

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 en Secteur Biomédical et Vétérinaire



Réf :

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

MASTER

Thème

**Contribution à l'étude de la flore résistante aux
antibiotiques chez les oiseaux sauvages**

Présenté par : ***BALOUL Yanis***

Soutenu le : **18 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

Mme. CHIBANE Nouara	MAA	Président
Dr. GHAROUT Alima	MCB	Encadreur
Pr. TOUATI Abdelaziz	Professeur	Examineur

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Je remercie notre bon dieu le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la patience pour mener à terme ce travail.

D'abord, j'aimerais souligner ma profonde reconnaissance à ma promotrice Mme GHAROUT A. ainsi qu'au Professeur TOUATI, pour m'avoir guidé et orienter durant toute cette année académique. Mon admiration envers vos accomplissements est absolue. Mille mercis de m'avoir offert cette opportunité. Je remercie tous les membres du jury Pr TOUATI A, Mme CHIBANE .N, d'avoir examiné et évalué ce modeste travail. Je tiens à remercier chaleureusement Mlle MAIRI Assia pour sa précieuse aide au sein du laboratoire, merci pour tout .Je remercie également toute la délégation de la conservation des forêts des différentes communes de la Wilaya de Bejaia ainsi que celle du PNG ; à Monsieur BENALLAOUA et Rahma pour leur aide. Sans oublier l'équipe du petit labo.

Ma reconnaissance à toute l'équipe de Mr TOUATI A. pour leurs conseils et leurs esprits scientifiques.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

En premier lieu mes très chers parents, sans qui, je ne serai jamais arrivé à ce
niveau.

A ma Sœur : Anissa.

A tous les membres de ma famille. (Maternelle et paternelle)

A mes potes : Wallas ,Benkhi, Gigi, Poutchi, Ivankov

Mention spéciale pour Bébetto.

A tous mes amis.

«Que dieu vous bénisse».

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

Matériel et Méthodes

1. Prélèvements 5
2. Isolement et identification 5
3. Sensibilité des souches d'Entérobactéries au méropénème 5
4. Recherche de la production d'une β -lactamase à Spectre Etendu 6
5. Recherche de la production d'une carbapénémase par le test de Hodge 6
6. Confirmation de la production d'une carbapénémase par le Carba-NP test modifié 6

Résultats

1. Espèces étudiées 8
2. Influence des espèces sur la prévalence du portage total des souches résistantes 9
3. Influence des espèces sur la prévalence des différentes souches 10
4. Résultats du test de Hodge modifié 13
5. Résultats du Carba NP test modifié 14

Discussion et conclusion 15

Références bibliographiques 20

Annexes I

Liste des tableaux

Tableau I : Interprétation des résultats du carba-NP test modifié	7
Tableau 1: Nombre de prélèvements réalisés par espèce et lieux de prélèvements	8
Tableau 2: Prévalence des souches résistantes selon les espèces	9
Tableau 3: Prévalence des souches EPC selon les espèces.	11
Tableau 4 : Prévalence de <i>S.aureus</i> résistant à la méthiciline selon les espèces	12
Tableau 5 : Prévalence des souches d'Entérobactéries productrices de BLSE selon les espèces	13
Tableau 1* : Tableau de la classification des β -lactamases (Bush et Jacoby, 2010)	I
Tableau II*: Lecture de la galerie API 20E	VI
Tableau A* : Portage d'EBLSE chez les oiseaux sauvages	VII
Tableau B* : Portage d'EPC chez les oiseaux sauvages	VII
Tableau C* : Portage MRSA chez les Oiseaux sauvages	VIII
Tableau 1* : Lieux où ont été prélevées les souches d'EPC.	X
Chiffre*: Tableaux figurant en annexes	

Liste des figures

Figure A : Lieux ou ont été faits les prélèvements	9
Figure 1 : prévalence du portage des souches résistantes par espèce	10
Figure 2 : Prévalence des souches EPC par espèce.	11
Figure 3 : Prévalence des souches MRSA par espèce	12
Figure 4 : Prévalence des souches EBLSE par espèce.	13
Figure 5 : Test de Hodge modifié positif	14
Figure 6 : Résultats du Carba NP test modifié.	14
Figure 2* : Identification d'une <i>E. coli</i> productrice de BLSE par galerie API 20E	XI
Figure 3* : : Identification d'une <i>E. coli</i> productrice de BLSE par galerie API 20E	XI
Figure 4* : Test de sensibilité au disque de méropénème pour les souches d'EPC	XI
Figure 5* : Image de synergie par le D-D test	XII

Chiffre*: Tableaux figurant en annexes

Liste des Abréviations

AMC: Amoxicilline-clavulanate
AmpC : Céphalosporinases
AN: Acide nalidixique
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
UFC: Unité Formant Colonies
ERT: Ertapénème
EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP: Céfépime
FOX: Céfoxitine
GN: Gentamicine
I : Intermédiaire
IMP: Imipénème
KPC : *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase
SHV : Sulfhydryl Variable
MβL: Métallo-β-Lactamase
MC : Mac Conkey
MH : Mueller Hinton
NDM : New Delhi Metallo-β-lactamases
OXA : Oxacilline
TSA : Trypticase Soja
R : Résistant
S : Sensible

Introduction

La découverte des antibiotiques, notamment la pénicilline G en 1928 a sans doute été l'une des avancées thérapeutiques les plus importantes du vingtième siècle. L'utilisation de ces derniers depuis les années 1940 a considérablement réduit le taux de morbidité et de mortalité lié aux maladies infectieuses (Van Hoek et *al.*, 2011). Le succès de l'antibiothérapie n'a été que de courte durée, puisque les premières souches résistantes ont été décrites peu de temps après l'introduction de ces molécules en thérapeutique humaine. D'ailleurs, dès 1945, Alexander Fleming émit l'hypothèse que des résistances aux antibiotiques risquaient d'apparaître et que l'efficacité des antibiotiques à long terme dépendrait de l'usage qui en serait fait (Plough, 1945).

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif présents au sein de la flore intestinale normale des hommes et des animaux. Parmi les espèces bactériennes appartenant à cette famille des Enterobacteriaceae, on identifie des pathogènes humains responsables d'infections variées. Ainsi, les entérobactéries sont considérées comme la source principale d'infections communautaires et hospitalières. Les entérobactéries sont capables de disséminer facilement via une transmission manu portée ou via une contamination de l'eau et des aliments (Dortet et *al.*,2013).

Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés en médecine humaine. Les molécules de cette famille sont classées selon leurs structures chimiques dans 4 groupes distincts : les pénicillines, les céphalosporines, le monobactam et les carbapénèmes. Les carbapénèmes sont les b-lactamines les plus récemment développées et celles qui possèdent le spectre d'activité le plus large. Elles sont actives vis-à-vis de très nombreuses espèces de bacilles à Gram négatif dont les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Dortet et *al.*,2013).

L'excellente activité antibactérienne de ces carbapénèmes est liée en particulier à la rapidité de leur pénétration à travers la paroi externe des bacilles à Gram négatif et à leur stabilité vis-à-vis de la plupart des b-lactamases naturelles ou acquises, y compris les céphalosporinases, qu'elles soient chromosomiques ou plasmidiques, et les β -lactamases à spectre étendu (BLSE), par exemple de type TEM, SHV ou CTX-M. Les carbapénèmes sont limitées à un usage hospitalier, prescrits majoritairement dans le cadre du traitement d'infections nosocomiales. Cependant, l'augmentation importante de la prévalence des entérobactéries

productrices de BLSE en milieu communautaire surtout *E. coli* fait craindre une augmentation parallèle du nombre de prescriptions des carbapénèmes, non seulement à l'hôpital, mais aussi en ville (DORTET et *al.*,2013).

Ces dernières années, la prescription des carbapénèmes est devenue de plus en plus fréquente dans le traitement des infections documentées à bactéries productrices de BLSE, mais également en traitement probabiliste en cas d'infections nosocomiales sévères. Cependant, comme pour toutes les β -lactamines mises sur le marché, des souches résistantes sont apparues (Grall, 2011).

Chez les entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes fait intervenir deux mécanismes principaux : une diminution qualitative et/ou quantitative de la perméabilité membranaire bactérienne associée à la surexpression d'enzymes possédant une très faible activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, ou l'acquisition de gènes codant pour des enzymes pouvant hydrolyser les carbapénèmes : les carbapénémases (DORTET et *al.*,2013).

La forte augmentation de la prévalence du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) en communauté a attiré l'attention sur le contrôle des sources de SARM communautaires. Les ménages sont un point d'échange potentiel, non seulement pour le SARM, mais aussi pour d'autres staphylocoques d'importance clinique vétérinaire et humaine (Davis et *al.*,2012)

Le *S. aureus* a été isolé de nombreux mammifères domestiques et sauvages et des oiseaux sauvages et domestiques et certains reptiles. Les animaux peuvent être porteurs asymptomatiques ou peuvent souffrir des voies respiratoires, gastro-intestinales ou de la peau et les infections des tissus mous. *S. aureus* est une cause significative de la mammite chez les vaches et les petits ruminants. Que les animaux peuvent être porteurs persistants de *S. aureus* est encore à déterminer (Doyle et *al.*, 2012).

