

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة - الحراش - الجزائر

École Nationale Supérieure Vétérinaire (ENSV) - El Harrach - Alger

MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE MAGISTERE EN SCIENCES VETERINAIRES

OPTION : MICROBIOLOGIE MEDICALE VETERINAIRE

La Colibacillose Aviaire :
Sérotypage et antibiorésistance des souches
Escherichia coli isolées de poulets de chair,
à l'abattoir de Bordj Menaiel

Présenté par : Dr GHALMI ASMA

Le jury :

Dr Khelef D., Maitre de Conférences A, ENSV Alger Président

Dr Ait Oudhia Kh., Maitre de Conférences A, ENSV Alger Examineur

Dr Hafsi F. Maitre Assistante A, ENSV Alger Examineur

Dr Menouiri N. Maitre de Conférences A, USD Blida Examineur

Dr Boukhors KT, Maitre de Conférences A, ENSV Alger Promoteur

Année Universitaire : 2011- 2012

Je dédie ce travail à feu mon grand-père qui nous a toujours poussé à aller plus loin.

Remerciements

Je remercie Dieu le tout puissant qui m'a donné la force pour achever ce travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de thèse Dr Boukhors pour m'avoir fait confiance et confié ce travail, mais aussi pour les corrections rigoureuses apportées au document.

Mes hommages respectueux vont au Dr Djamel Khelef président de mon jury, je le remercie aussi pour avoir suivi l'évolution de mon travail et pour tous ses conseils pertinents.

Je tiens à remercier le Dr Hafsi et le Dr Ait oudhi pour m'avoir fait l'honneur de participer au Jury de soutenance. Je les salue aussi pour l'intérêt et le soutien chaleureux dont elles ont toujours fait preuve à mon égard.

Merci au Dr Menouiri de l'Institut des Sciences Vétérinaires de l'Université de Blida pour avoir bien voulu examiné ce travail.

Mes sincères et chaleureux remerciements vont au Dr Azzag Naouelle et au Dr Bernard China pour leur grande qualité humaine et scientifique mais aussi pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour m'avoir fait bénéficier de leurs conseils et de leur avis éclairé.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur L Guezlane ancien Directeur de l'ENSV d'avoir développé la recherche scientifique à l'ENSV en équipant les laboratoires de l'École, ce qui nous a permis de réaliser nos travaux de recherche dans les meilleures conditions.

Je ne veux pas oublier le Dr Derdour enseignante d'anatomopathologie à l'ENSV pour sa gentillesse, son aide et ses encouragements.

Je remercie tout particulièrement ma tante le Dr Ghalmi Farida pour sa disponibilité, sans ses encouragements, ces conseils et son assistance, ce travail n'aurait pu aboutir. Je la remercie vivement pour avoir réalisé les analyses statistiques de ce travail.

Remerciements

Mes plus sincères remerciements vont à Didine pour son soutien, ces conseils et ces encouragements pendant les moments les plus difficiles de ma formation, reçois à travers ce travail l'expression de ma profonde reconnaissance .

Je tiens aussi à exprimer mes vifs remerciements au Docteur Messai pour son soutien, ses conseils et le grand intérêt porté à mon travail.

Je remercie profondément le Dr Guechtouli vétérinaire de l'abattoir de Bordj Menaiel pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide lors de la collecte des prélèvements..

Je remercie aussi Mme Sahraoui et Kenza du laboratoire de microbiologie de l'ENSV pour leur aide précieuse.

Mes plus sincères remerciements vont à Fateh Termoul, et ma cousine ANIA pour l'aide logistique apportée à l'amélioration de ce manuscrit.

Mes remerciements au personnel de la bibliothèque de l'École Nationale Supérieure Vétérinaire pour leur aide et surtout gentillesse et sympathie.

Avant de finir, je souhaiterais rendre hommage aux membres de ma famille pour leur soutien incommensurable tout au long de mes études et sans lesquels je n'en serai pas là aujourd'hui.

Enfin, merci à tous ceux qui m'ont soutenue de près comme de loin, tout au long de cette année, qui se reconnaîtront.

