

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

***Caractérisation des phénotypes de résistance
aux β -lactamines des souches
d'entérobactéries isolées du lait cru***

Présenté par :

M^{elle} BOUDEHOUCHE Wafa

Soutenu le : **13 Juin 2015 à 08H30**

Devant le jury composé de :

M^{me}.TETILI Fatiha

M^r. TOUATI Abdelaziz

M^{me} .MESSAOUDI..Kahina

MAA

Professeur

MCB

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant pour m'avoir accordé santé et courage pour accomplir ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et vifs remerciements à mon promoteur le professeur Touati .A pour m'avoir guidé pour la réalisation de ce modeste travail. Pour sa présence, son écoute et sa disponibilité. Une personne que j'admire beaucoup.

Il faut souligner que les travaux de ce mémoire ont été possibles grâce à la bonne volonté, la grande générosité et la disponibilité des éleveurs, qui m'ont ouvert leurs étables pour les prélèvements.

Je tiens énormément à leur exprimer ma gratitude et mes sincères remerciements.

Je remercie les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce document.

Dédicaces

*A la mémoire de mes défunts grand parents : Zohra, Hassnae, Amar,
et larbi.*

A la source de mon bonheur, secret de ma force.

*Ma douce et tendre maman, mon ange gardien, ma vie, symbole de
bonté et d'affection, Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu
as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que dieu te
donne longue vie et te protège pour moi.*

*Mon papa, l'homme de ma vie, mon protecteur, que j'admire
beaucoup ; Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout
du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail
mon amour sincère et ma gratitude profonde.*

*Merci pour tous vos sacrifices, merci de m'encourager sans relâche,
merci d'être tout simplement ce que vous êtes « mes parents ».*

A Mama-mila adorée que dieu te garde près de nous.

A mes frères: Abdel Ghani, Mohammed Djallal, Adel Amine

A mes sœurs : Badra, Hania, Bahia, Hanane et Imane.

A ma belle-sœur et mes beaux-frères.

A mes oncles et tantes chacun son nom.

A mes neveux et nièces.

A Hama, Dr. Cherifi Mohamed el Hadi

A mes meilleurs : Kamel, Amira et Sabrina.

*A mes amis : Nadia, Djamila, Celia, Lydia, Selma, Fairouz, Meriem,
Amine, Yacine, Ghiles, Amirouche, et Fatima, Toufik.*

A toute la promotion de microbiologie 2015.

Wafa

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....01

Matériel et méthodes

1	Origine et prélèvement des échantillons.....	06
2	Contrôle bactériologique des échantillons de lait.....	06
3	Recherche des souches d'entérobactéries productrices de β - lactamases.....	08
3-1	Isolement à partir du lait et du pis.....	08
3-2	Etudes de la sensibilité des souches sélectionnées aux antibiotiques.....	08
4	Détections des phénotypes de résistance.....	10
4-1	Détection de la production de BLSE.....	10
4-2	Recherche de la production de carbapénémases.....	10
4-2-1	Détection de la production de carbapénémases par le Hodge test modifié.....	10
4-2-2	Détection de la production de carbapénémases par le Carba NP test modifié....	10
4-2-3	Détection des metallo- β -lactamases (M β L) : Test à l'EDTA.....	11
5	Transfert par conjugaison.....	12

Résultats

1	Contrôle de la qualité bactériologique du lait cru.....	13
2	Recherche des entérobactéries résistant aux de carbapénèmes.....	14
	Souches bactériennes.....	14
	Sensibilités aux antibiotiques.....	14
	CMI à l'imipénème.....	15
3	Détermination des phénotypes de résistance.....	16
	Recherche de BLSE.....	16
	Recherche de la production de carbapénémase.....	16
4	Transfert par conjugaison.....	18

Discussion et Concluions

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase

AK : Amikacine

AMC : Amoxicilline + Clavulanate

ASR : Anaérobiose sulfito-réducteurs

ATM : Aztréonam

bla : Bêta-lactamase

BLSE : Bêta-Lactamases à Spectre Etendu

CG1; Céphalosporines de première génération

CG2 : Céphalosporines de deuxième génération

C3G : Céphalosporines de troisième génération

C4G : Céphalosporines de quatrième génération

CARB : Carbenicillin-hydrolyzing bêta-lactamase

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CAZ: Ceftazidime

CIP: Ciproflaxacime

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide,

CTX: Céfoxitine

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CTX-M : Cefotaximes-Munich

DD-test: Double Disque synergie test

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

ERT: Ertapénème

EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FEP: Céfépime

FOX: Céfotaxime

GC : Giolitti cantoni

GES: Guiana extended spectrum β -lactamase

IMI: Imipenem-hydrolyzing β -lactamase

IMP: Imipénème

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne

KPC: *Klebsiella Pneumoniae* Carbapénèmase

LDC: Lysine Décarboxylase

MβL : Métallo -β -Lactamase

MER : Méropénème

MH: Mueller Hinton

NDM: New Delhi metallo-β-lactamase

NPP : Nombre le Plus Probable

ODC : Ornithine Décarboxylase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OXA : Oxacillinases

PER: Pseudomonas Extended Resistant

PLP: Protéines Liant Pénicillines

R: Resistant

RM: Rouge de méthyle

S: Sensible

SHV: Sulfhydryl Reagent Variable

TEM: Temoneira

TET: Tétracycline

TIC: Ticarciline

TSA: Trypticase Soja Agar

TSI: Three Sugar Iron

VBL: Vert brilliant lactose

VEB: Vietnamese Extended Spectrum Beta-lactamase

VF: Viande foie

VIM: Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase

VP: Voges Proskauer

PCA: Plate Count Agar

Liste des tableaux

Tableau I : Germes recherchés et dénombrés pour le contrôle bactériologique du lait.	7
Tableau II : liste des antibiotiques testés.....	9
Tableau III : Interprétation des résultats du Carba NP test modifié.....	10
Tableau IV : Valeurs seuils des critères bactériologiques du lait cru (JORA, 1998).....	12
Tableau V : Résultats du contrôle bactériologique du lait cru.....	Annexe III
Tableau VI : Résultats des diamètres d'inhibitions des souches et leur phénotype	Annexe VI
Tableau VII : Les CMI obtenues pour l'antibiotique testé Imipénème.....	14

Liste des figures

Figure 1 : Taux de résistance des souches d'entérobactéries aux antibiotiques.	13
Figure 2 : Taux de résistance des souches d' <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter sp</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	14
Figure 3 : Figure 3 : DD-test Positif pour la souche <i>Klebsiella pneumoniae</i> 17 L.....	15
Figure 4 : Hodge test Positif souche <i>Klebsiella pneumoniae</i> 17 L	15
Figure 5 : Carba NP-test Positif pour la souche <i>Klebsiella pneumoniae</i> 29L et <i>E.coli</i> 30EC...16	
Figure 6 : Test- EDTA Positif pour la souche <i>E.coli</i> MVI 30 Ec.....	16

INTRODUCTION

1 Dans la pyramide alimentaire, outil de référence qui représente une alimentation
2 équilibrée, le lait et les produits laitiers se situent au même niveau que la viande. La
3 consommation des produits laitiers y est conseillée à raison de 2 ou 3 fois par jour pour
4 atteindre les recommandations d'apport journalier en calcium (Conseil supérieur de la santé,
5 2009). Le lait contient des nutriments essentiels pour l'être humain : eau, lipides, protéines
6 (principalement de la caséine), acides aminés, vitamines et minéraux. Il contient également
7 des constituants bioactifs comme des enzymes. La composition du lait varie en fonction de
8 l'espèce, de la race, de l'alimentation des animaux et du stade de lactation. Il constitue une
9 excellente source de vitamines B. Le lait cru contient plus de vitamines B2 qu'un lait traité
10 thermiquement (Macdonald et *al.*, 2011).

11 Un litre de lait cru contient plusieurs milliards de micro-organismes, cette
12 caractéristique différencie le lait cru des laits traités thermiquement ou microfiltrés. Selon le
13 règlement européen 853/2004 le lait cru est «le lait produit par la sécrétion de la glande
14 mammaire d'animaux d'élevage et non chauffé à plus de 40 °C, ni soumis à un traitement
15 d'effet équivalent». Ce qui caractérise le lait cru c'est sa diversité microbienne (Michel et *al.*,
16 2001). Peu de travaux récents ont été consacrés à un inventaire de la diversité microbienne
17 des laits crus. Mallet et *al.*, révèlent la présence d'au moins une quarantaine de genres
18 microbiens différents, avec près de 150 espèces différentes (Mallet et *al.*, 2010). En ce qui
19 concerne les laits de chèvre, des travaux ont mis en avant près d'une quarantaine de genres
20 microbiens différents (Callon et *al.*, 2007). Ce monde microbien appelé flore microbienne a
21 des implications à plusieurs niveaux, sa diversité microbienne est utile pour la transformation
22 des produits laitiers mais peut aussi impliquer la présence de bactéries potentiellement
23 pathogènes pour l'homme (Oliver et *al.*, 2009).

24 Le lait cru a été longtemps reconnu comme le véhicule de micro-organismes
25 pathogènes. En 1966, l'organisation mondiale de la santé publiait la monographie (N°48)
26 concernant l'hygiène du lait. Elle consacre, à l'époque, 66 pages au chapitre intitulé «
27 maladies transmissibles par le lait (OMS, 1966). Sa contamination peut être originelle ou se
28 produire pendant la manipulation (OMS 1968). L'importance des aliments en tant que source
29 de transmission de nombreuses maladies a été documentée pendant une longue période. La
30 présence des micro-organismes tels que *Salmonella spp*, *Escherichia coli O15:H7*,
31 *Staphylococcus aureus*..., peut conduire à de nombreuses épidémies d'origine alimentaire
32 (Wells et *al.*, 1991 ; Sahebkhitiari et *al.*, 2011).

33 En plus de la médecine humaine et vétérinaire, les antibiotiques sont très largement
34 utilisés dans les milieux agricoles, tels que pour le traitement des infections, l'amélioration de
35 la croissance et la prophylaxie chez les animaux d'élevage (Rasheed et *al.*, 2014). On a
36 estimé, à l'échelle mondiale, qu'on utilise plus d'antimicrobiens pour traiter des animaux en
37 bonne santé que des humains malades (OMS, 2012). Ainsi par exemple, on estime qu'en 2009,
38 aux États-Unis, près de 80 % de la totalité des antibiotiques pouvant être administrés aussi
39 bien aux humains qu'aux animaux d'élevage étaient destinés au bétail et à la volaille (Edwards
40 et *al.*, 2012). En 2012, le Danemark a utilisé 103 tonnes d'antibiotiques chez le bétail et 50
41 tonnes chez l'homme (DANMAP, 2012).

42 L'utilisation abusive d'antibiotiques induit des changements dans la flore digestive des
43 animaux entraînant l'émergence de souches résistantes (Fabre et *al.*, 2000), aussi, le non-
44 respect des délais d'attente après les traitements entraîne la présence des résidus
45 d'antibiotiques dans les produits alimentaires. En effet, des travaux ont mis en évidence dans
46 des laits crus et pasteurisés, yaourts, fromages, crème fraîche, beurre et des boissons
47 fermentées, des résidus d'antibiotiques tels que les bêta-lactamines, les macrolides, les
48 pénicillines, les aminosides, et les tétracyclines, à des doses importantes (Hilan et Chemali,
49 1998 ; Khaskheli et *al.*, 2008 ; Titouche et *al.*, 2013 ; Mensah et *al.*, 2014). En Algérie, 89%
50 des laits provenant des animaux d'élevage des Wilayas, Blida, Alger, Tipaza et Médéa ont
51 donné des résultats positifs lors du contrôle des résidus de tétracyclines et 65,46 % lors du
52 contrôle des résidus de bêta-lactamines (Tarzaali et *al.*, 2008), et (46,78%) de lait provenant
53 de Tizi Ouzou sont positifs, la plupart d'entre eux contiennent de la pénicilline et /ou de la
54 tétracycline, suivie de la famille des macrolides et / ou aminoglycosides (Titouche et *al.*,
55 2013). Par ailleurs, environ 29 % des échantillons de lait produit dans l'Ouest algérien
56 contiennent des résidus d'agents antibactériens (Aggad et *al.*, 2009).