Les bactéries ont démontrés une remarquable capacité à développer différents types des mécanismes de résistance qui interviennent dans la résistance aux antibiotiques et qui sont, au départ, tout à fait toxiques pour eux. (Badrul, 2013).

L'émergence et la dissémination rapide de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries est maintenant une préoccupation mondiale (Mahmudur *et al.*, 2015). La résistance aux antibiotiques acquise par les organismes dans un écosystème donné, peut facilement être transférée entre les organismes dans différents écosystèmes. Ceci, à son tour, est responsable de l'épidémie à grande échelle de bactéries multi résistantes. Maintenant, il est évident que les bactéries résistantes se trouvent dans les différents compartiments de l'environnement en raison d'une mauvaise utilisation, d'une sur-utilisation des antibiotiques ainsi que d'infrastructures de soins de santé non adaptés (Mahmudur *et al.*, 2015).

Les premières bactéries résistantes aux antibiotiques mentionnés dans la faune sauvages étaient en fait chez des oiseaux sauvages sur des souches d'*Escherichia coli* résistantes à plusieurs antibiotiques, par exemple chloramphénicol, isolé chez les pigeons autour de 1975 (Bonnedahl et Järhult, 2014). De nombreuses espèces d'oiseaux sauvages ont été trouvés porteuses de bactéries résistantes aux antibiotiques. Des souches d'*E. coli* résistants ont été isolés à partir de canards, des oies, le cormoran, les oiseaux de proie, des mouettes, colombes et passereaux (Mahmudur *et al.*, 2015).

Les oiseaux sauvages peuvent servir de réservoirs et vecteurs de bactéries résistantes aux antibiotiques appartenant à plusieurs espèces qui ont une importance vétérinaire et médicale. En raison de leur mobilité fréquente et la facilité avec laquelle ils prennent la nourriture à partir de différents environnement, ils peuvent induire des contaminants fécaux dans les réservoirs d'eau naturels tels que les lacs et rivières, les oiseaux sauvages sont considérés comme des bio indicateurs environnementaux importants et des vecteurs de résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Mahmudur *et al.*, 2015).

En raison de leur présence diversifiée dans différents dans des niches écologiques et leur facilité à ramasser les bactéries humaines et environnementales, les oiseaux sauvages pourraient agir comme des miroirs des activités humaines. Ils reflètent la situation de la résistance aux antibiotiques d'une manière plus large que beaucoup d'autres animaux (Badrul, 2013).

A l'université de Bejaïa, une équipe de chercheurs dirigée par le Professeur TOUATI A. travaillent sur la résistance aux antibiotiques. Leurs travaux de recherches sont essentiellement orientés sur la résistance aux antibiotiques des souches d'origine clinique, environnementale, alimentaire, animaux d'élevage et de compagnie. A notre connaissance

aucun travail sur la résistance aux antibiotiques des souches bactériennes isolées chez les oiseaux sauvages n'a été publié en Algérie. C'est dans ce sens que s'inscrit cette étude qui a pour objectif d'évaluer le portage fécal de bactéries résistantes aux antibiotiques isolées chez les oiseaux sauvages. Pour cela nous avons adopté la démarche expérimentale suivante :

- Isolement et identification des souches d'entérobactéries produisant des β -lactamase à spectre étendu et de carbapénémase et des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthiciline (MRSA) à partir de prélèvements de selles.
- Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques et déduction des phénotypes de résistance.

1. Prélèvements

Au cours de notre étude qui s'est déroulée durant la période de Janvier à Avril 2016, des échantillons de selles ont été obtenus par écouvillonnage à partir de différentes espèces d'oiseaux sauvages prélevés dans différents endroits des Wilayas de Bejaia et Jijel (Tableau1). Les échantillons ont été ensuite acheminés directement au laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Bejaia pour être analysés.

2. Isolement et identification

Chaque écouvillon a été introduit dans 1mL de Bouillon Trypticase Soja (TSB) qu'on incube à 37°C/1h. Après incubation, 50µl du pré-enrichissement ont été utilisés pour réaliser un enrichissement dans 180µl de TSB contenant de la vancomycine (32µg/ml) et respectivement de l'ertapénème (0.5µg/ml) et de la céftazidime (1µg/ml) et dans 180µl de bouillon Giolitti Cantoni additionné de la vancomycine (32µg/ml), de la colistine (10µg/ml) et de l'oxacilline (4µg/ml). Après incubation à 37°C/ 24h pour les Entérobactéries et 48h pour les staphylocoques, les tubes sont ensemencés respectivement sur gélose MacConkey pour la recherche des souches d'Entérobactéries résistantes et sur gélose Baird Parker pour la recherche des SARM, additionné des mêmes antibiotiques que ci-dessus.

Après incubation, les colonies noires, brillantes, entourées d'un halo clair ayant poussées sur gélose Baird Parker sont probablement identifiées comme des souches de SARM. Tandis que pour les colonies présomptives d'Entérobactéries, elles ont été réisolées sur gélose Hecktoen et identifiées à l'aide de galeries API 20E (Bio-Mérieux, France).(Figure 1 et 2, annexe VII).

3. Sensibilité des souches d'Entérobactéries au méropénème

La sensibilité des souches d'Entérobactéries au méropénème a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité Européen de l'Antibiogramme EUCAST, 2015. (www.eucast.org). Les souches ayant un diamètre d'inhibition <25mm ont été considérées comme résistantes.(Figure 4, annexe VII).

4. Recherche de la production d'une β -lactamase à Spectre Étendu

La présence d'une β -lactamase à spectre étendu a été détectée par le test de synergie (DD-test) qui consiste à déposer des disques de céftazidime (CAZ, 30 μ g), céfotaxime (CTX, 30 μ g), aztréonam (ATM, 30 μ g) et céfépime (FEP, 30 μ g) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'amoxicilline /acide clavulanique (AMC, 20/10 μ g). L'apparition d'une image de synergie entre le disque d'augmentin et les disques de céftazidime, céfotaxime, aztréonam et céfépime indique la production d'une BLSE (Jarlier et *al.*, 1988).

5. Recherche de la production d'une carbapénémase par le test de Hodge

Après avoirensemencé par écouvillonnage une gélose de Mac Conckey par une souche d'*E. coli* (ATCC25922), on dépose un disque d'imipénème (IMP, 10 μ g) au centre de la boîte. Les souches à tester sontensemencées par une strie allant du disque d'Imipénème vers la périphérie de la boîte en présence d'un témoin positif et d'un témoin négatif sensible. 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).

6. Confirmation de la production d'une carbapénémase par le Carba-NP test 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).

Un volume de 200 μ l de tampon de lyse (CTAB : Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide 0.02 %) a été dispensé dans un tube Eppendorf. Une öse calibrée (10 μ l) de colonies bactériennes a été dissociée dans le tampon de lyse, et vortexée 1 à 2 min. Ce volume a été réparti dans 2 tubes Eppendorf (chacun 100 μ l) numérotés "A" et "B". On a ajouté 100 μ l de la solution A dans le tube "A" et 100 μ l de la Solution A additionnée d'Imipénème (6mg/ml) dans le tube Eppendorf "B". Ces solution ont été vortexées et incubées à 37°C pendant un

maximum de 2h. La lecture visuelle de la couleur a été réalisée dans chaque tube Eppendorf (Tableau III). Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une couleur orange/jaune dans le tube "B", tandis que la couleur du tube "A", reste inchangée (Bakour et al., 2015).

Ce test a été réalisé en présence d'un témoin positif et négatif pour sa validation.

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%.
- 2- Mélanger 2ml de la solution concentrée de rouge de phénol dans 16.6ml d'eau distillée.
- 3- Ajouter au mélange 180µl d'une solution de ZnSO₄ (10mM) pour obtenir une concentration finale de ZnSO₄ à 0.1mM. 4- Ajuster le pH à 7,5 avec une solution de NaOH (1N).

Tableau I : Interprétation des résultats du carba-NP test modifié (Bakour et al., 2015).

Tube A	Tube B	Interprétation
Rouge	Rouge	Pas de production de carbapénèmases
Rouge	Jaune/orange	Production de carbapénèmases
Jaune	Jaune	Non interprétable

1. Espèces étudiées

Au cours de notre étude, 265 prélèvements ont été effectués sur 7 espèces différentes d'oiseaux sauvages (tableau1).

