicol.* **25**,1-10.

**European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).** (2000), EUCAST Definitive Document E.DEF 3.1, June 2000: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect.* **6**, 509-15.

**European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).** (2015), EUCAST Definitive Document : Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect.* **6**, 509-15.

**European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).** (2016), EUCAST Definitive Document : Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect.* **6**, 509-15.

**Fessler AT, Kadlec K, Hassel M, Hauschild T, Eidam C, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S.** (2011).Characterization of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. *Appl Environ Microbiol* ;**77**,7151–7157.

**Fuda, C.; Suvorov, M.; Vakulenko, S.B.; Mobashery, S.** (2004).The basis for resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Biol.Chem.* **279**, 40802–40806.

**Haran, K. P., S. M. Godden, D. Boxrud, S. Jawahir, J. B. Bender, and S. Sreevatsan.**(2012). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. *J.Clin. Microbiol.* **50**,688–695

**Hsueh, P.R.; Chen, W.H.; Luh, K.T.**(2005). Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991–2003 at a university hospital in Taiwan. *Int. J. Antimicrob.* **26**, 463–472



**Huong, B.T.M.; Mahmud, Z.H.; Neogi, S.B.; Kassu, A.; Nhien, N.V.; Mohammad, A.; Yamato, M.; Ota, F.; Lam, N.T.; Dao, H.T.A.**(2010). Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready-to-eat foods. *Food Control*, **21**, 166–171

**Irlinger F.**(2008). Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol.***126,302-10**.

**Kitai, S., A. Shimizu, J. Kawano, E. Sato, C. Nakano, H. Kitagawa, K. Fujio, K. Matsumura, R. Yasuda, and T. Inamoto.** (2005). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **67,269–274**.

**Kreausukon, K., A. Fetsch, B. Kraushaar, K. Alt, K. Müller, V. Krömker, K.-H. Zessin, A. Käsbohrer, and B.-A. Tenhagen.** 2012. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *J. Dairy Sci.* **95,4382–4388**.

**Le Loir, Y.; Baron, F.; Gautier, M.**(2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* **2**, 63–76

**Lim, D.; Strynadka, N.C.** (2002). Structural basis for the  $\beta$ -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Struct. Mol Biol.* **9**, 870–876.

**Lim, S. K., H. M. Nam, H. J. Park, H. S. Lee, M. J. Choi, S. C. Jung, J. Y. Lee, Y. C. Kim, S. W. Song, and S. H. Wee.** (2010). Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw meat in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20,775–778**.

**Locatelli SM, LaVela SL.**(2016) Documentation of weight management practices for individuals with spinal cord injuries and disorders. *Spinal Cord*.

**Lozano C, Go ´mez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C.**(2011). *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int J Med Microbiol.***301,500–505**.

**Lozano, C., M. Lopez, E. G ´omez-Sanz, F. Ruiz-Larrea, C. Torres, and ´M. Zarazaga.** (2009). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **64,1325–1346**

**Matsumura Y, Yano M, Yoshida J, Koike T, Kameyama K, Shimamoto A, Nishio W, Yoshimoto K, Utsumi T, Shiina T, Watanabe A, Yamato Y, Watanabe T, Takahashi Y, Sonobe M, Kuroda H, Oda M, Inoue M, Tanahashi M, Adachi H, Saito M, Hayashi M, Otsuka H, Mizobuchi T, Moriya Y, Takahashi M, Nishikawa S, Suzuki H.**(2016). Japanese Association for Chest Surgery Early and late recurrence after intentional limited resection for cT1aN0M0, non-small cell lung cancer: from a multi-institutional, retrospective analysis in Japan. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* **25**,125.

**Maurer FP1, Castelberg C1, Quiblier C1, Bloemberg GV1, Hombach M2.**(2015). Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with Enterobacteriaceae and development of a practical diagnostic algorithm. *J Clin Microbiol.* **53**,95-104.

**Naujorks AA, da Silva AO, Lopes Rda S, de Albuquerque S, Beatriz A, Marques MR, de Lima DP.** (2015). Novel naphthoquinone derivatives and evaluation of their trypanocidal and leishmanicidal activities. *Org Biomol Chem.* **14**;13,:428-37.

**Nordmann P, Poirel L.**(2013). Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* **68**,487-9

**Nordmann P.**(2010). Gram-negative bacteria with resistance to carbapenems. *MedSci (Paris).* **26**,950-9.

**Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC,M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E,Celano GV.**(2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int J Food Microbiol* ;**115**,290–296.

**Normanno, G.; La Salandra, G.; Dambrosio, A.; Quaglia, N.; Corrente, M.; Parisi, A.; Santagada, G.; Firinu, A.; Crisetti, E.; Celano, G.** Occurrence.(2007). characterization and antimicrobial resistance of **enterotoxigenic** *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **115**, 290–296.

**Phillips, I.; Casewell, M.; Cox, T.; de Groot, B.; Friis, C.; Jones, R.; Nightingale, C.; Preston, R.; Waddell, J.** (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 28–52.

**Sallam KI, Abd-Elghany SM, Elhadidy M, Tamura T.**(2015) Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance Profile of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Retail Chicken. *J Food Prot.* **78**,1879-84.

**Silbergeld, E.K.; Graham, J.; Price, L.B.**(2008). Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu. Rev. Public Health* , **29**, 151–169.

## *Références bibliographiques*

**Spanu, V.; Spanu, C.; Viridis, S.; Cossu, F.; Scarano, C.; de Santis, E.P.L.**(2012). Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **153**, 53–57.