57 De nombreux résultats suggèrent que l'utilisation abusive des antibiotiques dans
58 l'élevage entraîne l'émergence de bactéries résistantes et multirésistantes aux antibiotiques et
59 rend le traitement des infections bactériennes plus difficile, cette résistance a été reconnue
60 comme un problème mondial émergent en médecine humaine et vétérinaire (Rasheed et *al.*,
61 2014).

62 Par conséquent l'apparition et la diffusion de la résistance aux antibiotiques chez les
63 bactéries constituent une menace pour la santé humaine et présente un fardeau financier
64 important (Rule et *al.*, 2008). Une autre conséquence de cette résistance est que le choix des
65 traitements se trouve limité. Le traitement aux antibiotiques peut aussi mener à l'émergence et

66 à la sélection de bactéries commensales résistantes dans le tube digestif (Vedantam et Hecht,
67 2003).

68 L'utilisation d'antibiotiques dans la production animale a provoqué une augmentation
69 de la résistance au sein des membres de la famille des Enterobacteriaceae, avec comme
70 mécanisme de résistance le plus rapporté, la production de différents type de β -lactamases
71 incluant les β -lactamases à spectre étendu, céphalosporinases plasmidiques et carbapénèmases
72 (Ojer-Usoz et *al.*, 2013). Les gènes codant pour ces enzymes sont principalement situés sur
73 des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons...), expliquant la rapidité de leur
74 diffusion (Grall, 2011).

75 Les β -lactamines constituent une famille majeure d'antibiotiques très largement utilisées
76 en pratique clinique. Ces molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne
77 par fixation aux protéines liant la pénicilline (PLP), enzymes impliquées dans la synthèse du
78 peptidoglycane. Chez les bacilles à Gram négatif (BGN), il existe 3 types de mécanismes de
79 résistance aux β -lactamines : la faible affinité pour les PLP, les phénomènes d'imperméabilité
80 et d'efflux, et surtout l'inactivation enzymatique par les β -lactamases (Cattoir, 2011)

81 En quelques années, les β -lactamases ont évolué parallèlement à l'utilisation massive
82 des β -lactamines. On a constaté une rapide diversification accompagnée d'élargissement de
83 leur spectre d'activité, et leur diffusion parmi de nombreuses espèces d'entérobactéries. Ainsi
84 plus de 400 β -lactamases dont plus de 200 β -lactamases à spectre étendu ont été décrites, et
85 aucune β -lactamine, seule ou en association avec des inhibiteurs de β -lactamases, n'est
86 invulnérable à leur action potentielle (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

87 La première β -lactamase a été identifiée dans un isolat d'*Escherichia coli* en 1940
88 (Abraham et Chain, 1940), et les premières β -lactamases plasmidiques (TEM-1/2, SHV-1) ont
89 été décrites dans les années 60 chez *E.coli* et *Klebsiella pneumoniae* et ont très vite diffusé
90 parmi d'autres espèces (Bradford, 2001). Au début des années 1980, seules les enzymes
91 plasmidiques TEM-1, TEM-2 et SHV-1 étaient connues (Rodriguez-Villalobos et Struelens
92 ,2006). Cependant, l'utilisation intensive des β -lactamines à spectre large (C3G,...) en clinique
93 s'est suivie de l'apparition précoce de β -lactamases capables de les hydrolyser, la 1ere β -
94 lactamase à spectre étendu SHV-2 dérivant par mutation ponctuelle de SHV-1 a été décrite en
95 1985 chez des souches de *K. pneumoniae* en Allemagne (Bradford, 2001).

96 Les deux schémas les plus utilisés pour la classification des β -lactamases sont celui
97 d'Ambler qui est fondé sur l'homologie de séquence des acides aminés et de Bush-Jacoby qui
98 est fondé sur les propriétés fonctionnelles des enzymes. La classification d'Ambler divise les
99 β -lactamases en quatre groupes (de A à D). Les groupes A, C et D contiennent des β -
100 lactamases ayant une molécule sérine dans leur site actif. Les β -lactamases à spectre étendu,
101 appartiennent soit au groupe A (types TEM, SHV, CTX-M) et en plus petit nombre au groupe
102 D (type OXA). Les β -lactamases du groupe C sont des céphalosporinases (type AmpC). Le
103 groupe B contient des enzymes comportant deux atomes de zinc dans leur site actif. Elles sont
104 désignées comme metallo- β -lactamases et peuvent hydrolyser les carbapénèmes (Nordmann
105 et Poirel, 2002). La classification de Bush et Jacoby est fondée sur les caractéristiques
106 enzymatiques des enzymes incluant le spectre du substrat et le profil d'inhibition. Les β -
107 lactamases à spectre étendu, appartiennent au groupe 2be et 2de dans cette classification
108 (Bush et Jacoby, 2010).

109 Les carbapénèmes sont des antibiotiques cliniques de dernière ligne contre les infections
110 causées par les bactéries Gram négatives multirésistantes. Contrairement aux céphalosporines,
111 les carbapénèmes ne sont pas hydrolysés par la plupart des β -lactamases, y compris les β -
112 lactamases à spectre étendu et β -lactamases de type AmpC, ces molécules sont hydrolysées
113 par les carbapénémases (Nordmann et *al.*, 2012). La carbapénémase la plus fréquemment
114 retrouvée chez les entérobactéries est l'enzyme KPC. Son implication de plus en plus
115 fréquente dans des épidémies hospitalières et son incidence en progression à travers le monde
116 sont une grande source de préoccupation (Nordmann, 2009). Ces enzymes sont des β -
117 lactamases ayant une activité hydrolytique vis à vis des carbapénèmes, et appartiennent à trois
118 classes selon la classification d'Ambler (Nordmann et Carrer, 2010).

119 La classe A correspond principalement aux enzymes de type KPC, IMI et GES. Elles
120 ont la particularité de voir leur activité *in vitro* totalement ou partiellement inhibée par l'acide
121 boronique et l'acide clavulanique. Elles hydrolysent toutes les β -lactamines. La classe B
122 correspond aux metallo- β -lactamases de type VIM, IMP et NDM. Ces enzymes hydrolysent
123 très fortement toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztréonam. Leur activité *in vitro* n'est
124 pas affectée par les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique et tazobactam). Ce sont
125 des metallo-enzymes qui contiennent un ion zinc dans leur site actif expliquant l'inhibition de
126 leur activité par l'EDTA ou l'acide dipicolinique (Cattoir, 2011). New Delhi metallo- β -
127 lactamase est une β -lactamase à large spectre qui est capable d'inactiver tous les β -lactamines
128 sauf aztréonam (Nordmann, 2011). Le premier cas d'une β -lactamase NDM-1 a été trouvé

129 chez un patient suédois précédemment hospitalisé à New Delhi en 2007 pour une infection
130 des voies urinaires par une *Klebsiella pneumoniae* multirésistante (Yong et *al.*, 2009). NDM-1
131 est maintenant sous les projecteurs des médias, depuis le rapport citant de nombreuses
132 infections bactériennes NDM-1-positifs, où 44 souches productrices de NDM-1 à Chennai,
133 26 à Haryana, 37 au Royaume-Uni, et 73 dans d'autres sites en Inde et au Pakistan
134 (Kumarasamy et *al.*, 2010). Enfin la classe D correspond essentiellement aux enzymes de type
135 oxacillinases (OXA-48, OXA-163, OXA-181). Ces enzymes hydrolysent fortement les
136 carbapénèmes mais pas ou peu les céphalosporines de 3^{ème} génération. Elles sont résistantes
137 aux inhibiteurs de β -lactamases.

138 Au cours de ces dernières années, bien que l'émergence des bacilles Gram négatifs
139 multirésistants producteurs de β -lactamases à large spectre et des carbapénèmases d'origine
140 nosocomiale a été reconnue comme étant la cause principale de la propagation de la résistance
141 au sein de la communauté, des données et rapports récents soulignent l'importance de la
142 chaîne alimentaire et des animaux d'élevage comme une source probable de diffusion de la
143 résistance dans les milieux communautaires. Pour cela nous avons effectué cette étude dans le
144 but de contrôler la qualité bactériologique du lait cru issu de vache et/ou de chèvre au niveau
145 de quelques fermes de Béjaïa, et de caractériser les phénotypes de résistance aux β -lactamines
146 des souches d'entérobactéries isolées du lait cru.

147 Afin de développer cet aspect nous avons adopté la méthodologie suivante :

- 148 ✓ Analyse microbiologique et contrôle de qualité du lait cru.
- 149 ✓ Etude de la sensibilité aux antibiotiques.
- 150 ✓ Détermination des phénotypes de résistance aux β Lactamines.
- 151 ✓ Etude de la capacité de transfert par conjugaison.

MATERIEL
ET
METHODES

153 **1. Origine et prélèvement des échantillons**

154 Des échantillons de lait cru pour chaque vache et/ou chèvre issue de différentes fermes
155 d'élevage dans la région de Béjaia et ses alentours (Amtik, Beni-kssila, Souk-Etnine,
156 Bakaro,...) ont été collectés durant le mois de mars 2015. Un formulaire contenant les
157 informations nécessaires sur l'élevage et l'hygiène de l'environnement et du personnel a été
158 élaboré (Annexe I). Les échantillons ont été acheminés immédiatement dans une glacière vers
159 le laboratoire d'écologie microbienne de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie pour
160 être analysés.

161 **2. Contrôle bactériologique des échantillons de lait**

162 Le dénombrement et la recherche des germes ont été réalisés à partir du lait et de ses
163 dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , et 10^{-3} en utilisant différents milieux et bouillons. Les analyses
164 microbiologiques effectuées sur le lait cru sont données dans le tableau N° I.

165 **Tableau N°I :** Germes recherchés et dénombrés pour le contrôle bactériologique du lait cru.

Germes	Milieu de culture	Méthodes	Observations
Flore Totale	Gélose PCA	1 ml des dilutions $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ont été ensemencés en masse sur gélose PCA et incubés 72h/30°C.	Dénombrement en boîte des colonies
Coliformes Totaux	VBL + Cloche	1 ml des dilutions $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ont été ensemencés dans le bouillon VBL et incubés 24h/37°C.	Virage de couleur au jaune + production de gaz
Coliformes Fécaux	Eau peptonée exempte d'indole	On ensemence avec 1 ml une eau peptonée exempte d'indole à partir des tubes de VBL positifs. Incubation 44°C/24h.	Formation d'un anneau rouge après ajout du réactif de Kovacs au tube EPEI
			Dénombrement en tube par NPP
Streptocoques fécaux	Roth D/C	1ml des dilutions $10^{-1}, 10^{-2}$, et 10^{-3} ont été ensemencés dans le bouillon de Roth et incubés 24h à 37°C.	Dénombrement en tube par NPP
	E.V.A Litsky	On ensemence sur milieu EVA LITSKY et on incube 24h à 48h à 37°C, s'il y'a trouble au fond du tube.	
Anaérobies sulfito-réducteurs	Gélose V.F	Après chauffage de 1ml des dilutions 10^{-1} , et 10^{-2} à 80°C/10min, et refroidissement, on ajoute 15ml de gélose viande foie+ additifs, puis on incube 24h à 48h à 37°C.	Dénombrement par comptage de colonies
<i>Staphylococcus aureus</i>	Giolitti Cantoni	1 ml des dilutions $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ont été ensemencés dans le bouillon Giolitti Cantoni et incubés 24h/37°C.	Enrichissement
	Chapman	SI noircissement du GC, on repique sur gélose Chapman et on incube 24h à 37°C.	Formation de colonies jaune dorées

166 **3. Recherche des souches d'entérobactéries productrices de β - lactamases**

167 **3.1. Isolement à partir du lait et du pis**

168 Des prélèvements par écouvillonnage du pis ont été réalisés en frottant la surface des 4
169 trayons. Un volume de 1ml de lait ainsi que les écouvillons ont été ensemencés dans du
170 bouillon nutritif contenant de la ceftazidime (1,5 μ g) et de l'ertapénèm (0,5 μ g). Après
171 incubation à 37°C/24h ; on ensemence 2 géloses de Mac Conkey additionnées respectivement
172 d'imipénème (1 μ g/ml) et de ceftazidime (2 μ g/ml), puis on incube à 37°C/24h.