Tableau1 : Nombre de prélèvements réalisés par espèce et lieux de prélèvements

Espèce	Nombre de prélèvements	Lieux de prélèvements	Statut
Goéland	93	Marraïns Tamellahth Oued aguerioune Port de pêche de Bejaïa Lac Mezaïa Oued El Djemâa Décharge de sidi Boudrahem	Sédentaire
Mouette	84	Marraïns tamellahth Oued aguerioune Port de pêche de Bejaïa Oued Soummam Jijel (El Aouana, Ziama mansouriah, Taza)	Sédentaire
Canard colvert	30	Lac Tizi Ahmed -Lac noir	Sédentaire
Grèbe castagneux	28	Barrage Tichy Haf -Lac Ikker	Sédentaire
Foulque macroule	23	Barrage Tichy Haf Lac Mezaïa	Sédentaire
Merle noir	3	Lac Alsous	Sédentaire
Perdrix	4	Lac Alsous	Sédentaire

COMMUNES DE LA WILAYA DE BEJAIA (BGAYET)

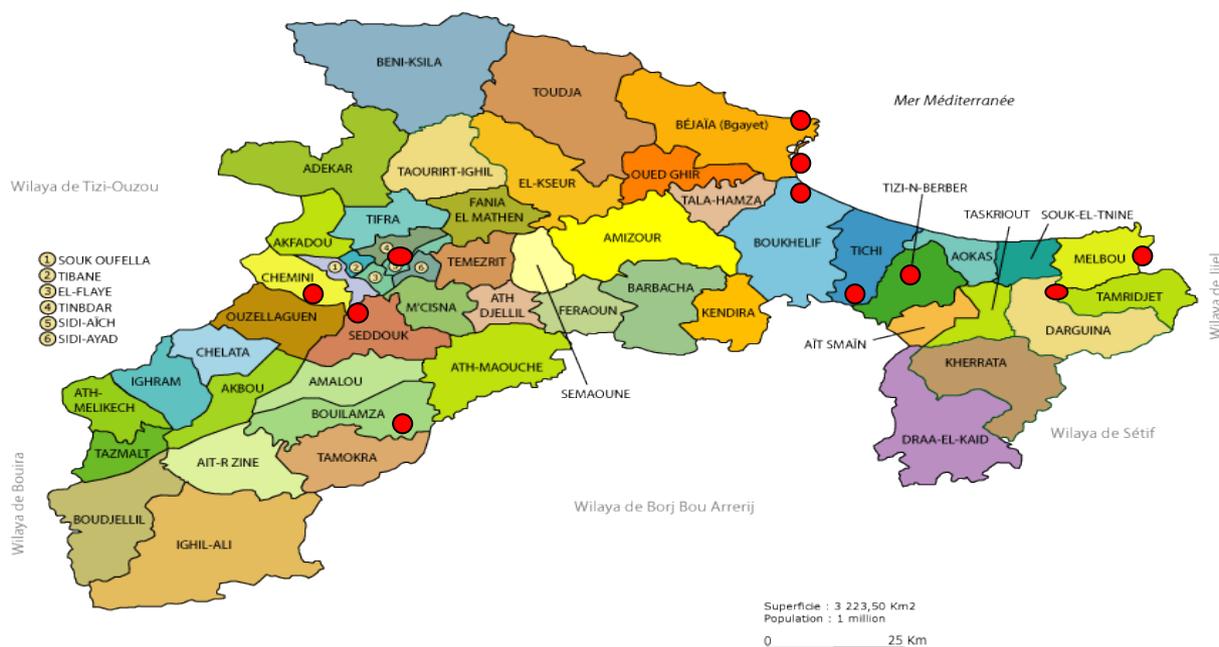


Figure A : Lieux ou ont été faits les prélèvements.

2. Influence des espèces sur la prévalence du portage total des souches résistantes

Tableau 2 : Prévalence des souches résistantes selon les espèces

Espèce	Portage total des souches résistantes	Total des prélèvements
Goéland	17	93
Mouette	22	84
Canard Colvert	13	30
Grèbe castagneux	1	28
Foulque macroule	3	23
Perdrix	0	4
Merle noir	0	3
Total	56	265

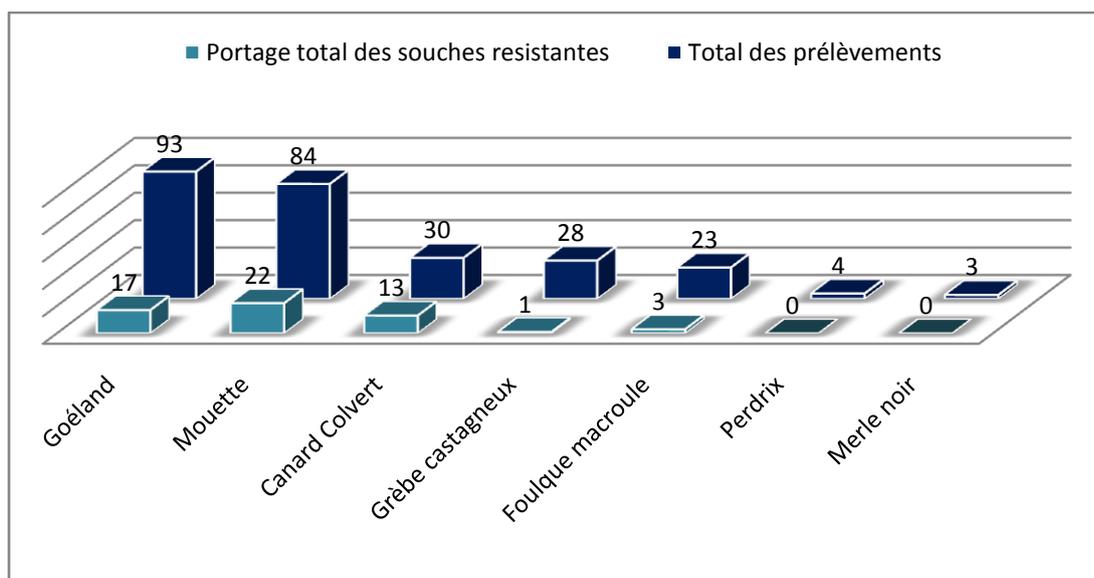


Figure1 : prévalence du portage des souches résistantes par espèce.

Au total ,56 souches (EPC, BLSE, MRSA) (Figure 1, tableau 2) ont été isolées à partir des différentes espèces prélevées. Les isolements qui ont été réalisés sur différentes gélose ont permis de sélectionner 13 souches d’EPC (Tableau 3), 4 souches BLSE (Tableau4) et 39 souches de MRSA (Tableau 5), principalement isolées chez le Goéland (30%), la Mouette (39%), et le Canard Colvert (23%). L’analyse statistique démontre une différence significative entre le portage des souches résistantes et le type d’espèce (p-value<0.05).

3. Influence des espèces sur la prévalence des différentes souches

La prévalence des souches d’EPC isolées chez ces oiseaux sauvages sont donnés dans le (Figure 2, Tableau 3). La comparaison statistique obtenue ne démontre aucune corrélation entre les souches d’EPC et les espèces où elles ont été retrouvées (p-value>0.05).

Figure 2 : Prévalence des souches EPC par espèce.

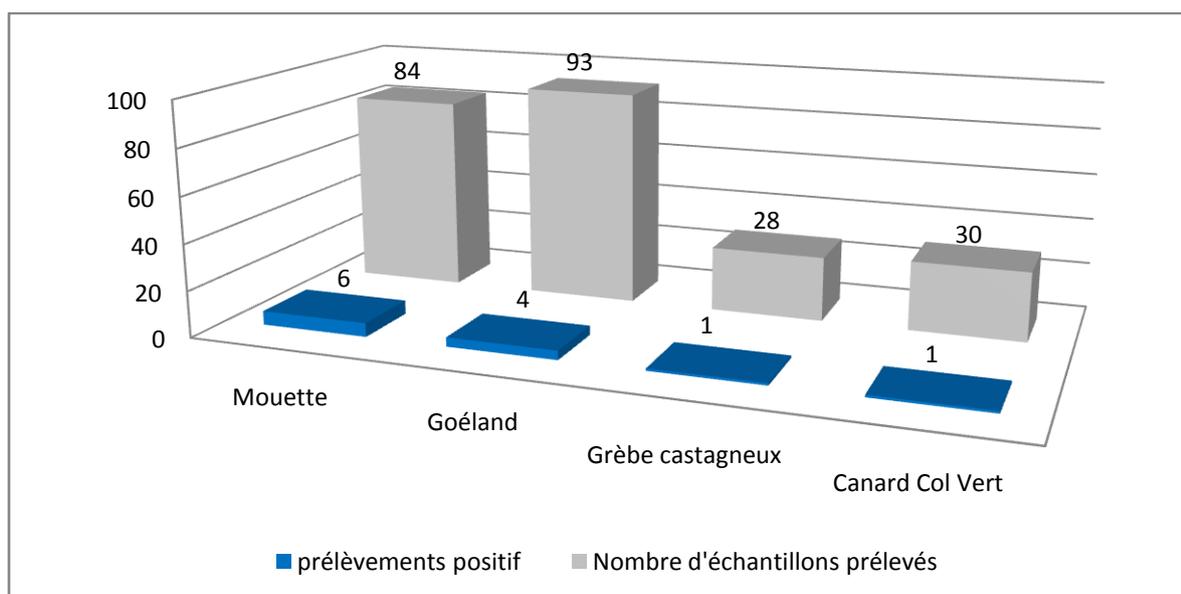


Tableau 3 : Prévalence des souches EPC selon les espèces.

