1. Objectifs et cadre d'étude

Notre travail a été réalisé durant la période qui s'étend de Janvier jusqu'au moins d'avril 2019 au niveau de laboratoire de microbiologie, département de biologie appliquée à l'université de Tébessa. Il porte sur des viandes hachées commercialisés dans la ville de Tébessa, dans l'objectif d'évaluer les résistances aux antibiotiques des souches d'enterobacteries isolées à partir de ces viandes.

2. Matériels et méthodes

2.1. Prélèvement

Durant la période d'étude, 15 échantillons ont été prélevés à partir de différentes boucheries, selon le tableau ci-dessous. Un échantillon de 100g a été aseptiquement prélevé dans un sac plastique stérile et transporté au laboratoire dans un délai ne dépassant pas les 2 heures.

Tableau 06: Informations relatives aux échantillons prélevés.

N° d'échantillon	Date de prélèvement	Site de prélèvement
01	10 02 2019	Cité Beb Zayatine
02	17 02 2019	Rue de Constantine
03	24 02 2019	Le grand Marché
04		
05	25 02 2019	Rue de Constantine
06	03 03 2019	Le grand Marché
07	06 03 2019	Draa el imam
08		Cité El wiam
09	07 03 2019	Larmoute
10	19 03 2019	Cité Houari Boumediene
11		Porte de Caracalla
12		Le grand Marché
13		Cité Houari Boumediene
14		Porte de Caracalla
15		Le grand Marché

2.2. Pré- enrichissement

Au laboratoire, près du bec Bunsen :

- Peser aseptiquement 25 g de viande dans une boite de Pétri, puis les transférer dans un mortier stérile.
- Broyer la viande, en ajoutant progressivement 225ml de bouillon tryptone-sel, jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.
- Laisser le broyat reposer pendant 15 à 45 minutes à température ambiante.
- Transférer le broyat dans un flacon stérile.
- Incuber pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

2.3. Isolement des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3eme génération (C3G)

Après incubation, préparer une dilution dans 9ml de tryptone- sel. Prélever 0,1 ml de la suspension et de la dilution ainsi préparée à l'aide d'une micropipette et l'ensemencer à la surface de deux boites de gélose Mac Conkey (MC) additionnée de 2 mg/ litre de cefotaxime (CTX) **[49].** Étaler à l'aide d'un râteau et incuber pendant 24 à 48 h à 37 °C.

2.4. Recherche des *Salmonella*

2.4.1. Enrichissement

- 0,5 ml de bouillon du pré-enrichissement est inoculé dans 5 ml du bouillon SFB (Selenite F Broth).
- Incuber le bouillon SFB pendant 24 à 48 à 37 °C.

2.4.2. Isolement

- À l'aide d'une pipette Pasteur, prélever à partir du bouillon SFB et faire des striesà la surface de deux boites de l'un des milieux DCLS (desoxycholate- lactose-sucrose), SS (*Salmonella-Shigella*) ou bismuth-sulfite.
- Incuber pendant 24 à 48 h à 37 °C, jusqu'à l'apparition des colonies.

2.5. Identification des isolats par un examen macroscopique et microscopique

Après incubation, repérer les colonies suspectes sur les différents milieux :

- **MC (addi à CTX)** : les entérobactéries donnent sur ce milieu des colonies rouges/ roses (lactose +) ou des colonies jaunes/ incolores (lactose -), de forme rond (régulière ou irrégulière) généralement de taille grand, parfois crémeuse et laiteuse
- **DCLS**: les colonies jaunes ou incolores (lactose -) avec ou sans centre noir sont suspectes d'être *Salmonella.*

- **SS**: les colonies incolores (lactose -) avec ou sans centre noir sont suspectes d'être *Salmonella* **[50].**
- **Bismuth :** les colonies vertes transparentes avec ou sans centre noir sont suspectes d'être *Salmonella* **[51].**

Après l'examen macroscopique on fait la coloration de Gram **(voir annexe B),** pour toute colonie suspecte. On retient seulement des colonies ayant données des bacilles à Gram négatif (BGN).

2.6. Conservation des isolats

Après purification, la conservation se fait par repiquage à partir des isolats purs sur gélose nutritive (GN) inclinée, en faisant des stries serrées. Après incubation pendant 24 h à 37 °C, conserver les tubes au réfrigérateur ou à température ambiante.

2.7. Identification biochimique

L'identification biochimique des isolats de BGN ainsi conservés est réalisée par la galerie API 20 E.

a) Principe et description de la galerie API 20 E

La galerie API 20 E (Analytical profile index), est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries à Gram négatif. Elle comporte 20 micro-tubes**(Figure 04),** contenant des substrats sous forme déshydratée, ces micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.