173 L'identification des souches a été effectuée par l'emploi d'une mini galerie classique
174 comportant plusieurs tests biochimiques (uréase, production d'indole...). L'identité des
175 souches a été confirmée en utilisant des galeries API 20E.

176 **3.2. Etudes de la sensibilité des souches aux antibiotiques**

177 La sensibilité des souches vis-à-vis de 12 antibiotiques (Tableau N° II) a été déterminée
178 par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton, selon les recommandations du Comité
179 Européen de l'Antibiogramme EUCAST (www.eucast.org).

180 Des boîtes de gélose Mueller Hinton ont été ensemencées par écouvillonnage à partir
181 d'une suspension bactérienne de 0.5 MacFarland diluée au 1/10^{ème}. Les disques d'antibiotiques
182 (Biorad et Sirscan) y sont déposés, incubation 18h à 37°C.

183 La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) vis-à-vis de
184 l'imipénèm est réalisée en utilisant des bandelettes Etest (Biomérieux France). Après
185 ensemencement par écouvillonnage d'une suspension bactérienne sur gélose Mueller Hinton,
186 des bandelettes Etest sont déposées délicatement à la surface de la gélose et les boîtes sont
187 incubées pendant 18 à 24h à 37°C.

188 L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistant (R) a été effectuée selon les
189 critères définis par l'EUCAST (www.eucast.org).

190 **Tableau N°II : liste des antibiotiques testés**

Famille	Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque (µg)	Diamètres critiques	
				« R »	« S »
Aminosides	Amikacine	AN	30	<13	≥16
β-Lactamines	Amoxiciline+acide clavulanique	AMC	30	<19	≥19
	Ticarcilline	TIC	75	<23	≥23
	Céfépime	FEP	30	<21	≥24
	Céfoxitine	FOX	30	<15	≥19
	Céfotaxime	CTX	30	<17	≥20
	Ceftazidime	CAZ	30	<21	≥25
Carbapénèmes	Ertapénème	ERT	10	<26	≥28
	Imipénème	IMP	10	<17	≥24
	Méropénème	MER	10	<15	≥22
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	<19	≥22
Tétracycline	Tétracycline	TET	30	<17	≥19

191 **4. Détections des phénotypes de résistance**192 **4.1. Détection de la production de BLSE**

193 La production d'une BLSE est détectée par le DD-test qui consiste à placer des disques
 194 de ceftazidime, céfotaxime, céfépime et aztréonam à une distance de 2 cm d'un disque
 195 d'augmentin. L'augmentation de la zone d'inhibition entre les disques de ceftazidime,
 196 céfotaxime, céfépime ou aztréonam et le disque d'augmentin indique la production probable
 197 d'une BLSE (Jarlier et *al.*, 1988).

198 **4.2. Recherche de la production de carbapénémases**199 **4.2.1. Détection de la production de carbapénémases par le Hodge test modifié**

200 La production de carbapénémases est systématiquement recherchée chez toutes les
 201 souches résistantes et/ou de sensibilité réduite aux carbapénèmes. Un disque d'imipénème ou
 202 d'ertapénème est appliqué au centre d'une boîte de Mueller Hinton préalablement ensemencée
 203 avec la souche d'*E.coli* sensible ATCC 25922. Les souches à tester sont ensemencées à partir du
 204 disque en faisant une inoculation en strie du disque vers la périphérie. Des souches témoin
 205 positive et négative ont également été utilisées. On incube à 37°C pendant 18-24h. La
 206 déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre la strie et la culture d'*E.coli* indique la
 207 présence d'une carbapénémase (Lee et *al.*, 2010).

208 **4.2.2. Détection de la production de carbapénèmases par le Carba NP test modifié**

209 On prend 2 ml de la solution concentrée de rouge de phénol 0.5% (poids/volume) et on
210 mélange avec 16.6 ml d'eau distillée stérile, puis on ajoute 180µl d'une solution de ZnSo₄ (10
211 mM) . Le pH est ajusté à 7,5.

212 Afin de détecter la production d'une carbapénémase on ajoute 200µl de tampon de lyse
213 (CTAB 0,02%) dans un tube Eppendorf « A » et on suspend une ose calibré avec 10µl de
214 colonies bactériennes dans le tampon de lyse et on vortex. Transférer 100µl de la suspension
215 dans un autre tube Eppendorf « B », et Ajouter 100µl de solution Rouge de phénol dans le tube
216 « A » et 100µl de solution Rouge de phénol + imipénème (6 mg/ml) dans le tube « B » et
217 Vortexer , incuber à 37°C pendant 2h au maximum.

218 La lecture visuelle est effectuée dans chaque tube eppendorf et les résultats sont
219 interprétés selon le tableau ci-dessous (Bakour et *al.*, 2015)

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

Tube A	Tube B	Interprétation
Rouge	Rouge	Production de carbapénèmases
Rouge	Orange/Jaune	Production de carbapénèmases
Jaune	Jaune	Non interprétable

221 **4.2.3. Détection des metallo-β-lactamases (MβL) : Test à l'EDTA**

222 La recherche de MβL a été effectuée en utilisant une solution stérilisée par autoclavage
223 d'EDTA à 0,5M (pH=8). Un antibiogramme a été réalisé selon les recommandations de
224 l'EUCAST (www.eucast.org). Deux méthodes ont été utilisées :

225 **➤ Méthode des disques combinés**

226 Deux disques d'imipénème (10 µg) sont déposés suffisamment distant sur la même boîte de
227 Pétri contenant la gélose Mueller Hinton préalablementensemencée par-là souche à tester. Sur
228 l'un des deux disques un volume de 5µl de solution d'EDTA (750 µg/ml d'EDTA) est ajouté.
229 En outre, 10 µl de la solution d'EDTA sont ajoutés sur un disque vierge (témoin).

230 Après 16 à 18h d'incubation à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition autour de ces disques
231 sont mesurés et comparés. Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IMP–
232 EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IMP seul d'au moins 6 mm sont
233 considérées comme souches productrices de MBL (Yong et *al.*, 2002).

234 ➤ **Méthode EDTA-disque synergie**

235 Le test de l'EDTA-disque synergie est réalisé en utilisant un disque d'imipénème (10µg)
236 et un disque vierge imbibé avec 10 µl de la solution d'EDTA (1500µg d'EDTA) distant de
237 15mm (bord à bord).Après 24h d'incubation à 37 °C, la présence d'une MβL est détectée par la
238 visualisation d'une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui d'EDTA (Jeong et
239 *al.*, 2006).

240 **5. Transfert par conjugaison**

241 Des souches donatrices et la souche réceptrice *E.coli* résistante à l'azide de sodium sont
242 ensemencées dans 10 ml de bouillon nutritif, et on incube une nuit à 37°C.Après incubation,
243 une dilution de 1/50^{ème} (200µl) des souches donatrices et réceptrice est effectué dans 10ml de
244 bouillon nutritif, puis incubées à l'étuve de laboratoire à 37°C pendant 4h.Après incubation, on
245 mélange 1500 µl de culture de la souche donatrice avec 2000µl de culture de la souche
246 réceptrice et 1500µl de bouillon nutritif neuf dans un erlenmeyer , puis on incube à 37°C/3h.
247 Après incubation, on réalise des dilutions de 10⁻¹ et de 10⁻² du mélange précédent et on
248 ensemence avec râteau étaleur, 3 boites de Petri contenant la gélose TSA additionnée de l'azide
249 de sodium (200µl/ml) et de ceftazidime (4µl/ml) ou de l'imipénème, on incube à 37°C pendant
250 18 à 24h. Une fois les transconjugants sont obtenus on réalise un antibiogramme standard,
251 pour confirmer le transfert du phénotype de résistance.

RESULTATS

252 **1. Contrôle de la qualité bactériologique du lait cru**

253 Au cours de notre étude qui s'est déroulée durant la période allant de mois de mars
254 jusqu'au mois d'avril 2015, 34 échantillons provenant de 7 fermes différents ont été
255 analysés. Les résultats de notre enquête auprès des éleveurs montrent que :

- 256 ➤ 6 (85,71%) de ces établissements ont un type de production mixte.
- 257 ➤ 71,42% ont une alimentation à base de fourrage, et un mode d'élevage intensif.
- 258 ➤ 71,42 des éleveurs font un lavage du pis avant la traite.
- 259 ➤ 85,71 % des éleveurs ne nettoie pas l'étable avant la traite
- 260 ➤ 57,71% ont un mode de traite mécanique.
- 261 ➤ 57,14% avec une stabulation libre.
- 262 ➤ 42,85% ont un abreuvement à base d'eau de puit.
- 263 ➤ Aucune vache n'a été infectée et n'a été sous antibiotiques.

264 L'analyse microbiologique permet d'évaluer la qualité bactériologique du lait cru
265 collecté, les valeurs seuils des critères bactériologiques ci-dessous ont été fixées par le
266 Journal Officiel de la République Algérienne N° 35 du 24 janvier 1998 (JORA, 1998). Ces
267 normes ont été utilisées pour l'interprétation de nos résultats.

268 **Tableau N° IV : Valeurs seuils des critères bactériologiques du lait cru (JORA, 1998)**

Germes	Normes
Flore totale	10 ⁵ UFC/ml
Coliformes totaux	-
Coliformes fécaux	10 ³ germes/ml
Streptocoques fécaux	Abs /0,1ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abs/1ml
ASR	50germe/1ml

269 Les résultats du contrôle microbiologique sont représentés (Tableau V en annexe III)
270 et montrent que sur les 34 échantillons analysés, 14 sont de mauvaise qualité bactériologique
271 soit 41,17% qui ne répondent pas aux normes. Ceci est dû principalement à la présence de
272 streptocoques fécaux dans 13 échantillons (38,23%), de germes aérobie mésophile
273 (11,76%), suivi de coliformes fécaux (5,88%). Cependant on remarque l'absence des
274 anaérobies sulfite-réducteurs, *Staphylococcus aureus* ainsi que de *Salmonella* dans ces
275 échantillons. Les résultats par type d'animal montrent que le type de lait le plus contaminé
276 est le lait de vache. Sur les 29 échantillons de lait cru prévenant de vache, 13 (44,83%)
277

278 étaient de mauvaise qualité bactériologique. Alors que ceux issus de lait de chèvre sur 5
 279 échantillons de lait un seul était de mauvaise qualité (20%).