Espèce	prélèvements positif	Nombre d'échantillons prélevés	Espèces identifiées	Phénotype de résistance	Pourcentage
Mouette	6	84	1/ <i>Citrobacter werkmanii</i> 2/ <i>E.coli</i> 3/ <i>Raoultella ornitholytica</i> 1/ <i>K.pneumoniae</i>	OXA-48	7,14%
Goéland	4	93	1/ <i>E.coli</i> 1/ <i>K.oxytoca</i> 1/ <i>Pluralibacter gergoviae</i> 1/ <i>K.pneumoniae</i>	OXA-48	4,35%
Grèbe castagneux	1	28	1/ <i>K.pneumoniae</i>	OXA-48	3,57%
Canard Col Vert	1	30	1/ <i>K.pneumoniae</i>	OXA-48	3,33%

La prévalence des souches de MRSA isolées chez ces oiseaux sauvages sont donnés dans le (Tableau 4, figure 3). La comparaison statistique obtenue montre une corrélation entre les souches d'MRSA et les espèces où elles ont été retrouvées (p-value<0.05).

Tableau 4 : Prévalence de *S.aureus* résistant à la méthiciline selon les espèces.

Espèce	prélèvements positif	Nombre d'échantillons prélevés sur l'espèce	Pourcentage
Mouette	13	84	15,47%
Goéland	12	93	12,90%
Canard Col Vert	12	30	40%
Foulque macroule	2	23	8,70%

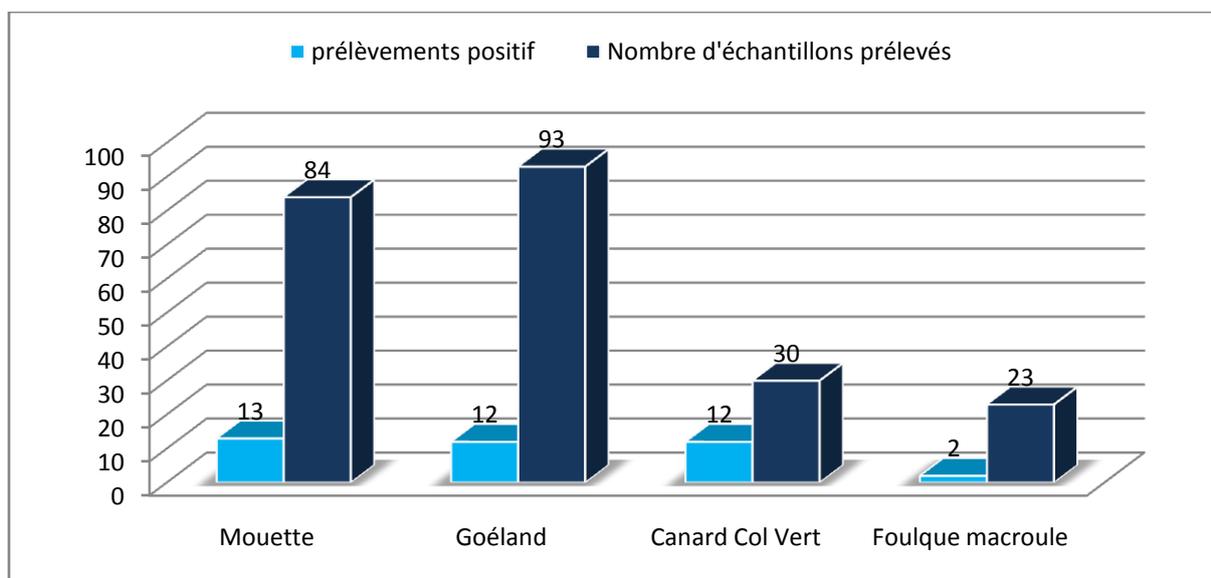


Figure 3 : Prévalence des souches MRSA par espèce

La prévalence des souches d'Entérobactéries productrices de BLSE sont données dans le (tableau 5, Figure4). La comparaison statistique qui a été réalisée ne démontre aucune différence significative entre les espèces et les souches d'Entérobactéries productrices de BLSE (p-value>0.05).

Tableau 5 : Prévalence des souches d'Entérobactéries productrices de BLSE selon les espèces

Espèce	prélèvements positif	Nombre d'échantillons prélevés sur l'espèce	Espèces identifiées	Pourcentage
Mouette	2	58	<i>E.coli</i> <i>E.coli</i>	3,45%
Goéland	1	53	<i>E.coli</i>	1,88%
Foulque macroule	1	20	<i>E.coli</i>	5%

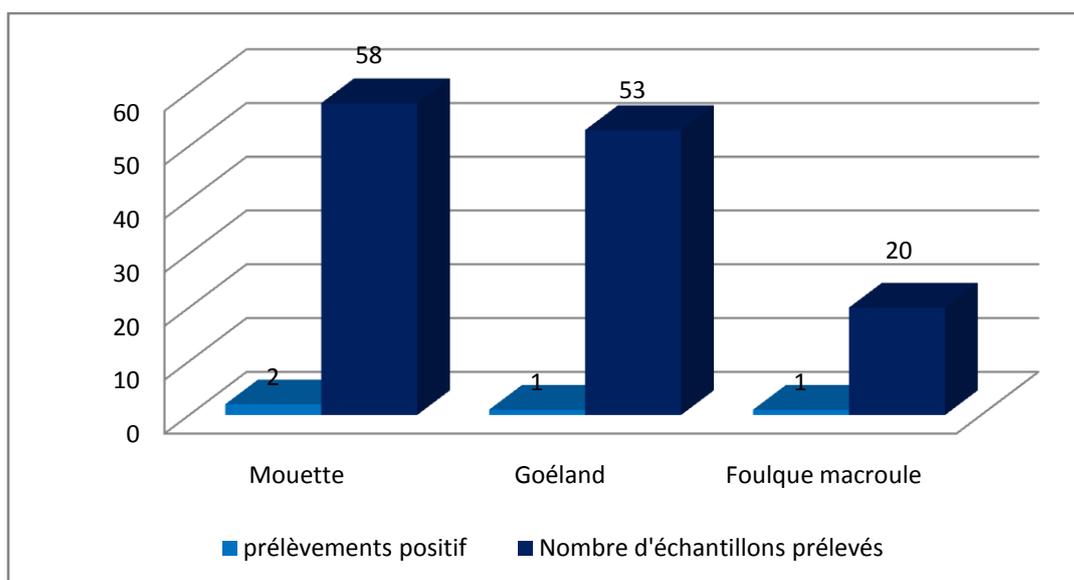


Figure 4 : Prévalence des souches EBLSE par espèce.

4. Résultats du test de Hodge modifié :

Tous les tests sont revenus positifs avec apparition d'une distorsion (Figure 5 et tableau B, annexe V).