**Vázquez-Sánchez, D.; López-Cabo, M.; Saá-Ibusquiza, P.; Rodríguez-Herrera, J.J.** (2012). Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). *Int. J. Food Microbiol.* **157**, 286–296.

**Wang, X., X. Tao, X. Xia, B. Yang, M. Xi, J. Meng, J. Zhang, and B. Xu.** (2013). *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken in China. *Food Control* **29**,103–106.

**Weese, J. S., B. P. Avery, and R. J. Reid-Smith.** (2010). Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. *Lett. Appl. Microbiol.* **51**,338–342.

**Westh, H.; Zinn, C.S.; Rosdahl, V.T.**(2004). An international multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from 15 hospitals in 14 countries. *Microb. Drug Resist.* **10**, 169–176.

**Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y.** (2002). Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* **40**, 3798e801.

## ANNEXE I

## Composition des milieux de culture et réactifs (en g/l)

**Gélose Mac Conkey**

Peptone de caséine.....	17 g
Peptone de viande.....	3 g
Lactose .....	10 g
Mélange de sels biliaires.....	1.5 g
Chlorure de sodium .....	5 g
Rouge neutre .....	0.03 g
Cristal violet .....	0.001 g

pH 7.3

**Gélose Mueller Hinton**

Infusion de viande de bœuf .....	3 g
Hydrolysate de caséine .....	17.5 g
Amidon .....	1.5 g
Agar .....	17 g

pH 7,4

**Gélose Hektoen**

Peptone pepsique de viande.....	12 g
Extrait autolytique de levure.....	3 g
Lactose .....	12 g
Saccharose .....	12 g
Salicine.....	2g
Sels biliaires.....	9g
Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfate de sodium.....	5g
Citrate ferrique ammoniacal.....	1.5g
Bleu de bromothymol.....	65mg
Fucshine acide.....	40mg

Agar agar bactériologique.....13.5g

pH 7,6

### **Gélose Baird Parker**

Peptone ..... 10 g

Extrait de viande de bœuf ..... 4 g

Extrait de levure ..... 2 g

Pyruvate de sodium ..... 10g

Glycocolle ..... 12g

Chlorure de lithium ..... 5 g

Agar-agar ..... 20 g

A ajouter en conditions stériles juste avant l'ensemencement :

- Émulsion de jaune d'œuf ..... 50 ml

- Tellurite de potassium..... 0,1 g

pH 7.2

### **Bouillon Trypticase soja**

Peptone trypsique de caséine ..... 17 g

Peptone papainique de soja ..... 3 g

Chlorure de sodium ..... 5 g

Phosphate bipotassique ..... 2 g

Glucose ..... 2 g

pH 7.3

### **Bouillon Géolitti Cantoni**

Trypton ..... 10 g

Extrait de viande..... 5 g

Extrait de levure..... 5 g

Glycine..... 1.2g

Mannitol..... 20 g

Pyruvate de sodium.....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Chlorure de lithium.....	5g
Tween 80.....	1g

pH 6,9

## **ANNEXE II**

### **Préparation de la solution A**

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

- 1- Préparer une solution concentrée de rouge de phénol 0.5% poids/volume.
- 2- Mélanger 2ml de la solution concentrée de rouge de phénol dans 16.6ml d'eau distillée.
- 3- Ajouter au mélange 180 $\mu$ l d'une solution de ZnSO<sub>4</sub> 10mM pour obtenir une concentration finale de ZnSO<sub>4</sub> à 0.1mM.
- 4- Ajuster le pH à 7 avec une solution de NaOH (1N).

## Résumé

L'objectif de notre étude est la recherche des souches de *S.aureus* résistant à la méthicilline et des entérobactéries productrices de carbapénémases. Un total de 414 prélèvements a été effectué à partir de différentes denrées alimentaires (merguez, poulets, œufs, lait de vache, végétaux et pâtisseries). Pour les EPC, après isolement, la sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion. La production de carbapénémase a été déterminée par l'utilisation de différents tests phénotypiques incluant le Hodge test, le Carba NP test modifié ainsi que le test à l'EDTA. Pour le SARM, après isolement, des CMI ont été déterminées vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques.

Au total 08 souches d'EPC et 47 souches de SARM ont été isolés avec des prévalences de 1.93% et 11.35% respectivement. Des taux de résistance des souches EPC aux  $\beta$ -lactamines allant de 12.5% pour la ceftazidime jusqu'à 100% pour le méropénème ont été enregistrés. La totalité des souches SARM ont présenté une résistance à l'oxacilline et à la céfoxitine.

**Mots clés :** denrées alimentaires, SARM, EPC, carbapénémase, Bejaia.

## Abstract

The aim of this study is the determination of the prevalence of *S. aureus* strains resistant to methicillin and producing enterobacteria carbapenemases isolated from food. A total of 414 food samples were taken from different sources (sausages, chickens, eggs, cow's milk, vegetables and pastries). For ECP, after isolation, the sensitivity of strains to antibiotics was determined by the disc diffusion diffusion method; carbapenemase production was determined by the use of different phenotypic tests including Hodge test, the modified Carba NP test EDTA test. For MRSA, after isolation, the MICs were carried out from different antibiotics.

8 ECP strains and 47 strains of MRSA were isolated with prevalence of 1.93% and 11.35% respectively. Resistance rate of ECP strains to  $\beta$ -lactams from 12.5% to ceftazidime to 100% for meropenem. All MRSA strains have shown resistance to oxacillin and cefoxitin.

**Key words :** food, MRSA, ECP, carbapenemase.