280 **2. Recherche des entérobactéries résistantes aux β-lactamines**

281 **2.1. Souches bactériennes**

282 Au total, 27 souches d’entérobactéries ont été sélectionnées sur la gélose Mac Conkey
 283 additionnée de ceftazidime ou d’imipénème, dont 21 souches ont été isolées du lait cru et 06
 284 à partir du pis. Les 27 souches d’entérobactéries ont été identifiées (Tableau VI en annexe
 285 IV) par galeries biochimiques classiques et API20E. Les souches obtenues incluent 10
 286 souches d’*Enterobacter* sp, 10 souches d’*E.coli*, 5 souches de *Klebsiella pneumoniae*, une
 287 souche de *Citrobacter freundii* et 1 souche de *Morganella morganii*.

288 **2.2. Sensibilités aux antibiotiques**

289 Les résultats de la sensibilité des 27 souches d’entérobactéries aux antibiotiques sont
 290 donnés dans le (Tableau VI annexe IV). Les taux de résistance aux antibiotiques des 27
 291 souches d’entérobactéries testées sont représentés dans la figure 1. On note que les taux de
 292 résistances aux β -lactamines varient de 27,92 % au meropénèm à 100% pour
 293 l’amoxicilline-acide clavulanique , concernant les autres familles d’antibiotiques on note
 294 des pourcentages de 40,62%, 62,96% et de 70,37 respectivement vis-à-vis d’amikacine,
 295 ciproflaxine et tétracycline.

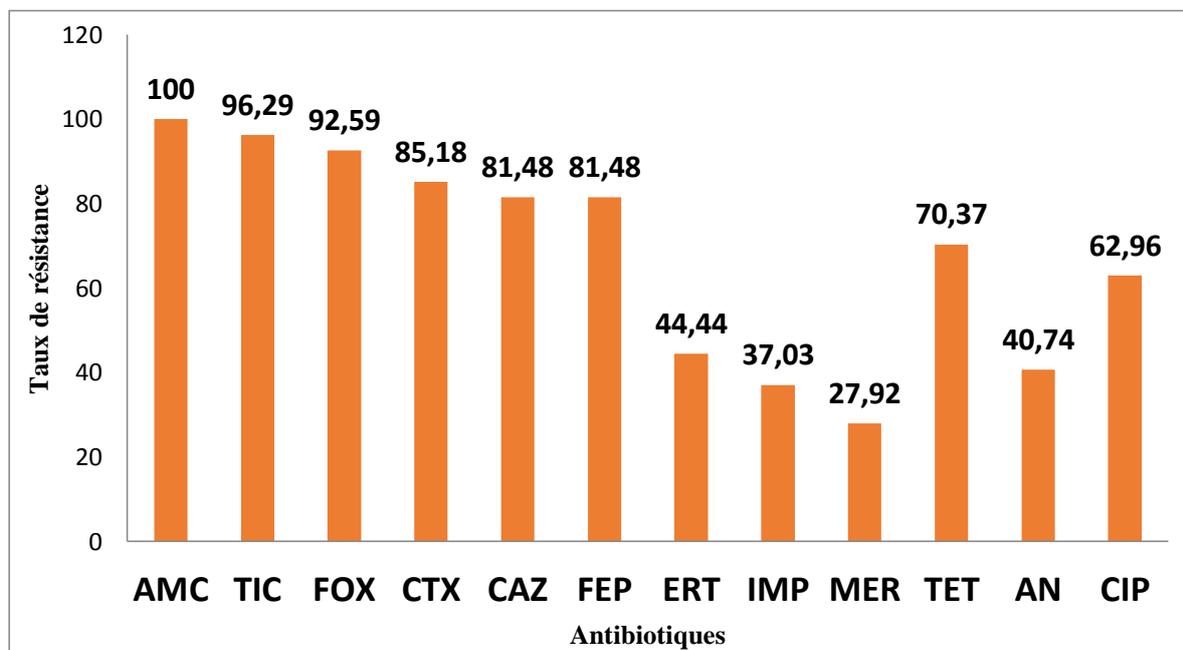
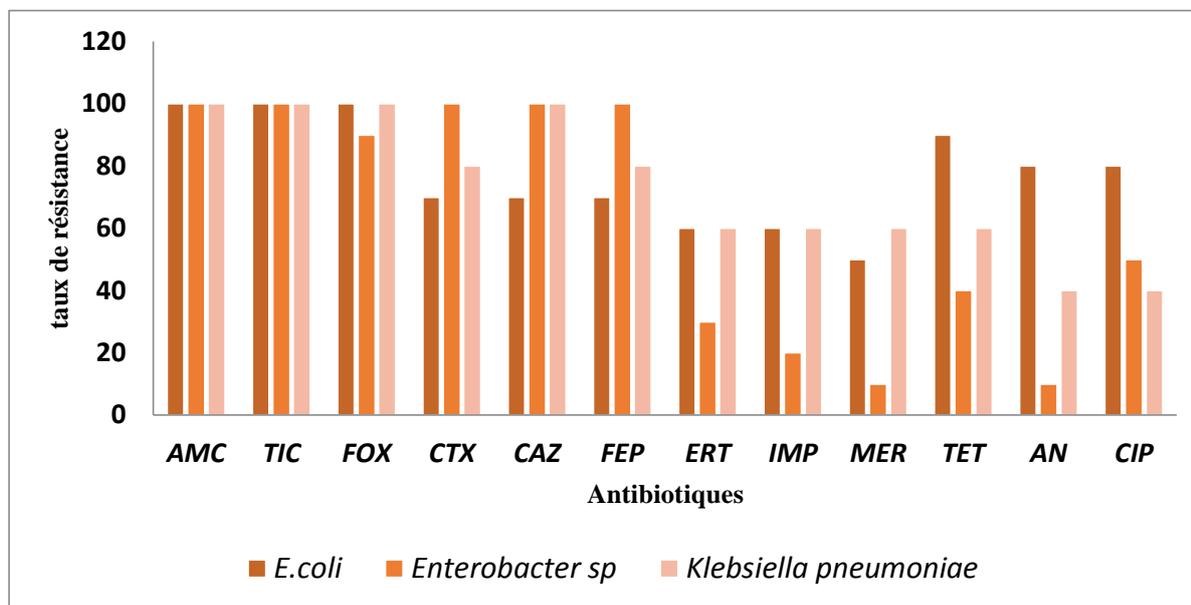


Figure 1 : Taux de résistances des entérobactéries aux antibiotiques testés

296

297 Les taux de résistance des souches d'entérobactéries par espèces aux différents antibiotiques
 298 testés sont donnés dans la figure 2. On note d'après cette figure que les souches d'*E.coli* et de
 299 *K. pneumoniae* sont plus résistantes que les souches d'*Enterobacter sp.* Il est à signalé que la
 300 résistance à la céfoxitine chez les souches d'*Enterobacter* est naturelle.



301

Figure 2 : Taux de résistance des souches d'*E.coli*, *Enterobacter sp* et *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques

302

303 2.3. CMI à l'imipénème

304 La détermination des CMI par les bandelettes Etest Biomerieux nous a permis
 305 d'obtenir les résultats représentés dans le tableau N°VII. Les CMI obtenues varient entre 1,5
 306 à 25 pour les souches d'*Enterobacter sp*, de 16 à 38 pour les souches d'*E.coli*, et de 38 pour
 307 *Citrobacter freundii* et *Klebsiella pneumoniae*.

308 **Tableau N° VII : CMI obtenues pour l'antibiotique testé Imipénème**

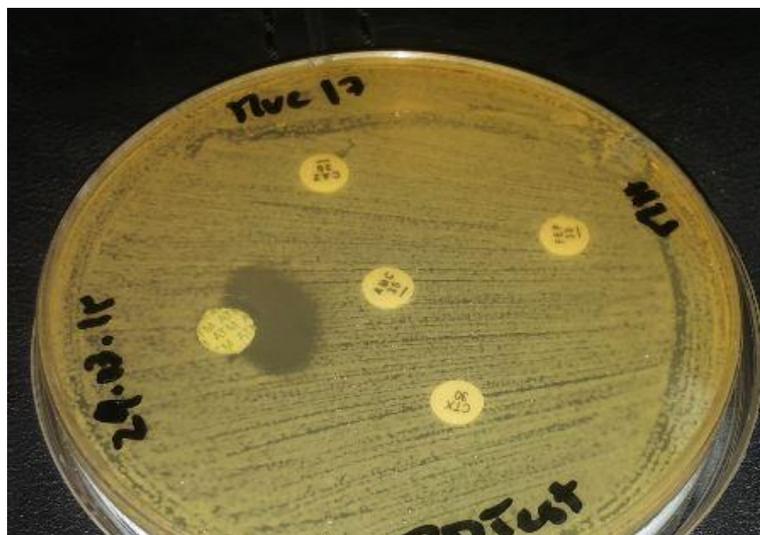
souche	CMI	identification
MVC 13CH 2	38	<i>Citrobacter freundii</i>
MVC 17 L	25	<i>Enterobacter sp</i>
MVC 17 EC	25	<i>Enterobacter sp</i>
MV 29 L	38	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>
MVI 29 L	38	<i>E.coli</i>
MVI 29 EC	38	<i>E.coli</i>
MV 29 EC	38	<i>E.coli</i>
MVI 30 L	16	<i>E.coli</i>
MVI 30 EC	16	<i>E.coli</i>
MV 30 L	16	<i>E.coli</i>
MVC 33 CH	1,5	<i>Enterobacter sp</i>
MVC 34 CH1	2	<i>Enterobacter sp</i>

309

310 **3. Détermination des phénotypes de résistance**

311 **3.1. Recherche de BLSE**

312 Le DD-test effectué sur les 27 souches d'entérobactéries a révélé la présence d'une
 313 image de synergie chez 13 des 27 souches d'entérobactéries testées soit 48,14%, ce qui
 314 indique la présence probable d'une BLSE (Figure 3), Tableau N°VI en annexe IV.



324 Figure 3 : DD-test Positif pour la souche
 325 *Klebsiella pneumoniae* 17L
 326

327 **3.2. Recherche de la production d'une carbapénémase**

328 ➤ **Test de Hodge modifié**

329 Une image de trèfle, (figure 4), est obtenue pour 12 souches, indiquant que ces
 330 dernières produisent probablement une carbapénémase.