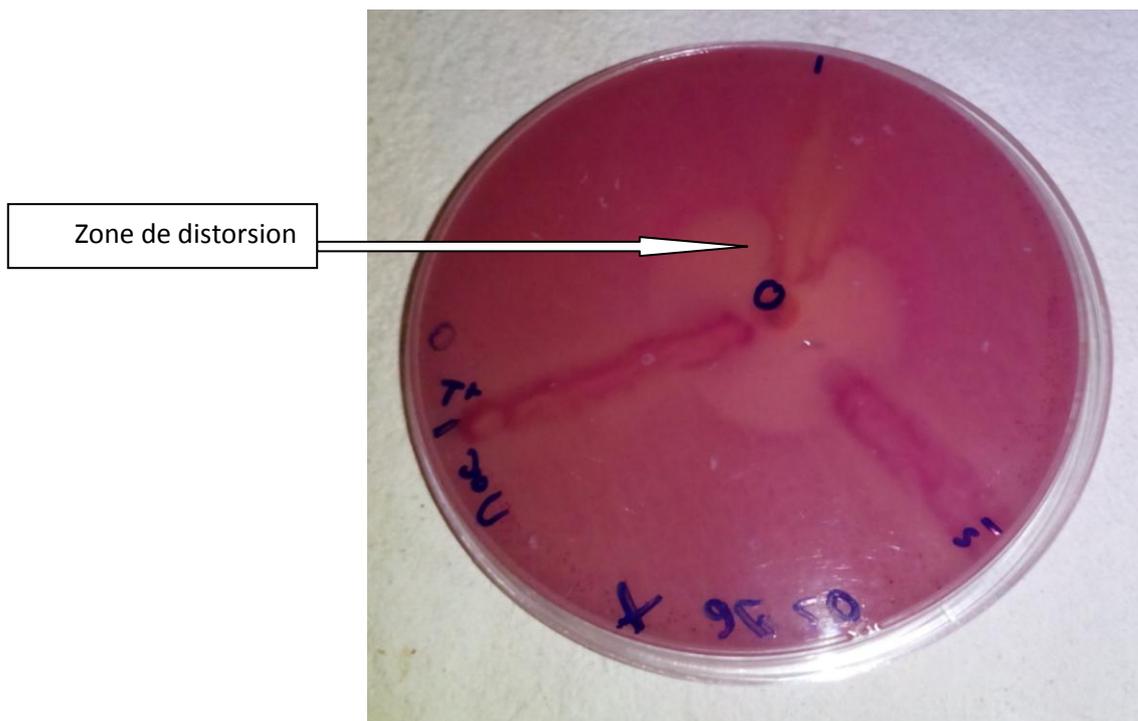
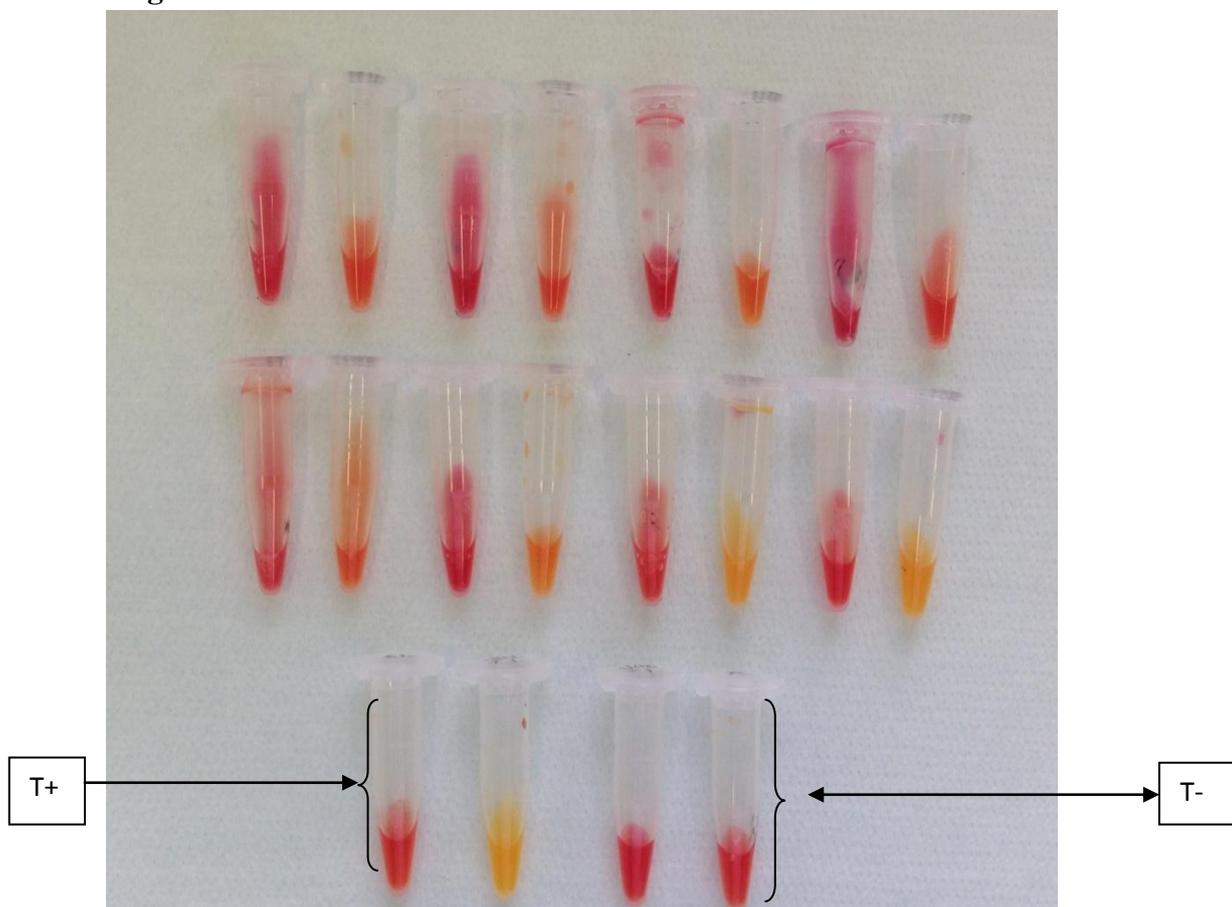


Figure 5 : Test de Hodge modifié positif

5. Résultats du Carba NP test modifié

Figure 6 : Résultats du Carba NP test modifié.



Après incubation d'environ deux heures, les résultats du Carba NP test modifié sont montrés dans la figure ci-dessus.(figure 6)

Discussion

La découverte des antibiotiques, notamment la pénicilline en 1928 a sans doute été l'une des avancées thérapeutiques les plus importantes du vingtième siècle. L'utilisation de ces dernières depuis les années 1940 a considérablement réduit le taux de morbidité et de mortalité liées aux maladies infectieuses (Van Hoek et *al.*,2011)

Il est évident de noter que l'utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques a longtemps contribué à l'émergence et à la large diffusion des déterminants de la résistance « résistome », défini comme étant tous les gènes impliqués directement ou indirectement dans la résistance aux agents antimicrobiens (Diene et *al.*,2013).

Les carbapénèmes sont aujourd'hui parmi les traitements de choix des infections sévères dues aux Entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Mais leur utilisation pourrait être compromise par l'émergence de souches résistantes également aux carbapénèmes (Cuzon et *al.*,2010).

La détection phénotypique des différentes carbapénémases est basée sur leur capacité ou non à hydrolyser des substrats particuliers ainsi que sur leurs profils d'inhibition en présence de certains composés. Plusieurs tests phénotypiques sont disponibles commercialement, mais leur efficacité peut être limitée par la fréquente association de plusieurs β -lactamases différentes au sein d'une même souche bactérienne. Seule l'utilisation de tests moléculaires permet de confirmer la prédiction des tests phénotypiques et d'identifier clairement le(s) gène(s) impliqué(s) dans le mécanisme de résistance (Philippon et *al.*, 2006).

L'analyse de l'antibiogramme est généralement la première étape dans la détection de carbapénémases. L'ertapénème est un indicateur très fiable dû à sa grande sensibilité, mais il est peu spécifique. Il doit être couplé à une autre carbapénème (ex : méropénème) pour augmenter la spécificité. De plus, la résistance à une carbapénème n'implique pas automatiquement la présence d'une carbapénémase; des tests supplémentaires doivent être entrepris pour identifier le mécanisme de résistance.

Nous avons sélectionné des souches résistantes ou de sensibilité réduite à l'imipénème Ce dernier est le seul carbapénème utilisé dans les laboratoires et parfois absent dans l'antibiogramme. Ce carbapénème ne constitue pas la molécule de choix pour le criblage des carbapénémases, vue la sensibilité de certaines carbapénémases à cette molécule.

Le test de Hodge modifié permet de détecter les carbapénèmases de classes A et D, mais il peut engendrer des résultats faussement positifs chez les souches possédant une AmpC surexprimée. D'autre part, les carbapénèmases de classe B peuvent ne pas être détectées par ce test. Ce test peut parfois être faussement négatif, notamment avec les souches productrices de carbapénèmases de type NDM-1. L'ajout de ZnSO₄ (100 µg/ml) dans le milieu permet d'augmenter très notablement la sensibilité du test dans ce cas (Rai et *al.*, 2011).

Les carbapénèmases de classe A sont habituellement inhibées par l'acide boronique et l'acide clavulanique. Les enzymes de type KPC sont capables d'hydrolyser presque toutes les β-lactamines : pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames (aztréonam) seule l'activité des céphamycines et de la céftazidime est peu modifiée. Parmi céphalosporines de troisième génération, le céfotaxime est la molécule la plus hydrolysée, et parmi les carbapénèmes, KPC possède l'affinité la plus élevée pour le méropénème, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactame (Cuzon et *al.*, 2010).

Les carbapénèmases de classe B (VIM, IMP...) confèrent la résistance à diverses β-lactamines telles que les pénicillines avec une sensibilité variable à la pipéracilline, aux C3G, aux carbapénèmes ou encore aux céphamycines. Seul l'aztréonam semble peu ou pas inactivé (Barrial et Scotet, 2006).

En Algérie, ces enzymes sont isolées pour la première fois chez *A.baumannii* par (Boulangier et *al.*, 2012 ; Bakour et *al.*, 2014). Entre Janvier et Mai 2008, cinq souches d'entérobactéries résistantes à l'IMP étaient isolées à partir de deux patients au service de réanimation de l'hôpital militaire d'Alger. Ces souches étaient productrices de carbapénèmases de type métallo-β-lactamase (VIM-19) (Frederic et *al.*, 2010). Yousfi et *al.*, 2016 ont rapporté la présence de NDM-5 chez des animaux de compagnie.