Figure 04 : Galerie API 20E.

b) Mode opératoire

- **Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum**

- Préparer une suspension bactérienne dense dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 h, faite sur GN.

- **Ensemencement de la galerie**

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile pointe, appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air.
- Pour les caractères soulignés: ADH, LDC, ODC, H_2S, URE, ensemencer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.
- Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemencer le tubule et la cupule par la suspension.
- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemencer uniquement le tubule par la suspension.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.

c) **Lecture**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture **(Voir annexe D).**

- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou –) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs:

Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

Test IND : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

Test Glu : ajouter une goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2-5 minutes, une coloration rouge indique une réaction positive (NO_2).Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote. Dans ce cas, ajouter 2-3 mg de poudre de zinc dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté jaune indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats. Si la cupule devient orange-rouge, la réaction est négative, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zn.

- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois, réincuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs **[52].**

d) Interprétation des résultats

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

2.8. Test de l'antibiogramme

Il a été réalisé selon la méthode de diffusion en milieu gélosé, méthode des disques (Antibiogramme standard).

a) Principe

L'antibiogramme regroupe différentes techniques permettant de déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Son principe repose sur la mise en contact in vitro de la bactérie à tester avec l'antibiotique et sur l'observation des conséquences sur la croissance et la survie bactérienne **[53].**

b) Choix des antibiotiques

Le choix des antibiotiques utilisés dans cette étude a été fait selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie **[49].** La liste des antibiotiques choisis est présentée dans le **tableau 07**

Tableau 07 : Liste des antibiotiques testés sur les entérobactéries

Famille		Antibiotique	Sigle	Charge Du disque	Diamètres critiques	
					R (d)	I S (D)
β-Lactamines	Aminopénicillines	Amoxicilline	AMX	25 µg	**< 19**	**≥19**
	Carboxypénicillines	Ticarcilline	TC	75 µg	**<20**	**≥23**
	Uréidopénicillines	Pipéracilline	PRL	100 µg	**<17**	**≥20**
	Carbapénèmes	Imipénéme	IPM	10 µg	**<16**	**≥22**
	Clavams	Ticarcilline+Acideclavulanique	TTC	75-10 µg	**<20**	**≥23**
	Monobactames	Aztréonam	ATM	30 µg	**<21**	**≥26**
	C1G	Céfalexine	CL	30 µg	**<14≥14**	
	C2G	Céfoxitine	CX	30 µg	**<15**	**≥19**
	C3G	Céfotaxime	CTX	30 µg	**<17**	**≥20**
		Ceftazidime	CAZ	30 µg	**<19**	**≥22**
Aminoglycosides		Amikacine	AK	30 µg	**<13**	**≥16**
		Gentamicine	GEN	10 µg	**<14**	**≥17**
Fluoroquinolones		Ofloxacine	OF	5 µg	**<22**	**≥24**
		Ciprofloxacine	CIP	5 µg	**<24**	**≥26**
Triméthoprime-sulfamides		Co-Trimoxazole	COT	1,25-23,75 µg	**<11**	**≥14**

C1G : céphalosporines première génération, **C2G :** céphalosporines deuxième génération, **C3G** : céphalosporines troisième génération.

c) Technique

- **Préparation de la gélose :**

La gélose utilisée est la gélose Mueller-Hinton (MH). Son épaisseur doit être de 4 mm ± 0,5 mm (approximativement 25 ml pour une boîte de 90 mm de diamètre).

- **Préparation de l'inoculum**

- Préparer une suspension bactérienne (à partir d'une culture jeune de 18 heures), prélever au moins 03 colonies et émulsionner dans 05 ml d'eau physiologique stérile (L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15 min. qui suivent sa préparation).
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm soit 0,5 la valeur de Mac Farland. Cela correspond à une culture pure à peine confluente de 10^6 à 10^8UFC/ml.

➢ **Ensemencement de la gélose**

- Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.
- Écouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions.
- Déposer les disques.

➢ **Dépôt des disques imprégnés d'antibiotiques**

Déposer les disques fermement, à l'aide d'une pince préalablement flambée, à la surface de la gélose inoculée et séchée. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boite, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres. Les disques d'antibiotiques sont répartis sur trois boites de Pétri selon la **figure 05.** Le contact avec la surface doit être étroit. Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide.