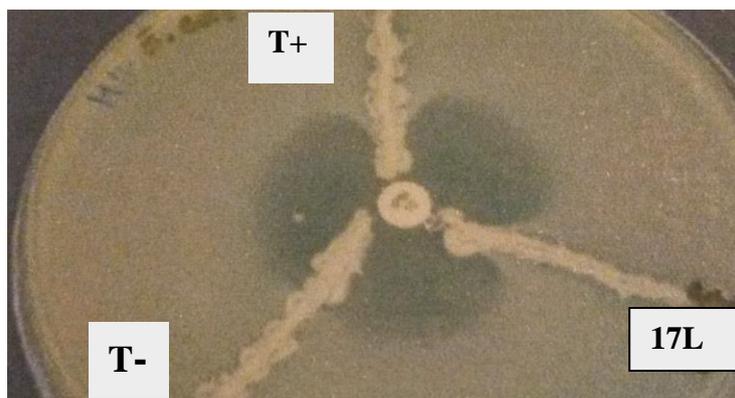
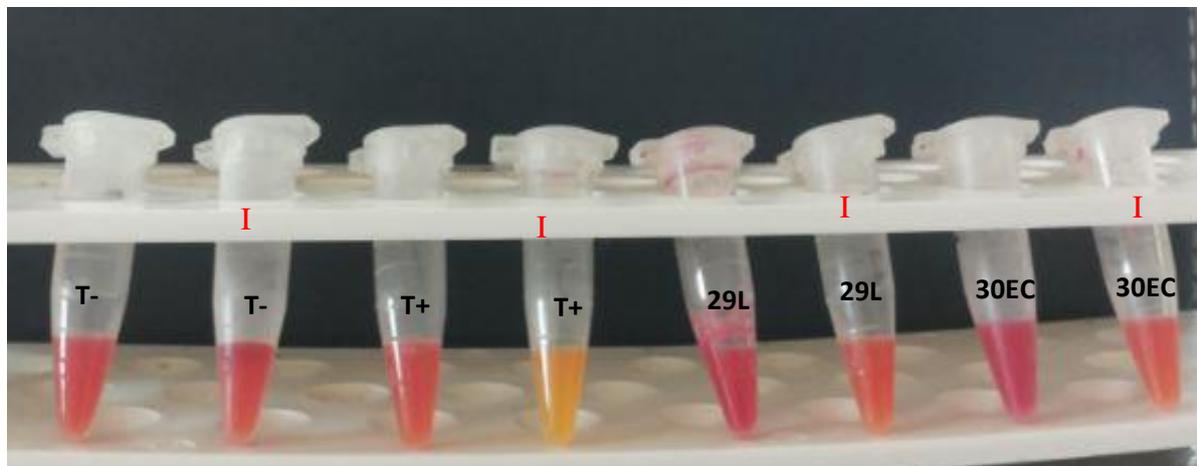


Figure 4 : Hodge test Positif souche *Klebsiella pneumoniae* 17 L

340 ➤ **Le Carba-NP-test modifié**

341 Le Carba-NP-test modifié a montré que 12 souches sont probablement productrices de
 342 carbapénémase (figure 5). Il est à signaler que ces souches ont été également positives avec
 343 le Hodge test.



344 **Figure 5** : Carba NP-test Positif pour la souche *Klebsiella pneumoniae* 29L et *E.coli* 30EC.

345
 346 ➤ **Test à l'EDTA**

347 Le test à l'EDTA a montré une synergie, (figure 6), pour 9 des 12 souches
 348 d'entérobactéries productrices de carbapénémases, ce qui signifie que ces souches sont
 349 probablement productrices d'une carbapénémase de type MBL.



350
 351
 352
 353
 354
 355
 356 **Figure 6** : Test- EDTA Positif pour la souche *E.coli* MVI 30 Ec

357 **4. Transfert par conjugaison**

358 Le transfert par conjugaison a été réalisé pour 15 souches multirésistantes sur la gélose
 359 de sélection, et aucun transconjugant n'a été obtenu.

DISCUSSION
ET
CONCLUSION

352 Au cours de notre étude nous avons étudié la qualité bactériologique de 34 échantillons
353 de lait cru de vache et/ou de chèvre prélevés au niveau de 7 fermes de localités de Béjaia.

354 L'analyse bactériologique effectuée a révélé que 41,17% de ces échantillons sont de
355 mauvaise qualité bactériologique due principalement à la présence de Stréptocoques fécaux
356 (38,23%) d'une flore mésophile aérobie totale élevée (11,76%), et coliformes fécaux (5,88%).

357 Un lait de bonne qualité bactériologique ne possède pas de micro-organismes pathogènes
358 ou de résidus d'antibiotiques (Oliver et *al.*, 2009). Comme tous les autres types d'aliments, la
359 qualité du lait peut être affectée par plusieurs facteurs tels que la contamination par des agents
360 pathogènes et leur multiplication. Ceux-ci peuvent être introduits dans le lait à partir du milieu
361 environnant ou des animaux eux-mêmes. Le lait cru peut être à l'origine des gastroentérites
362 (Buyser, 2001), dû à la présence de bactéries pathogènes telles que *Salmonella*, *Escherichia*
363 *coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, (FAO 2015).

364 En 1938, aux Etats-Unis, 25% de tous les cas de toxi-infections alimentaires rapportés
365 étaient liés à la consommation de lait. Entre 1880 et 1907, environ 29 épisodes de toxi-
366 infections alimentaires collectives liées à la consommation de lait étaient rapportés chaque
367 année aux Etats-Unis. Ce nombre est descendu à 2,4 entre 1973 et 1992. Entre 1993 et 2006, 68
368 épisodes de toxi-infections alimentaires collectives causées par la consommation de lait cru et
369 de produits laitiers non pasteurisés ont été rapportés aux Etats-Unis, soit 5,2
370 épisodes/ans. (Oliver et *al.*, 2009). En Voïvodine province autonome de Serbie, au cours de la
371 période de 1981-2010, 179 épidémies d'origine alimentaire ont été signalées, dont la cause
372 étaient le lait cru ou les produits laitiers (Popović Vranješ et *al.*, 2015). En 2010 dans l'Union
373 Européenne, les produits laitiers (toutes catégories confondues) sont incriminés dans 4% des
374 cas de toxi-infections alimentaires collectives (EFSA Journal, 2012). En France le nombre
375 d'épidémies de Toxi-infection alimentaire collective déclarées pour la période de 16 années
376 allant de 1988 à 2003 était de 7538 épidémies. Le lait et les produits laitiers ont été impliqués
377 dans 368 épidémies soit 5% du total des épidémies. Entre 1988 et 2003, neuf épidémies de
378 salmonellose impliquant des produits laitiers ont été détectées (Buyser, 2001).

379 Les agents infectieux du lait proviennent de l'animal laitier, du manipulateur humain ou
380 du milieu au moment de la traite (Kaplan et *al.*, 1966). Les mauvaises conditions d'hygiène de
381 la traite, le mauvais entretien de l'habitat, l'eau d'abreuvement et de lavage peuvent être à
382 l'origine de mauvaise qualité bactériologique de nos laits. Plusieurs sources possibles de
383 contamination du lait cru peuvent être distinguées dont nous pouvons citer : la non élimination

384 du premiers jet (Michel et *al.*, 2001), les mamelles sales incorrectement lavées(Piton et
385 Richard, 1982), la qualité d'eau utilisée qu'elle soit utilisée en abreuvement ou pour le
386 nettoyage (Goyon et Badinand, 2003), le matériel de traite mal nettoyé (Piton et Richard 1982).
387 L'environnement, la litière et l'air peuvent contribuer à la contamination du lait. En effet plus
388 la durée de la traite est longue, plus le lait est laissé en contact avec l'air de l'étable et les foin
389 dans le sol, plus la contamination est importante (Faye et Loiseau, 2002).

390 L'émergence de la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif
391 constitue un véritable défi ce qui pourrait conduire à des impasses thérapeutiques. L'isolement
392 à partir des échantillons de lait cru et du pis, nous a permis d'obtenir 27 souches
393 d'entérobactéries, multirésistantes, dont 13 souches productrices de BLSE. Des données
394 similaires ont été rapportées par Rasheed et *al.*, 2014, où les pourcentages de résistance aux
395 antibiotiques dans les isolats d'*E.coli* ont été détectés dans différents produits alimentaires, dont
396 le lait cru à un taux de 6,7%. (Rasheed et *al.*, 2014),

397 Plusieurs études de différents continents ont décrit la prévalence des entérobactéries
398 productrices de BLSE chez les bovins. Par exemple Madec et *al.*, 2008 rapportent que sur
399 657 prélèvements fécaux issus de bovins malades, 52 étaient producteurs de BLSE ou de
400 céphalosporinase (Madec et *al.*, 2008).

401 En plus certaines études décrivent la production des BLSE dans des aliments, Mesa et
402 *al.*, rapportent que 3 des 738 aliments étudiés contenaient des souches productrices de BLSE
403 dont 2 souches d'*E.coli* isolées de salades et une souche de *K. pneumoniae* isolée à partir d'un
404 poulet cuit (Mesa et *al.*, 2006). L'étude menée par Lars Bogø et *al.*, révèle la présence de
405 souches de *E.coli* productrices de BLSE contenant le gène blaTEM-52 dans les viandes (Lars
406 Bogø et *al.*, 2006). Hammad et *al.*, a montré la présence d'une souche isolée du lait cru,
407 identifiée comme *Klebsiella pneumoniae*KPHUF-100 productrice de BLSE de type SHV-60
408 (Hammad et *al.*, 2008)

409 L'étude menée par Locatelli et *al.*, 2010 a montré que la plupart des souches isolées de
410 bovins sont déjà résistantes à presque tous les traitements d'antibiotiques et que *Klebsiella* peut
411 infecter les humains et y'comprit les travailleurs agricoles et les consommateurs. Ses résultats
412 montrent la présence d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* produisant la BLSE CTX-M1
413 isolée de lait dans un cas de mammite clinique bovine (Locatelli et *al.*, 2010). Au Japon
414 3 souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE ont été obtenus à partir de trois
415 vaches laitières atteintes de mammites cliniques (Saishu et *al.*, 2014). En France, les premières
416 souches d'*E. coli* animales productrices de BLSE ont été isolées à partir de 2003 dans trois
417 principales filières de production (porcs, volaille, bovins). Des données moléculaires montrent
418 que le principal mécanisme en cause de la résistance est la production de BLSE de type CTX M
419 (Meunier et *al.*, 2006). Au Royaume uni des résultats montrent la présence chez les bovins
420 d'isolats d'*E. coli* CTX-M-15, mais aussi de *Klebsiella pneumoniae* productrices de SHV-12
421 (Dorina et *al.*, 2014). L'apparition d'*E. coli* productrice de BLSE dans la viande de poulet de
422 chair danoise est passée de 8,6% en 2010 à 44% en 2011. La présence des gènes de BLSE
423 diffèrent en fonction du réservoir animal. CTX-M-1 était le gène BLSE le plus commun chez les
424 porcs et les bovins, mais aussi CTX-M-14 et CTX-M-15 ont été trouvées (DANMAP 2011).

425 Dans cette étude nous nous sommes intéressés non seulement à l'étude des souches
426 productrices de BLSE et à leur identification mais aussi à l'émergence des souches
427 d'entérobactéries productrices de carbapénèmases.

428 La recherche des souches productrices de carbapénémase dans les 34 échantillons du lait
429 et du pis a été réalisée par différentes techniques. Ainsi 12 souches productrices de
430 carbapénémase dont 4 du pis ont été détectées par la méthode de Hodge test modifié et
431 confirmé par le Carba-NP-test modifié, Sur les 12 souches productrices de carbapénèmases, 9
432 souches se sont révélées positives au test à l'EDTA et ont montré la présence de synergie ce
433 qui indique qu'elles sont probablement de type MBL.

434 En Allemagne des souches d'*E. coli* et de *Salmonella* productrices de carbapénèmases
435 VIM-1 ont été identifiées chez les animaux d'élevage (Fischer et *al.*, 2013). En Inde des
436 résultats révèlent la présence de NDM 1 chez une souche d'*E. coli* productrice de BLSE isolée à
437 partir de lait d'une vache laitière souffrant de mammite, ce qui constitue une menace potentielle
438 pour la santé humaine après sa propagation possible à travers la chaîne alimentaire (Ghatak et
439 *al.* 2013). En France une étude a montré la présence d'une carbapénémase de type OXA-23
440 chez 9 souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées de bovins (Poirel et *al.*, 2012).

441 En chine la présence d'une souche *Acinetobacter lwoffii* portant le gène *bla_{NDM-1}*
442 dérivée à partir d'écouvillon rectal d'un poulet a été rapporté, ce qui pourrait avoir une
443 incidence grave de santé publique parce que *Acinetobacter lwoffii* est une bactérie
444 omniprésente dans les denrées alimentaires, et peut être transféré à l'homme par la chaîne
445 alimentaire (Wang et *al.*, 2012).

446 La prévalence des entérobactéries productrices de carbapénèmases dans les aliments et la
447 dissémination des bactéries résistantes via la chaîne alimentaire constitue une menace
448 importante pour la santé publique.