Enfin, OXA-48, carbapénémase appartenant à la classe D, est l'une des carbapénèmases les plus récemment décrites. Ces enzymes hydrolysent les aminopénicillines, les carboxypénicillines, et partiellement l'imipénème malgré une grande affinité de l'enzyme pour ce substrat. Son activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. En absence d'autres mécanismes de résistance (autres β-lactamases de type BLSE ou AmpC plasmidique, perte de porines, ou pompes à efflux), elle n'entraîne qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes. De plus, l'hydrolyse des céphalosporines est quasi-inexistante. Elle a émergé en Turquie à partir d'une souche de *K. pneumoniae* (KP 11978) et

diffusé dans d'autres pays du pourtour méditerranéen (Carrère et al., 2008 ; Canton et al., 2012). Leur distribution dans le monde entier comprend maintenant des pays d'Europe (Cuzon et al., 2008 ; Potron et al., 2011), du pourtour méditerranéen (Potron et al., 2011) et d'Afrique (Liban, Tunisie, Israël, Egypte) (Matar et al., 2010 ; Mocquet et al., 2011 ; Lahlaoui et al., 2012). Des souches ont été aussi détectées en Argentine (Castanheira et al., 2011). Depuis, des épidémies ont été décrites à différents endroits du globe, incluant notamment des pays d'Afrique du Nord (Benouda et al. 2010), du Moyen-Orient (Dortet et al., 2012). En Algérie, deux études rapportent la description d'OXA-48 chez *K. pneumoniae* (S103/11) isolées en Octobre 2011 à partir de deux cultures de sang appartenant à un patient masculin âgé de 18 mois qui a eu une leucémie, hospitalisé dans le service de pédiatrie de l'hôpital militaire d'Alger (Aggoune et al., 2014) et une autre souche d'*E. coli* isolée de pus chez une personne de 78 ans, admis en chirurgie générale au niveau de l'hôpital militaire de Constantine (Agabou et al., 2014).

Les bactéries multi résistantes chez les Oiseaux sauvages a été rapportée dans plusieurs régions du monde. Cependant, en Algérie aucun travail n'a été publié dans ce sens, ce qui justifie le présent travail. Les entérobactéries peuvent facilement diffuser dans les différents écosystèmes par le biais de la chaîne alimentaire et de l'eau. L'émergence et la diffusion de la résistance chez les entérobactéries représentent une sérieuse menace pour la santé publique (Santos et al., 2013).

Dans notre étude nous avons échantillonné une population d'oiseaux dans différentes régions de la wilaya de Bejaia et ces zones limitrophes, les échantillons ont été principalement prélevés à partir d'oiseaux associés à un environnement humide (Table1), qui comprenait des mouettes (n= 84), canards Colverts (n= 30), Goélands (n= 93), Foulque macroule (n =23), Grèbe castagneux (n= 28) , Merle noir (n =4) et le Perdix (n =3). Nous avons isolés au total 13 Entérobactéries productrices de carbapénémase ; 4 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Raoultella ornitholytica*, 3 *Escherichia coli*, 1 *Enterobacter gergoviae*, 1 *Klebsiella oxytoca* et 1 *Citrobacter werkmanii*. Quatre Entérobactéries productrices de BLSE ; toutes ont été identifiées comme étant des *E.coli*, ainsi que 39 souches de *S.aureus* résistant à la méthiciline, ce qui représente un taux de portage total de 21,87%, ce dernier est relativement élevé au résultat rapporté par Mahmudur et al., 2015 (12,94%)

La prévalence des EPC est de 4,52% dans notre étude, ce résultat n'est pas similaires a celui rapporté par Badrul, 2013 au Bangladesh sur les 12 EPC isolées 83.33% ont été isolées

sur la côte Est où la densité de la population est élevée (Tableau 1 , annexe 2). Soulignant le fait que l'influence de l'activité humaine est une condition préalable à la résistance aux antibiotiques acquises dans l'environnement. (Bonnedahl, 2011)

Au cours de notre étude, les résultats montre une très faible prévalence des EBLSE avec un taux de 2.07%, ce dernier est relativement faible par rapport a celui rapporté par Badrul, 2013 au Bengladesh (27%), mais un résultat légèrement supérieur a celui rapporté par Silva et *al.*,2010 au Portugal avec 0% .

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) a émergé il y a 50 ans, comme un agent pathogène nosocomial mais dans la dernière décennie, il est devenu également une cause majeure d'infections graves dans la communauté, notamment chez l'Homme et l'animal (Stefani et *al.*, 2012). Il y a seulement un nombre limité d'études sur la prévalence du SARM chez les animaux sauvages et la plupart d'entre eux se sont concentrés sur les animaux en captivité qui ont eu un contact régulier avec les humains, Cependant, la présente étude est la première spécifiquement pour évaluer la présence du SARM chez les oiseaux sauvages vivant en liberté (Porrero et *al.*,2013).

Durant notre étude, la prévalence du SARM chez les oiseaux sauvages est de 14,71%. Ce taux est supérieur à celui rapporté par Loncaric et *al.*,2013 en Autriche (9,4%). La prévalence la plus élevée dans notre étude est observée chez la le canard Colvert avec un taux de 40% et chez la mouette avec 15,47% . Cette forte prévalence est due probablement à une sur-utilisation des antibiotiques. La présence de souches de SARM peut persister dans l'environnement de cette faune et coloniser ainsi d'autres secteurs, en tenant compte du fait qu'ils soient très mobiles.

En conclusion, notre étude contribue à l'évidence croissante que la multi résistance des Entérobactéries ainsi que le SARM peuvent être trouvés dans la faune sauvage. La présence de ces isolats dans la faune sauvage souligne la complexité de la dissémination de la résistance aux antibiotiques. En outre, la présente étude a confirmé que les oiseaux sauvages pourraient représenter un vecteur important non seulement dans la dissémination des entérobactéries produisant notamment des carbapénémases, mais aussi comme un vecteur du SARM.

Cette étude montre un niveau relativement élevé de pression de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement, donc en perspectives de ces résultats préliminaires, ils doivent être complétés par :

- Une caractérisation moléculaire de toutes nos souches et leur identification afin de connaître leur origine.
- Les résidus d'antibiotiques et des gènes de résistance qui circulent dans l'environnement doivent être étudiés dans des niches écologiques différentes.
- Une base de données nationale devrait être établie en ce qui concerne la distribution d'antibiotiques dans différents domaines.

1. Agabou A., Pantel A., Ouchenane Z., Lezzar N., Khemissi S., Satta D., Sotto A., et Lavigne JP. 2014. First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33(9):1641-6
2. Aggoune Nadjet, Tali-Maamarb Hassiba, Assaousb Farida, Benamroucheb Nabila, Naima Malek, et Rahalb Kheira. 2014. Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria , Pages 327–329.
3. Badrul Hasan. 2013. Antimicrobial Resistance and Production of Extended Spectrum Beta- Lactamases in *Enterobacteriaceae* from Birds in Bangladesh. *Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 911. 75 pp
4. Bakour S., Olaitan A.O., Ammari H., Touati A., Saoudi S., Saoudi K., Rolain JM. 2014. Emergence of Colistin- and Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 Clinical Isolate in Algeria: First Case Report. 21(3):279-85
5. Bakour S., Olaitan A. O., 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. *Microb Drug Resist.* 21, 279-85.
6. Barrial K. et Scotet J., 2006. Classification raisonnée des J3-lactamases chez les bacilles gram négatif. Thèse des bactériologies. Perspectives d'évolution. Encadrement Dr Tigaud S. ppl2.
7. Benouda A., Touzani O., Khairallah MT., Araj GF., et Matar GM. 2010. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Ann Trop Med Parasitol.* 104(4):327-30

8. Bonnedahl J. 2011. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae isolated from wild birds.
9. Bonnedahl Jonas et Järhult Josef. 2014. Antibiotic resistance in wild birds. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2014; 119: 113–116
10. Boulanger A., Naas T., Fortineau N., Figueiredo S., & Nordmann P. 2012. NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), 2214-2215.
11. Bush K., Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 54, 969-76.
12. Cantón R., Akóva M., Carmeli Y., Giske C. G., Glupczynski Y., Gniadkowski M., & Samuelsen. 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(5), 413-431.
13. Carrër A., Poirel L., Eraksoy H., Cagatay A. A., Badur S., & Nordmann P. 2008. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(8), 2950-2954.
14. Castanheira M., Costello SE., Woosley LN., Deshpande LM., Davies TA., Jones RN. 2014. Evaluation of clonality and carbapenem resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex and Enterobacteriaceae isolates collected in European and Mediterranean countries and detection of two novel β -lactamases, GES-22 and VIM-35. 58(12):7358-66
15. Cuzon Gaele, Naas Thierry, Demachy Marie Claude, and Nordmann Patrice. 2008. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* Isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(10): 4423–4424