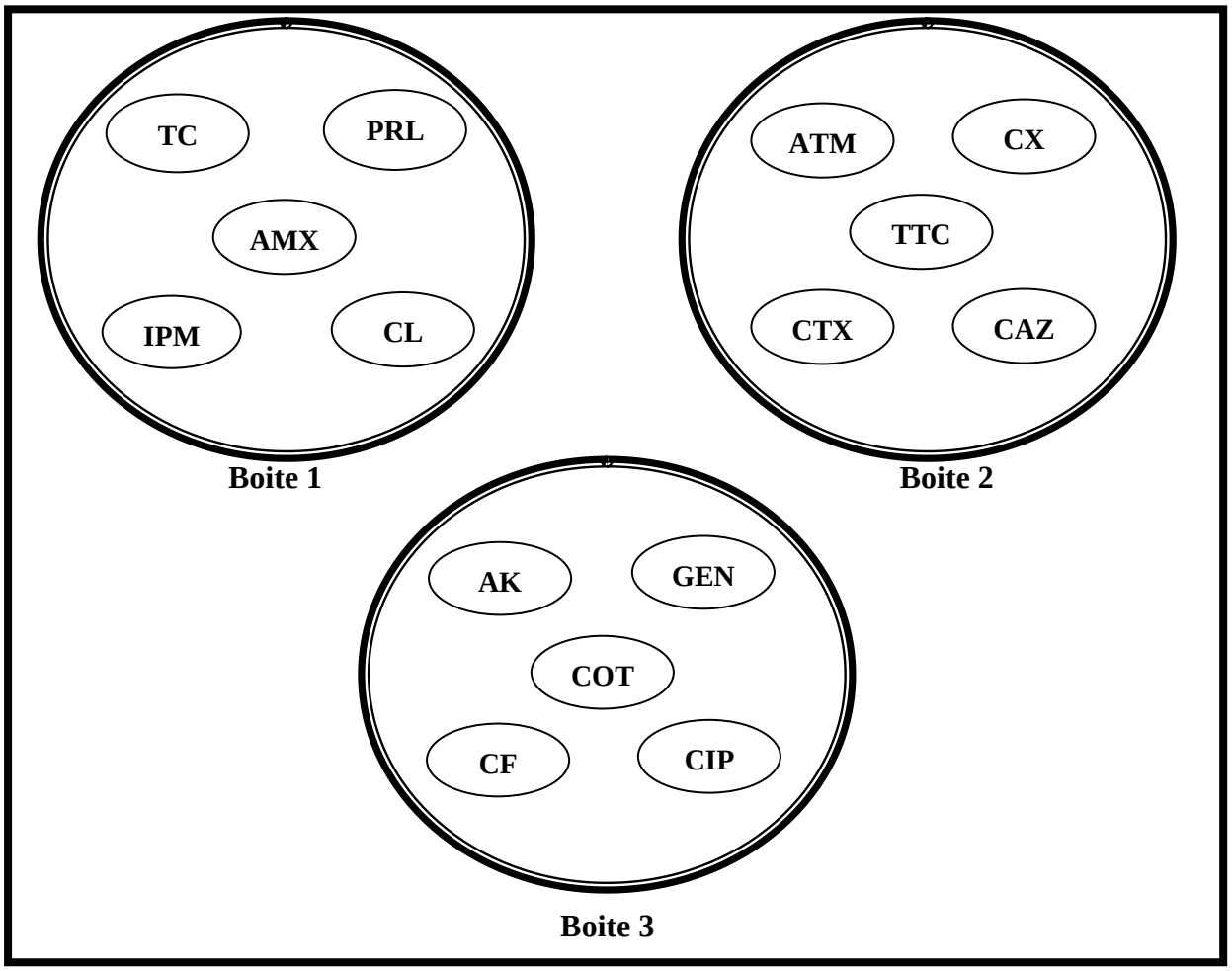


Figure 05 : Schéma explicatif de la disposition des disques d'antibiotiques.

- **Incubation des boîtes de Pétri**

Les incuber idéalement dans les 15 min. qui suivent le dépôt des disques, sans dépasser 30 min. Si elles sont abandonnées à température ambiante après dépôt des disques, la pré-diffusion des antibiotiques engendrera des zones d'inhibition faussement agrandies. Incuber les boites à 37°C pendant 16 à 24 h (couvercle en haut).

- **Mesure des zones d'inhibition et catégorisation clinique**

La bordure de la zone d'inhibition doit être lue à l'œil nu et au niveau de la complète inhibition de la culture ; la boîte étant placée à 30 cm de l'œil.

Mesurer les diamètres des zones d'inhibition au millimètre le plus proche avec une règle ou un pied à coulisse.

Interpréter les diamètres des zones d'inhibition par référence aux tableaux où figurent les diamètres critiques **(Tableau 07):** la comparaison des diamètres mesurés autour des disques déposés et ceux recommandés permettra de détecter le phénotype sensible, intermédiaire, et résistant :

- Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≥ D : la souche est dite sensible (S).
- Si le diamètre de la zone d'inhibition est < d : la souche est dite résistante (R).
- Si d ≤ diamètre de la zone d'inhibition < D : la souche est dite intermédiaire (I).