449 Malgré les avantages nutritifs et de santé associés à la consommation de lait et de
450 produits laitiers, la consommation de lait cru est une menace réelle, en raison de la présence
451 possible de bactéries pathogènes qui peuvent avoir un impact significatif sur la santé humaine
452 (Popović Vranješ et *al.*, 2015). Les travailleurs agricoles et des abattoirs, les vétérinaires et les
453 personnes en contact étroit avec eux sont directement soumis au risque d'être colonisés ou
454 infectés par des bactéries résistantes présentes chez des animaux. La majorité des études portant
455 sur la transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques de l'animal à des travailleurs
456 agricoles aborde la prévalence de la résistance chez les agriculteurs ou chez les fermiers avant
457 et après l'introduction des antibiotiques dans leur lieu de travail (Marshall et Levy 2011). La
458 propagation directe des bactéries résistantes d'animaux aux humains a été rapporté par Levy et
459 *al.*, 1976 qui a trouvé la même souche d'*E.coli* résistante à la tétracycline dans la flore
460 intestinale des éleveurs et des poules. Une autre étude montre la présence des souches d'*E.coli*
461 ayant un profil de résistance similaire, dans les selles des travailleurs agricoles et dans les
462 cloaques des oiseaux, ce qui indique que ces travailleurs ont probablement acquis la souche
463 résistante à partir de ces oiseaux (Ojeniyi ,1989). D'autres études montrent la présence de
464 coliformes résistants chez les gestionnaires de porcs et chez 64% des proches de ces
465 gestionnaires. La similitude des profils de résistance aux antibiotiques suggèrent que les
466 souches résistantes sont transmises de l'animal à l'homme (Wells et James 1973).

467 Plusieurs études (Aubry-Damon et *al.*, 2004 ; Ramchandani et *al.*, 2005 ; Hart et *al.*,
468 2006) soutiennent le fait que le transfert de gènes de résistance entre des souches d'origines
469 animale et humaine dans l'intestin humain est très probable. En Norvège, ils ont constaté
470 qu'aucune des souches d'*E. coli* humaine dans leurs base de données ont été étroitement liée à
471 des souches de volailles contrairement à 9 souches humaines d'*E.coli* productrices de

472 CTX-M-1 ou de CMY-2 situés sur des plasmides qui étaient très semblables à ceux rapportées
473 chez les volailles (De Been et *al.*, 2014).

474 L'utilisation d'antibiotiques dans la production agricole est considérée comme étant la
475 cause de sélection de bactéries multirésistantes pouvant se retrouver ensuite dans les denrées
476 alimentaires. Il est amplement recommandé de faire un usage raisonnable des antibiotiques
477 dans la production primaire et de réduire leur utilisation dans l'élevage en améliorant la santé
478 animale par une bonne pratique d'hygiène et la prise de mesure anti infectieuse adéquate
479 notamment la vaccination (AFSCA, 2011).

480 Par conséquent, du point de vue de santé publique, surtout lorsqu'il s'agit des groupes de
481 population vulnérable, comme les enfants, les femmes enceintes ou les personnes souffrant de
482 maladies chroniques ou de suppression du système immunitaire, et dans les cas où de grands
483 groupes de clients en dépendent (les hôpitaux, les écoles et les établissements préscolaires, la
484 restauration, etc.), le traitement thermique du lait cru est absolument recommandé. En plus du
485 fait que ces pathogènes peuvent être résistants. La mise en œuvre dans les fermes des bonnes
486 pratiques d'hygiène actuellement en vigueur est essentielle pour réduire la contamination du lait
487 cru par les bactéries pathogènes et potentiellement résistantes, tandis que le maintien de la
488 chaîne du froid est également important pour empêcher ou ralentir la croissance des bactéries
489 dans le lait cru. Cependant, ces pratiques seules ne permettent pas d'éliminer totalement ces
490 risques. Faire bouillir le lait cru avant de le consommer constitue la méthode la plus efficace
491 pour éliminer un grand nombre de bactéries susceptibles de nous rendre malades.

492 Notre étude est préliminaire et doit être complétée par

- 493 ➤ L'étude moléculaire des gènes de résistance pour déterminer le type de β -
494 lactamases et de carbapénèmase produites ;
- 495 ➤ La détermination et l'évolution de la contamination des produits alimentaires issus
496 d'animaux d'élevage en incluant un nombre important d'échantillons ;
- 497 ➤ L'étude de l'environnement de l'élevage, du portage des manipulateurs pour
498 déterminer l'origine de la contamination.
- 499 ➤ L'étude du portage digestif de souches d'entérobactéries productrices de BLSE et
500 de carbapénèmases et comparaison avec les souches isolées d'aliments.

BIBLIOGRAPHIES

Références bibliographiques

Abraham EP, Chain E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Reviews of infectious diseases* **10** :677-8.

Aggad H, Mahouz F, Ahmed Ammar Y, et Kihal M. (2009).Évaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'Ouest algérien. *Revue de Médecine Vétérinaire* **160** :590–595.

AFNOR. (1993) .contrôle de la qualité des produits alimentaire : lait et produits laitiers : analyses Physicochimiques. Paris La défense. AFNOR, 4e éd, 581 p.

Aubry-Damon H, Grenet K, Sall-nadiaye P, Che D, Coredeiro E, Bougnoux M.E, Rigaud E, Le Strat Y, Imanissier V, Armand-lefevre L, Delazescaux JC, Liénard M et Andremont A. (2004). Antimicrobial résistance in commensal flora of pig farms. *Emerging Infectious Diseases* **10**:873-879.

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

Bonnet R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTXM enzymes *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 1–14.

Bradford PA, Petersen PJ, Fingerman IM, et White DG. (1999). Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrheal disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**:607-610.

Bradford PA. (2001).Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* **14**:933–51.

Bush K, Jacoby G A. (2010).Updated Functional Classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy.*

Callon C, Duthoit F, Delbes C, Ferrand M, Le Frileux Y, De Cremoux R, Montel M C. (2007). Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Systematic and Applied Microbiology* **30** :547-560

Canto'n R, Ako'va M, Carmeli Y et Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H,Woodford N, Nordmann P; European Network on Carbapenemases. (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology Infections.* **18**: 413–31.

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

Conseil supérieur de la santé. (2009). Recommandations nutritionnelles pour la Belgique-Révision 2009. Publication N° 8309.

DANMAP. (2012). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark.

De Been M, Lanza VF, Toro de M, Scharringa J, Dohmen W, Yu Du, Juan Hu, Ying Lei, Ning Li, Ave Tooming-Klunderud, Dick J. J. Heederik, Ad C. Fluit, Marc J. M. Bonten, Rob J. L. Willems, Fernando de la Cruz, Willem van Schaik. (2014). Dissemination of Cephalosporin Resistance Genes between Escherichia coli Strains from Farm Animals and Humans by Specific Plasmid Lineages. *PLoS Genetics*. **10**: e1004776.

De Buyser M L, Dufour B, Maire M, Lafarge V. (2001) Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology* .**67**: p1-17.

Dorina T , Maciuca Iuliana E , Evans Nicholas J. Williams Helen J, Wattret Andrew Bsc , Jenny Fick C, Williams Nicholas J. (2014) Detection and Molecular Characterization of Escherichia coli CTX-M- 15 and Klebsiella pneumoniae SHV-12 -Lactamases from Bovine Mastitis Isolates in the United Kingdom *American Society for Microbiology. Antimicrobial Agents and Chemotherapy* .**11**/2013.

Edwards B, et Gould I.M. (2012) Antimicrobial stewardship : lessons from human healthcare Overview of the use of antimicrobials in humans Prudent and efficacious use of antimicrobials in healthcare settings *Antimicrobial Stewardship*. **31**:135-144.

EFSA/ECDC. (2012). European Food Safety Authority/European Centre for Disease Control. 484 The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, zoonotic 485 Agents and food-borne outbreaks in 2010. *European Food Safety Authority*.**10**: 2597-3039.

European Food Safety Authority. (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *European Food Safety Authority*.**10**: 2597.

European Food Safety Authority. (2011). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum b-lactamases and/or AmpC b-lactamases in food and food-producing animals. *European Food Safety Authority*.. **9**: 2322.

Fabre JM, Gardey L, Lherbette L, De Boisseson M, Berthelot X. (2000). Détection des résidus de céfalexine dans le lait en cas d'allongement de la durée du traitement par voie intramammaire. *Revue de Médecine Vétérinaire*. **151**: 965-968.

Faye B et Loiseau G. (2002). Source de contamination dans les filières et exemple de démarche qualité, acte de l'atelier international de la gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement décembre 2000 Montpellier France.

Fischer J, Rodríguez I, Schmoger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B.(2013). Salmonella enterica subsp. enterica producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms. Antimicrobial Chemotherapy. **68**: 478–80.

Geser N, Stephan R, et Hächler H. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC veterinary research. **8**: 21.

Ghatak S, Singha A, Sen A, Guha C, Ahuja A, Bhattacharjee U, Das S, Pradhan NR, Puro K, Jana C, Dey TK, Prashant Kumar KL, Das A, Shakuntala I, Biswas U, Jana PS. (2013) Detection of New Delhi metallo-beta-lactamase and extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from mastitis milk samples. Transboundary and Emerging Diseases **60**: 385-9.

Grall N, Andremont A, Armand-Lefèvre L. (2011) Résistance aux carbapénèmes: vers une nouvelle impasse ? Anti-Infectieux **13** : 2.

Goyon N et Badinand F. (2003). Qualité de l'eau et qualité du lait. A partir d'une enquête menée dans la Loire. Rencontre Recherche Ruminants .**10**: 244.

Hammad A M, Ahmed AM, Ishida Y. et Shimamoto T. (2008). First characterization and emergence of SHV-60 in raw milk of a healthy cow in Japan. Veterinary Medicine Science. **70**:1269-1272.

Hart WS, Heuzenroeder MW, Barton MD. (2006). A study of the transfer of tetracycline resistance genes between *Escherichia coli* in the intestinal tract of a mouse and a chicken model. Veterinary Medicine and Infections Disease Veterinary Public Health.**53**:333–40.

Hilan C, Chemali Z. (1998). La contamination des produits laitiers par les antibiotiques au Liban. Annales de recherche scientifique **1**: 267-275.

Horton RA, Randall LP, Snary EL, Cockrem H, Lotz S, Wearing H, Duncan D, Rabie A, McLaren I, Watson E, La Ragione RM, Coldham NG.. (2011). Fecal Carriage and Shedding Density of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Cattle, Chickens, and Pigs: Implications for Environmental Contamination and Food Production. Applied and Environmental Microbiology. **77**:3715-3719.

International Organization for Standardization. 4831 dénombrement des coliformes totaux sur milieu liquide.

Jacoby GA, Munoz-Price LS. (2005).The new beta-lactamases. N Engl J Med. **352**: 380-91.

Jarlier V, Nicholas MH, Fournier G. et Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum b-lactamases conferring transferable resistance to newer b-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Reviews of Infectious Diseases. **10**:867-78.

Jeong SH, Bae IK, Park KO, An YJ, Sohn SG, Jang SJ, Sung KH, Yang KS, Lee K, Young D, Lee SH. (2006). Outbreaks of imipinem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. Microbiology. **44**: 423-31.

Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire. (1988). Critères microbiologiques relatifs à certaines denrées alimentaires spécifications et la présentation des critères microbiologiques des laits et des produits laitiers de certain lait de consommation, N°JORA ; 035 du 27-05-1998.

Kaplan M M, Abdusalam M, Bijlenga G. (1966) maladie transmises par le lait organisation mondiale de la santé.