16. Cuzon Gaëlle, Naas Thierry, Truong Havy, Villegas Maria-Virginia, Karin T. Wisell, Yehuda Carmeli, Ana. C. Gales, Shiri Navon-Venezia, John P. Quinn, and Nordmann Patrice. 2010. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produce β -Lactamase blaKPC-2 Gene1. *Emerg Infect Dis.* 16(9): 1349–1356.
17. Diene Seydina M., Merhej Vicky, Henry Mireille, El Filali Adil, Roux Véronique, Robert Catherine, Azza Saïd, Gavory Frederick, Barbe Valérie, La Scola Bernard, Raoult Didier, and Rolain Jean-Marc. 2012. The Rhizome of the Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* Genome Reveals How New “Killer Bugs” Are Created because of a Sympatric Lifestyle., doi: 10.1093
18. Dortet L., Poirel L., Al Yaqoubi F., and Nordmann P. 2012. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Sultanate of Oman. 18(5):E144-8
19. Dortet, Poirel, et Nordmann. 2013. Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénèmases. *Enterobacterie_0-New Feuillet INT 210X297-2010 Page1*
20. Doyle, Hartmann, Lee Wong. 2012. Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply?. *Anim Health Res Rev.* 13(2):157-80.
21. Grall, Andremont, et Armand-Lefèvre. 2011. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ?. *Journal des Antinfectieux.* P 16
22. Jarlier, Vincent, Nicolas, Marie-Hélène, Fournier, Geneviève, et Philippon. 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review of Infectious Diseases*, 1988, vol. 10, no 4, p. 867-878.
23. Lahlaoui, Poirel, Barguelli, Moussa, Nordmann. 2012. Carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tunisia. pp 937-939

24. Lee, Ki Kim, Dongeun , Jeong, Yum, Young, Docquier, Yunsop. 2010. Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, Pages 149–152
25. Loncaric, Igor, Stalder, Gabrielle L., Mehinagic, Kemal. 2013. Comparison of ESBL– and AmpC producing Enterobacteriaceae and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from migratory and resident population of rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria. *PloS one*, 2013, vol. 8, no 12, p. e84048
26. Mahmudur, Mufti, et Badrul. 2015. Antimicrobial resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* in different ecological niches in Bangladesh. *Infection Ecology and Epidemiology*. 5: 26712
27. Major, Plough, SN.C., A.U.S. 1945. Penicillin Resistance of *Staphylococcus Aureus* and its Clinical Implications. *American Society of Clinical Pathologists*. P 446-451
28. Matar, Dandache, Carrër, Khairallah, Nordmann, Sabra, et Araj .2010. Spread of OXA-48-mediated resistance to carbapenems in Lebanese *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* that produce extended spectrum β -lactamase. pages 271-274
29. Davis, Iverson, Baron, Vasse, Silbergeld, Lautenbach, Morris. 2012. Household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. *Lancet Infect Dis* 12: 703–16
30. Silva, Felgar, Gonc, alves, Correia, Pacheco, Araujo, Igrejas, and Patricia Poeta. 2010. Absence of extended-spectrum-b-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in migratory birds: song

31. Porreroa M. Concepción, Gregorio Mentaberreb, Sergio Sánchezc, Pedro Fernández-Llariod, Susana Gómez-Barrerao, Nora Navarro-Gonzalezb, Emmanuel Serranob, Encarna Casas-Díazb, Ignasi Marcob, José-Francisco Fernández-Garayzabala, Ana Mateosa, Dolors Vidalc, Santiago Lavínb, Lucas Domíngueza., 2013. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in different free-living wild animal species in Spain. Pages 127–130
32. Philippon A. 2006. Antibiogramme: Quoi de neuf, en réalite, depuis 10 ans?.*Revue Francophone des Laboratoires*, 379(2006), 44-48.
33. Potron A., Kalpoe J., Poirel L., & Nordmann P. 2011. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone.*Clinical Microbiology and Infection*, 17(12), E24-E26.
34. RAI S., MANCHANDA V., SINGH N. P. 2011. Zinc-dependent carbapenemases in clinical isolates of family Enterobacteriaceae. *Indian journal of medical microbiology*, vol. 29, no 3, p. 275.
35. Robin F., Aggoune-Khinache N., Delmas J., Naim, M., & Bonnet R. 2010. Novel VIM metallo- β -lactamase variant from clinical isolates of Enterobacteriaceae from Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*,54(1), 466-470
36. Stefania Stefania, Doo Ryeon Chungb, Jodi A. Lindsayc, Alex W. Friedrichd, Angela M. Kearns, Henrik Westhf, Fiona M. MacKenzieg. 2012. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. Pages 273–282
37. Van Hoek, A. H. A. M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P., and Aarts H. J. M. (2011). Erratum: Acquired antibiotic resistance genes: an overview *Front. Microbio.* 2:203.
38. www.eucast.org. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Recommendations de 2015.

39. Yousfi M., Touati A., Mairi A., Brasme L., Gharout-Sait A., Guillard T., and De Champs C. 2016. Emergence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Companion Animals in Algeria.

ANNEXE I

Tableau 1 : Tableau de la classification des β -lactamases (Bush et Jacoby, 2010)

Bush et Jacoby (2010)	Ambler	Substrats préférés	Inhibée par		Enzymes
			AC ou TZB	EDTA	
1	C	Céphalosporines	non	non	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Céphalosporines	non	non	GC1, CMY-37
2a	A	Pénicillines	oui	non	PC1
2b	A	Pénicillines, Céphalosporines à spectre large	oui	non	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Céphalosporines à spectre étendu, Monobactames	oui	non	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
2br	A	Pénicillines	non	non	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Céphalosporines à spectre étendu, Monobactames	non	non	TEM-50
2c	A	Carboxypénicillines	oui	non	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carboxypénicillines, Céfépime	oui	non	RTG-4
2d	D	Cloxacilline	variable	non	OXA-1, OXA-10
2de	D	Céphalosporines à spectre étendu	variable	non	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapénèmes	variable	non	OXA-23, OXA-48
2e	A	Céphalosporines à spectre étendu	oui	non	CepA
2f	A	Carbapénèmes	variable	non	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B(B1)	Carbapénèmes	non	oui	IMP-1, VIM-1, CcrA, NDM-1
	B(B3)	Carbapénèmes	non	oui	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B(B2)	Carbapénèmes	non	oui	CphA, Sfh-1

ANNEXE II

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 TSI

Extrait de viande de bœuf	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone tryptique	20 g
Chlorure de sodium	5 g
Citrate ferrique	0.3 g
Thiosulfate de sodium	0.3 g
Lactose	10 g
Glucose	1 g
Saccharose	10 g
Rouge de phénol	0.05 g
Agar	12 g

pH 7.4

Milieu Urée-Indole

L-tryptophane	3 g
Phosphate monopotassique	1 g
Phosphate bipotassique	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Urée	20 g
Alcool à 90°	10 ml
Rouge de phénol	0.025 g

pH 7

Milieu Clark-Lubs

Peptone tryptique de viande	5 g
Phosphate bipotassique	5 g
Glucose	6 g

pH 7

Milieu Citrate de simmons

Citrate de sodium	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Sulfate de magnésium	0.2 g
Phosphate monoammoniaque	1 g
Phosphate bipotassique	1 g
Bleu de bromothymol	0.08 g
Agar	15 g

pH 7.0-7.2

Gélose mannitol-mobilité

Peptone tryptique de viande	20 g
Mannitol	2 g
KNO ₃	1 g
Rouge de phénol à 1%	0.04 g
Agar	4 g

pH 7.6

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

ANNEXE III

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 μ l d'une solution de ZnSO₄ 10mM pour obtenir une concentration finale de ZnSO₄ à 0.1mM.
- 4- Ajuster le pH à 7 avec une solution de NaOH (1N).

ANNEXE IV

Tableau II: Lecture de la galerie API 20E

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E						
Microtube	Substrat :	Caractère recherché :	Révéléateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Beta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
┌CIT┐	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S		Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte Ajouter une goutte de réactif chlorure de fer III		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte Ajouter une goutte de réactif Kovacs	 	 
┌VP┐	Pyruvate de sodium	production d'acétoine (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte Ajouter 1 goutte de VP1 et VP2 Attendre 10 minutes		 
┌GEL┐	Gélatine	gélatinase		Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO ₂ ⁻ /N ₂	Nitrates (NO ₃ ⁻)	Nitrate réductase		Lecture indirecte Ajouter 1 goutte de NIT1 et NIT2 et zinc éventuellement		

Annexe V

Tableau A : Portage d'EBLSE chez les oiseaux sauvages

N°	Espèce	Date du prélèvement	Lieu	Portage BLSE	Antibiogramme	Résultat
176	Foulque macroule	13/02/2016	Lac Mezaïa	P	D-D test	Image de synergie
200	Mouette	28/02/2016	Oued Soummam	P	D-D test	Image de synergie
201	Mouette	28/02/2016	Oued Soummam	P	D-D test	Image de synergie
242	Goéland	20/03/2016	Décharge sidi boudrahem	P	D-D test + D-D test avec cloxacilline	Récupération des diamètres d'inhibition

Tableau B : Portage d'EPC chez les oiseaux sauvages

N°	Espèce	Date du prélèvement	Lieu	portage CARBA	Test réalisé
OS21	Mouette	13/01/2016	Marraïss Tamellahth	P	Hodge test/Carba NP test
OS24	Mouette	13/01/2016	Marraïss Tamellahth	P	Hodge test/Carba NP test
OS26	Mouette	13/01/2016	Marraïss Tamellahth	P	Hodge test/Carba NP test
OS45	Mouette	13/01/2016	Marraïss Tamellahth	P	Hodge test/Carba NP test
OS59	Goéland	17/01/2016	Oued Aguerioune	P	Hodge test/Carba NP test
OS64	Goéland	17/01/2016	Oued Aguerioune	P	Hodge test/Carba NP test
OS65	Goéland	17/01/2016	Oued Aguerioune	P	Hodge test/Carba NP test
OS96	Grèbe Castagneux	20/01/2016	Lac Ikker	P	Hodge test/Carba NP test
OS140	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P	Hodge test/Carba NP test
OS204	Mouette	28/02/2016	Marraïss Tamellahth	P	Hodge test/Carba NP test
OS230	Goéland	20/03/2016	Décharge sidi boudrahem	P	Hodge test/Carba NP test
OS271	Mouette	04/04/2016	Jijel	P	Hodge test/Carba NP test

Annexe V

Tableau C : Portage MRSA chez les Oiseaux sauvages

N°	Espèce	Date du prélèvement	Lieu	Portage SARM
20	Mouette	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
24	Mouette	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
32	Goéland	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
33	Goéland	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
34	Goéland	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
35	Goéland	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
42	Mouette	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
43	Mouette	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
46	Mouette	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
52	Mouette	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
54	Mouette	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
55	Goéland	13/01/2016	Marrais Tamellaht	P
56	Goéland	17/01/2016	Oued Aguerioune	P
57	Goéland	17/01/2016	Oued Aguerioune	P
81	Goéland	17/01/2016	Oued Aguerioune	P
138	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P
141	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P
142	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P
143	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P
145	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P

150	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P
152	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P
153	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P
154	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P
155	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P
156	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P
158	Canard col vert	25/01/2016	Tizi Ahmed (Tichy)	P
171	Foulque macroule	13/02/2016	Lac Mezaïa	P
176	Foulque macroule	13/02/2016	Lac Mezaïa	p
200	Mouette	28/02/2016	Oued Soummam	P
204	Mouette	28/02/2016	Marrais Tamellahth	P
211	Mouette	28/02/2016	Marrais Tamellahth	P
215	Goéland	06/03/2016	Oued Bakarro	P
222	Goéland	06/03/2016	Oued Bakarro	P
223	Goéland	06/03/2016	Oued Bakarro	P
224	Goéland	06/03/2016	Oued Bakarro	P
251	Mouette	04/04/2016	Jijel	P
252	Mouette	04/04/2016	Jijel	P
271	Mouette	04/04/2016	Jijel	P

Annexe VI

Tableau 1 : Lieux où ont été prélevées les souches d'EPC.

Souches d'Entérobactéries productrices de carbapénèmases		
Espèce	Souche	Lieu
Mouette	Citrobacter werkmanii	Marrais tamelahth
	E coli	Marrais tamelahth
	E coli	Oued Aguerioune
	Raoultella ornitholitica	Marrais tamelahth
	Raoultella ornitholitica	Marrais tamelahth
	Raoultella ornitholitica	El Aouana (Jijel)
	Klebsiella pneumoniae	Marrais tamelahth
Goéland	E coli	Décharge Sidi Boudrahem
	Klebsiella oxytoca	Oued Aguerioune
	Klebsiella pneumoniae	Oued Aguerioune
	Entérobacter gergoviae	Oued Aguerioune
Grèbe castagneux	Klebsiella pneumoniae	Lac Ikker (commune Tibane)
Canard Colvert	Klebsiella pneumoniae	Lac Tizi Ahmed (Commune Tichy)

Annexe VII

Figure 2 : Identification d'une *E. coli* productrice de BLSE par galerie API 20E.



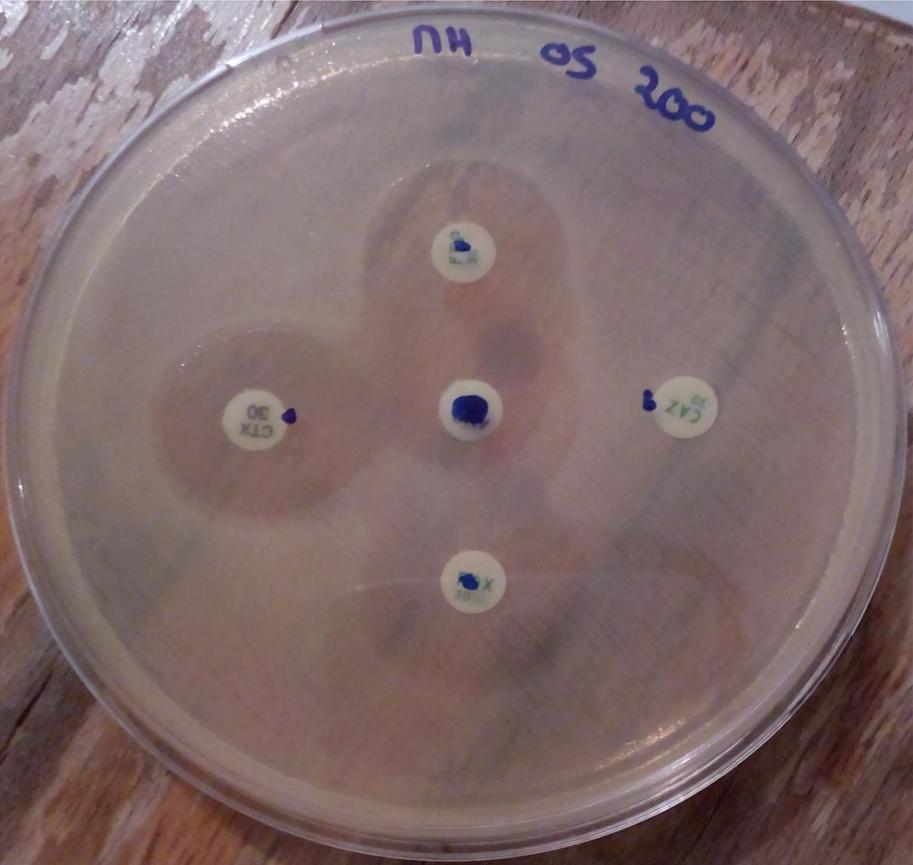
Figure 3 : Identification d'une *E. coli* productrice de BLSE par galerie API 20E.



Figure 4 : Test de sensibilité au disque de méropénème pour les souches d'EPC



Figure 5 : Image de synergie avec le D-D test



Résumé

Le but de ce travail est d'étudier la présence de bactéries (EPC, EBLSE, MRSA) résistantes aux antibiotiques cliniquement importants chez les oiseaux sauvages. Ces derniers sont considérés non seulement comme des indicateurs du niveau de résistance aux antibiotiques dans un environnement naturel mais aussi parce qu'ils peuvent agir comme un miroir reflétant l'activité humaine dans l'environnement. Un total de 265 prélèvements a été réalisé au niveau de différentes régions de la Wilaya de Bejaia majoritairement dans des zones humides. Après isolement et identification, la sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton. Les phénotypes de résistances ont été déterminés par l'utilisation de tests phénotypiques incluant le DD-test, test de Hodge, Carba NP test modifié. L'identification a été faite par galerie API20E. Au total 56 souches d'EPC (n=13), EBLSE (n=4), MRSA (n=39) ont été sélectionnées et un taux de portage moyen de 21% a été observé. Des taux de résistance aux carbapénèmes allant de 3% à 100% ont été enregistrés respectivement pour l'ertapénème et la méropénème. La caractérisation phénotypique a montré que 13 (5%) souches étaient productrices de carbapénémases probablement de type OXA-48, 4 (2,07%) étaient productrices de BLSE et 39 (14,71%) identifiées comme des MRSA.

A notre connaissance, ceci est le premier rapport de souches d'*Entérobactéries* productrices de BLSE, carbapénémases isolées d'oiseaux sauvages en Algérie.

Mots-clés : oiseaux sauvages, résistance aux β -lactamines, BLSE, OXA-48, Algérie

Abstract

The aim of this study was to investigate the presence of bacteria (EPC, ESBL, MRSA) resistant to clinically important antibiotics in wild birds. They are considered not only as indicators of antibiotic resistance level in a natural environment but also because they can act as a mirror reflecting human activity in the environment. A total of 265 samples was carried out in different regions of the wilaya of Bejaia mainly in wetlands. After isolation and identification, susceptibility of strains to antibiotics was determined by the diffusion method on Mueller Hinton agar. Resistant phenotypes were determined by using phenotypic tests including the DD-test, test Hodge, Carba NP modified test. The identification was made by API20E gallery. In total 56 EPC strains (n = 13), ESBL (n = 4), MRSA (n = 39) were selected and an average carrier rate of 21% was observed. Rates of resistance to carbapenems from 3% to 100% were recorded respectively for ertapenem and meropenem. Phenotypic characterization showed that 13 (5%) strains were probably producing carbapenemases type OXA-48, 4 (2.07%) were ESBL-producing and 39 (14.71%) identified as MRSA.

To our knowledge, this is the first report of Enterobacteriaceae producing ESBL strains, carbapenemases isolated from wild birds in Algeria.

Keywords: wild birds, resistance to β -lactams, ESBL OXA-48, Algeria