Khaskheli M, Malik R. S, Arain M A, Soomro A H, Arain HH. (2008). Detection of β -lactam antibiotic residues in market milk. *Pakistan Journal of Nutrition* . **7** : 682-685.

Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. (2010). Emergence of a New Antibiotic Resistance Mechanism in India, Pakistan, and the UK: A Molecular, Biological, and Epidemiological Study. *The Lancet Infectious Diseases* .**10**:597–602.

Lars Bogø J, Henrik H, Yvonne A, Hanne-Dorthe E, et Frank M. (2006) A First description of an oxyimino-cephalosporin resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **10** :1093.

Lee K, Kim CK, Yong D, Jeong SH, Yum JH, Seo YH, Docquier JD, Chong Y. (2010) Improved performance of the modified Hodge test with Macconkey agar for screening carbapenemases producing Gram-negative bacilli. *Journal of microbiological methods*.**83**:149-152

Levy, S. B. (1998). The challenge of antibiotic resistance. **278**:46–53.

Levy Stuart B, FitzGerald George B, et Maccone Anna B. (1976). Spread of antibiotic resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature*. **260**:40–42.

Locatelli C, Scaccabarozzi L, Pisoni G, Moroni P. (2010). CTX-M1 ESBL producing *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* isolated from cases of bovine mastitis. *Clinical Microbiology*. **48**:3822–3823.

Madec JY, Lazizzera C, Châtre P, Martin S, Lepage G, Ménard MF, Lebreton P, Rambaud T, Meunier D. (2008). Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae strains from cattle in France. *Clinical Microbiology*. **46**:1566-1567.

Mallet A, Guéguen M, Desmasures N. (2010). Etat des lieux de la diversité microbienne quantitative et qualitative de laits crus normands destinés à la transformation fromagère. 8ème Congrès National de la SFM, 2-4 juin, Marseille.

Macdonald LE, Brett J, Kelton D, Majowicz S E, Snedeker K, Sargeant JM. (2011). A systematic review and meta-analysis of the effects of pasteurization on milk vitamins, and evidence for raw milk consumption and other health-related outcomes. *Food Protection*. **74**: p 1814-32.

Marshall B M, et Levy S B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*, **24**: 718-733.

Mensah SEP, Aboh AB, Salifou S, Mensah GA, Sanders P, Abiola FA, Koudandé OD. (2014). Risques dus aux résidus d'antibiotiques détectés dans le lait de vache produit dans le Centre Bénin. *Applied Biosciences* **80**: 7102–7112.

Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, Miró E, Muniesa M, Saco M, Tórtola MT, Mirelis B, Coll P, Llagostera M, Prats G, Navarro FJ. (2006). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Antimicrobial Chemotherapy*. **58**:211-215.

Meunier D E, Jouy C, Lazizzera M, Kobisch, et Madec JY. (2006). CTX-M-1- and CTX-M-15-type β -lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food producing animals in France. *International Antimicrob Agents*. **28**:402–407.

Michel V, Hauway A, Chamba JF. (2001). La flore microbienne du lait cru de vache: Diversité et influence des conditions de production.

Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V; European Network on Carbapenemases. (2012). Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Infection* .**18**: 432–8.

Nordmann P, Poirel L, Toleman MA et Walsh T R. (2011). Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *Antimicrobial Chemotherapy*. **66**: 689 –692.

Nordmann P, Carrer A. (2010). Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Arch Pediatr*. **17**: S154-62.

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet infectious disease*. 228-236.

Nordmann P, Poirel L. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology Infection*. **8**:321–31.

Norme NF 08-051: relative au dénombrement des microorganismes, méthode par comptage de colonies à 30°C.

Norme NF En ISO 6887-1 : relative à la suspension mère et dilutions décimales : Règle générale.

Norme NF En ISO 6888 : relative au dénombrement des staphylococcus aureus à coagulase positives.

Norme ISO 4831 et IDF 73B : relatives au dénombrement des coliformes fécaux sur milieu liquide.

Norme NF T 90-415 : relative au dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfite réducteurs .méthode par incorporation en gélose en tube profonds

Ojeniyi A A. (1989). Direct transmission of *Escherichia coli* from poultry to humans *Epidem. Infections* **103**: 513-522 513.

Ojer-Usoz E, González D, Vitas AI, Leiva J, García-Jalón I, Febles-Casquero A, Escolano Mde L. (2013). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Science*.

Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF, et al. (2005) Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infectious Disease*. **5**: 481-93.

Oliver SP, Boor KJ, Murphy SC, Murinda SE. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Food borne Pathogens Disease*. **6** : 793-806.

OMS (1966). Série de monographie N° 48. Hygiène du lait. Mesures à prendre aux stades de la production, du traitement et de la distribution. p 13-14.

OMS. (1968). Les aspects microbiologiques de l'hygiène denrées alimentaires

OMS. (2012). Statistiques sanitaires mondiales 2012.

Paterson D L, Bonomo R A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a Clinical update. *Clinical microbiology reviews*. **18**:657-686.

Piton C, Richard J. (1982). Causes de contamination microbienne d'importance moyenne du lait dans un groupe de fermes de la région de Rennes.

Poirel L, Berçot B, Millemann Y, Bonnin RA, Pannaux G, Nordmann P.(2012). Carbapenemase-producing *Acinetobacter spp.* In cattle, France. **18**: 523–525 ;

Popović Vranješ A, Popović M, Marija J. (2015). Raw Milk Consumption and Health.

Rasheed MU, Thajuddin N, Ahamed P, Zelalem, Teklemariam KJ. (2014). Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **56**: 341–346.

Ramchandani M, Manges AR, DebRoy C, Smith SP, Johnson JR, Riley LW. (2005). Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Disease*. **40**:2517.

Rodriguez-Villalobos, H., & Struelens, M. J. (2006). Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Reanimation*, **15**: 205-213.

Rupp ME, Fey PD. (2003). Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*. **63**:353–365.

Rule AM, Evans SL, Silbergeld EK . (2008). Food animal transport: a potential source of community exposures to health hazards from industrial farming (CAFOs). *Infection Public Health*. **1**:33-9.

Sahebkhitiari N , Nochi Z, Eslampour MA, Dabiri H, Bolfion M, Taherikalani M, Khoramian B, Zali MR, Emaneini M. (2011). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. **58**:113-21.

Saishu N, Ozaki H, Murase T. (2014). CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Cases of Bovine Mastitis in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **76** :1153-1156.

Tarzaali D, Dechicha A, Gharbi S, Bouaissa MK, Yamnaine N. Guetarni D. (2008). – Recherche des résidus des tétracyclines et des bêta-lactamines dans le lait cru par le MRL Test (ROSA TEST) à Blida,

Algérie. In 6e Journées scientifiques vétérinaires sur le médicament vétérinaire : nouvelles approches thérapeutiques et impact sur la santé publique, École nationale vétérinaire, Algérie. **23–24**.

Titouche YA, Hakem K, Houali B, Yabriri O, Malki A, Chergui N, Chenouf S, Yahiaoui I M, Labiad H, Ghenim S, Kechich-Bounar F, Chiril A G, Nadas N. (2013) .Detection of Antibiotics Residues in Raw milk Produced in Freha Area (Tizi-Ouzou), Algeria. *Veterinary Medicine*. **70**:2013 - 1843-5378.

Vedantam G, Hecht DW. (2003). Antibiotics and anaerobes of gut origin. *Current Opinion in Microbiology*.**6**: 457-461.

Wang Y, Wu C, Zhang Q, Qi J, Liu H, Wang Y, He T, Ma L, Lai J, Shen Z, Liu Y, Shen J.(2012) Identification of New Delhi Metallo- β -lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of Food Animal Origin. *PLoS ONE*. **7**:37152.

Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML, Griffin PM, Ostroff SM. (1991). Isolation of *Escherichia coli* serotype *O157:H7* and other Shiga-like-toxin-producing *E.coli* from dairy cattle. *Clinical Microbiology*. **29**:985-9.

Wells D M, James O B. (1973). Transmission of infectious drug resistance from animals to man Department of Microbiology, University of the West Indies. **71**: 209-209.

Winokur, P. L., Vonstein, D. L., Hoffman, L. J., Uhlenhopp, E. K. and Doern, G. V. (2001). Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*. **45**: 2716–2722.

Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, et Chong Y. (2002) Imipénème-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo β Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas Spp* and *Acinetobacter Spp*. *Clinical Microbiology*.**40**: 3798_3801.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Hyun S, Sundman K, Lee K , Walsh TR .(2009) Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemotherapy* .**53**: 5046–54.

ANNEXES

ANNEXE I

Propriétaire/éleveur : Nom

Prénom :

Lieu du prélèvement :

Date du prélèvement :

Type de prélèvement :

Codes du prélèvement :

Type d'animal :

Type de production : Laitière ; Viande ; Mixte

Mode d'élevage : Intensif ; Extensif

Stabulation : Libre ; Entravée

Type d'alimentation : Fourrage ; Concentré ; Autres

Abreuvement : Robinet ; Puits ; Rivières

Lavage des mamelles avant la traite : Oui ; Non

Nettoyage de l'étable avant la traite : Oui ; Non

Mode de la traite : Manuelle ; Mécanique

Antibiothérapie : Aucun ; Si oui Date

Mammite : Oui ; Non

ANNEXE II

Composition des milieux de culture et réactifs

Gélose PCA (Plat Count Agar)

Tryptone.....	5,0 g
Extrait autolytique de levure.....	2,5 g
Glucose.....	1,0 g
Agar agar bactériologique.....	12,0 g

pH7

Bouillon VBL (Bouillon lactosée vert biliée)

Peptone	10,0 g
Lactose	10,0 g
Bile	20,0 ml
Vert brillant	13,0 mg

pH 7,4

Bouillon de Giolitti Cantoni

Tryptone.....	10,0 g
Extrait de viande.....	5,0 g
Extrait de levure.....	5,0 g
Glycine.....	1,2 g
Mannitol.....	20,0 g
Pyruvate de sodium.....	3,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Chlorure de lithium.....	5,0 g
Tween 80.....	1,0 g

pH 6,9

Gélose de chapman au mannitol

Tryptone.....	5,0 g
Peptone persique de viande.....	5,0 g
Extrait de viande de bœuf.....	1,0 g
Mannitol.....	10,0 g
Chlorure sodium.....	75,0 g
Rouge de phénol.....	25 mg
Agar – agar	15,0 g

pH 7,4

Bouillon RAPPAPORT – VASSILIADIS

Peptone papenique de soja.....	4,50 g
Chlorure de sodium.....	7,20 g
Phosphate monopotassique.....	1,26 g
Phosphate dipotassique.....	0,18 g
Chlorure de magnesium anhydre.....	13,40 g
Vert malachite (oxalate).....	36,0 mg

Gélose Hektoen

Peptone pepsique de viande.....	12,0 g
Extrait autolytique de levure.....	3,0 g
Lactose.....	12,0 g
Saccharose.....	12,0 g
Salicine.....	2,0 g
Sels biliaires.....	9,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Thiosulfate de sodium.....	5,0 g
Citrate ferrique ammoniacal.....	1,5 g
Bleu de bromothymol.....	65 mg
Fuchsine acide.....	40 mg
Agar agar bactériologique.....	13,5 g

pH 7,6

Gélose de Triple Sugar Iron (TSI)

Extrait de viande de bœuf.....	03 g
Extrait de levure.....	03 g
Peptone tryptique.....	20 g
Chlorure de sodium.....	05 g
Citrate ferrique.....	0,3 g
Thiosulfate de sodium.....	0,3 g
Lactose.....	10 g
Glucose.....	01 g
Saccharose.....	10 g
Rouge de phénol.....	0,05g
Agar.....	12 g

pH 7,4

Milieu viande foie

Peptone viande foie.....	30,0 g
Glucose.....	2,0 g
Agar – agar.....	6,0 g

pH= 7,4

Gélose Mac Conkey

Peptone de caséine.....	17 g
Peptone de viande.....	03 g
Lactose.....	10 g
Mélange de sels biliaires.....	1,5 g
Chlorure de sodium.....	0,3 g
Rouge neutre.....	0,03 g
Cristal violet.....	0,001g

pH 7,4

Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf.....	3 g
Hydrolat de caséine.....	17,5 g
Amidon.....	1,5 g
Agar.....	17 g

pH 7,4

Eau peptonée

Peptone exemple d'indole.....	15 g
Chlorure de sodium.....	05 g

pH 7,2

Annexe III

Tableau N° V : Résultats du contrôle bactériologique du lait cru

Etablissement	ECH	flore Totale	Coliformes Totaux	Coliformes fécaux	Stréptocoque fécaux	<i>Staphylococcus aureus</i>	ASR	Observations	causes
Etablissement N°1	1	2.7.104 UFC/ml	2.4.101 germe/ml	0.6.101 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	SF
	2	3.7.103 UFC/ml	7.102 germe/ml	2.101 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	SF
	3	3.60.10 4 UFC/ml	6.101 germe/ml	2.101 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	SF
	4	2.10.104 UFC/ml	1.3.101 germe/ml	1.3.101 germe/ml	5	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	SF
	5	3.69.105 UFC/ml	1.1.103 germe/ml	2.101 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	FT AM+SF
	6	1.36.104 UFC/ml	6.101 germe/ml	1.3.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	7	1.75.104 UFC/ml	2.5.101 germe/ml	0.6.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
Etablissement N°2	8	4.54.105 UFC/ml	1.1.103 germe/ml	2.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	FT AM
	9	1.59.104 UFC/ml	1.1.103 germe/ml	2.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	10	1.23.104 UFC/ml	3.101 germe/ml	2.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	11	1.4.104 UFC/ml	1.1.103 germe/ml	2.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	12	1.35.104 UFC/ml	0.9.101 germe/ml	2.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
Etablissement N°3	13	8.72.104 UFC/ml	1.3.101 germe/ml	1.3.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	14	1.68.104 UFC/ml	1.3.101 germe/ml	1.3.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	15	1.98.104 UFC/ml	1.3.101 germe/ml	6.101 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	SF
Etablissement N°4	16	1.86.104 UFC/ml	6.101 germe/ml	6.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	17	2.36.104 UFC/ml	1.1.103 germe/ml	1.3.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	18	1.56.104 UFC/ml	1.1.103 germe/ml	1.3.101 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	SF
	19	1.49.104 UFC/ml	2.102 germe/ml	1.3.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	20	1.75.104 UFC/ml	2.102 germe/ml	1.3.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	21	2.69.104 UFC/ml	1.3.102 germe/ml	2.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	22	1.49.104 UFC/ml	2.101 germe/ml	2.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
Etablissement N°5	23	2.05.104 UFC/ml	2.101 germe/ml	2.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	24	1.59.103 UFC/ml	1.3.101 germe/ml	1.3.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	25	1.79.103 UFC/ml	1.1.103 germe/ml	2.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	26	1.41.104 UFC/ml	7.102 germe/ml	2.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	27	2.59.104 UFC/ml	2.5.102 germe/ml	1.3.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
	28	1.87.104 UFC/ml	7.102 germe/ml	1.3.101 germe/ml	0	00 UFC/ml	00 spores/ml	bonne qualité bactériologique	
Etablissement N°6	29	3.60.105 UFC/ml	1.1.103 germe/ml	1.1.103 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	FT AM+CF+SF
	30	2.85.104 UFC/ml	6.101 germe/ml	6.101 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	SF
	31	3.15.104 UFC/ml	1.3.101 germe/ml	1.3.101 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	SF
	32	2.05.104 UFC/ml	1.3.101 germe/ml	1.3.101 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	SF
Etablissement N°7	33	2.81.105 UFC/ml	1.1.103 germe/ml	1.1.103 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	FT AM+CF+SF
	34	2.36.104 UFC/ml	1.3.101 germe/ml	1.3.101 germe/ml	25	00 UFC/ml	00 spores/ml	mauvaise qualité bactériologique	SF

Annexe IV

Tableau N° VI : Résultats des diamètres d'inhibitions des souches, leurs phénotypes.

souche	Identification	AMC	TIC	FOX	CTX	CAZ	FEP	ERT	IMP	MER	TET	AN	CIP	DD-test	Hodge	synergie	Carba	phenotype
MVC 8 L	<i>Enterobacter sp</i>	6/R	11/R	6/R	9/R	9/R	16/R	18/R	17/R	21/I	6/R	17/S	21/I	Positif			Negatif	BLSE
MVC 13CH 1	<i>Morganella morganii</i>	14/R	12/R	27/S	27/S	27/S	28/S	25/R	24/S	26/S	21/S	20/S	22/S	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	
MVC 13CH 2	<i>Citrobacter freundii</i>	14/R	27/S	6/R	25/S	25/S	30/R	25/R	27/S	30/S	7/R	23/S	18/R	Positif	Positif	Positif	Positif	BLSE+
MVC 17 L	<i>klebsiella Pneumoniae</i>	6/R	12/R	23/S	6/R	10/R	7/R	Positif	Positif	Positif	Positif	BLSE + MBL						
MVC 17 EC	<i>klebsiella Pneumoniae</i>	6/R	9/R	23/S	6/R	10/R	7/R	Positif	Positif	Positif	Positif	BLSE + MBL						
MVI 18 L1	<i>Enterobacter sp</i>	6/R	6/R	6/R	11/R	10/R	17/R	21/R	23/I	24/S	7/R	15/I	6/R	Positif	Negatif	Positif	Negatif	BLSE
MVI 18 L2	<i>Enterobacter sp</i>	6/R	6/R	20/S	6/R	16/R	7/R	24/R	24/S	25/S	24/S	20/S	33/S	Negatif	Positif	Negatif	Negatif	
MVC 24 L	<i>klebsiella Pneumoniae</i>	6/R	6/R	6/R	10/R	10/R	18/R	17/R	17/R	20/I	15/R	18/S	20/I	Positif			Negatif	BLSE
MVI 24 EC	<i>E.coli</i>	16/R	17/R	12/R	30/S	28/S	27/S	24/R	24/S	25/S	14/R	14/I	30/R	Negatif	Negatif		Negatif	
MVI 24 L	<i>E.coli</i>	14/R	20/R	16/I	26/S	25/S	30/S	28/S	29/S	30/S	17/R	17/R	30/S	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	
MVC 25 L	<i>Enterobacter sp</i>	6/R	6/R	6/R	12/R	12/R	20/R	21/R	22/R	24/S	20/S	19/S	30/S	Positif			Negatif	BLSE
MVC 26 EC	<i>Enterobacter sp</i>	6/R	6/R	6/R	11/R	12/R	18/R	20/R	18/I	23/S	18/I	18/S	29/S	Positif			Negatif	BLSE
MV 26 L	<i>E.coli</i>	7/R	6/R	12/R	33/S	30/S	30/S	24/R	22/I	25/S	6/R	17/S	8/R	Negatif			Negatif	
MV 27 L 1	<i>E.coli</i>	6/R	6/R	17/I	6/R	9/R	10/R	21/R	25/S	25/S	20/S	7/R	24/S	Negatif		Negatif	Negatif	
MV 27 L 2	<i>klebsiella Pneumoniae</i>	10/R	20/R	10/R	23/S	20/R	25/S	27/I	22/I	28/I	21/S	16/S	22/S	Positif			Negatif	BLSE
MV 29 L	<i>klebsiella Pneumoniae</i>	6/R	6/R	16/R	21/R	17/R	20/R	26/R	18/I	18/I	20/S	20/S	26/S	contact	Positif	Negatif	Positif	
MVI 29 L	<i>E.coli</i>	6/R	12/R	10/R	6/R	15/I	6/R	contact	Positif	Positif	Positif	MBL						
MVI 29 EC	<i>E.coli</i>	6/R	9/R	8/R	6/R	13/R	6/R	contact	Positif	Positif	Positif	MBL						
MV 29 EC	<i>E.coli</i>	6/R	6/R	18/I	6/R	16/R	12/R	25/R	30/S	30/S	7/R	22/S	6/R	Negatif	Positif	Negatif	Positif	
MVI 30 L	<i>E.coli</i>	6/R	8/R	8/R	6/R	12/R	6/R	contact	Positif	Positif	Positif	MBL						
MVI 30 EC	<i>E.coli</i>	6/R	12/R	7/R	6/R	15/I	6/R	contact	Positif	Positif	Positif	MBL						
MV 30 L	<i>E.coli</i>	6/R	8/R	9/R	6/R	12/R	6/R	contact	Positif	Positif	Positif	MBL						
MVC 30L	<i>Enterobacter sp</i>	6/R	6/R	18/I	7/R	15/R	9/R	23/R	26/S	26/S	6/R	16/S	6/R	Positif			Negatif	BLSE
MVC 32 L	<i>Enterobacter sp</i>	6/R	6/R	6/R	8/R	9/R	18/R	23/R	23/I	24/S	17/R	20/S	28/S	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	BLSE
MVC 33 CH	<i>Enterobacter sp</i>	6/R	6/R	6/R	8/R	7/R	16/R	23/R	22/I	21/I	19/S	19/S	21/I	Positif	Positif	Negatif	Positif	BLSE +
MVC 34 CH1	<i>Enterobacter sp</i>	6/R	6/R	6/R	7/R	9/R	17/R	20/R	17/R	23/S	21/S	16/S	25/S	Positif	Positif	Positif	Positif	BLSE +MBL
MVC 34 CH2	<i>Enterobacter sp</i>	6/R	6/R	18/I	7/R	15/R	8/R	24/R	26/S	25/R	6/R	16/S	7/R	Negatif	Negatif	Positif	Negatif	MBL

Résumé

Notre étude a porté sur l'analyse bactériologique de 34 échantillons de lait cru de vache et/ou de chèvre et 68 écouvillons du pis collectés dans 7 fermes différentes dans la région de Béjaia. La sensibilité des souches aux antibiotiques a été testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion. La production d'une BLSE a été déterminée par la méthode de DD-test, quand à la production de carbapénèmase plusieurs méthodes différentes ont été utilisées dont le Hodge test, le Carba NP test ainsi que le test à l'EDTA.

L'analyse microbiologique a montré que 14 échantillons 41,17% du lait cru sont de mauvaise qualité bactériologique. 27 souches d'entérobactéries ont été retrouvées multirésistantes. Les phénotypes de résistance suivant ont été déduits 13 souches sont probablement productrices de BLSE, 12 souches probablement productrices de carbapénèmase dont 9 de type MBL.

Mot clés : lait cru, entérobactéries, β -lactamines, résistance, BLSE, carbapénèmase.

Abstract

Our study focused on bacteriological analysis of 34 raw milk samples and 68 udder swap from cows and /or goats collected in 7 different farms in Béjaia. Sensitivity of strains to antibiotics was assayed by the method of standard antibiogramme by diffusion. Producing ESBL was determined by the method of DD-test, when the production of carbapenemase different methods were used include Hodge test, the Carba NP test and the test with EDTA.

Microbiological analysis showed that 14 samples of raw milk 41,17% are be considered as substandard in quality. 27 Enterobacteriaceae strains multiresistant. The deduced phenotype include 13 strains are probably producing ESBL, and 12 strains probably producing carbapenemase including 9 MBL type.

Key words: Raw milk, enterobacteria, β -lactamines, resistance, ESBL, carbapenemase.