-

Avian colibacillosis represents one of the most important causes of economic losses in the poultry sector and is one of the most frequent cause of carcass rejection, in the slaughter house. The objective of our study is to evaluate the prevalence of APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) strains in the chickens and to evaluate the antimicrobial susceptibility to avian or human antibiotics

150 *E coli* strains have isolated from 200 chickens suspected with colibacillosis, in the abattoirs of BordjMenaiel. Serotyping has shown that (53.3%) strains belonged to one of the three pathogenic serotypes O1, O2 or O78

The antimicrobial susceptibility tests showed that (95.3%) strains are resistant to the cefalotin, (92%) to tetracycline, (89%) to nalidixic acid, (86%) to amoxicilline, (82,6%) to trimethoprine+sulfamethoxazole, (79.3%) to ampicilin, (55.3%) to amoxicilline-clavulanic acid, (41,3%) to chloramphenicol, (24,66%) to nitrofurantoin, (24%) to norfloxacin, (22.6%) to colistine and (8.6%) to cefotaxime. The 13 strains that are resistant to cefotaxime (3rd generation cephalosporin) were tested for the producing of expanded spectrum beta lactamase (ESBL). The results showed that 04 strains would produce ESBL. In addition, the results revealed that all strains are resistant to at least 3 antibiotics. This antibiotic resistance may be explained by the anarchic use of antibiotics, on the ground, which led to the selection of resistant bacterial strains

Key words: colibacillosis, antibioresistance, *E. coli*, broiler chickens

La colibacillose aviaire est responsable de grandes pertes économiques, dans le secteur avicole, et constitue l'un des motifs de saisie les plus fréquents à l'abattoir. L'objectif de notre étude est d'évaluer d'une part la prévalence des souches APEC (*AvianPathogenic E. coli*) chez le poulet de chair et d'autre part d'étudier les profils de résistance à des antibiotiques à usage aviaire, humain ou suspendus de l'homologation

150 souches *E. coli* ont été isolées de 200 poulets suspectés de colibacillose, à l'abattoir de Bordj Menaiel. Les sérotypage, à l'aide de sérums monospécifiques, a révélé que (53,3 %) des isolats appartiennent aux sérogroupes pathogènes classiques des APEC : O1, O2 et O78.

L'antibiogramme, réalisé par la méthode de diffusion sur gélose, a révélé différents taux de résistance qui sont par ordre décroissant : céphalotine (95%), tétracycline (92%), acide nalidixique (89%), amoxicilline (86%), triméthoprime+sulfaméthoxazole (82,6%), ampicilline (79,3%), amoxicilline+acide clavulanique (55,3%), chloramphénicol (41,3%), nitrofurane (24,66%), norfloxacine (24%), colistine (22,6%) et céfotaxime (8,6%). Sur les 13 souches résistantes à la céfotaxime (céphalosporine de 3^{ème} génération), 4 souches (2,6%) seraient productrices de bêta lactamase à spectre élargi (BLSE). Par ailleurs, l'analyse de la multirésistance a révélé que toutes les souches sont résistantes à au moins 3 antibiotiques. Cette antibiorésistance pourrait être expliquée par l'utilisation abusive et anarchique d'antibiotiques, sur le terrain, qui a conduit à la sélection des souches bactériennes résistantes

Mots clés : colibacillose, antibiorésistance, *E. coli*, poulet de chair

كولبا سيلوز الدواجن مسؤولة عن خسائر فلدحه في مجال تربية الدواجن تعد من أحد أسباب الاستيلاء على الدواجن في المذابح.

هدفنا من هذه الدراسة هو تقييم انتشار سلالة الـ *E.coli* الممرضة للدجاج اللحم و من جهة أخرى دراسة حساسية الـ *E.Coli* المعزولة لعدة مضادات حيوية مستعملة في تربية الدواجن.

ثم عزل 150 *E.coli* 53.3% منهم ينتمون إلى الثلاثة أفواج تحدث الأمراض للدواجن و هي O_{78} , O_2 , O_1

تم إنجاز اختبار الحساسية و نتائجنا تظهر النسب التالية من المقاومة ضد المضادات الحيوية بالترتيب التنازلي التالي:
95% للسيفالوتين، 92% تيتراسيكلين، 99% تريمتوبرين + سولقا متوكزازول، 79.39% أمسلين، 55.3% +
أموكسيسيلين + حمض كلافولانيك 41.3% كلورومفينيكول، 24.66% نيتروفوران، 24% نورفلوكزاسين، 22.6%
كوليستين، 8.6% سيفوتكسين.

في 13 سلالة من *E.coli* المقاومة للسيفوتكسين 4 سلالات (2.6%) قد تكون منتجة للبيتالكتماز (Béta lactamases).

ارتفاع المقاومة الفردية و الجماعية للمضادات الحيوية يندر بالاستعمال العقلاني لهذه المواد في مجال تربية الدواجن.

الكلمات المفتاح:

كولباسيلوز « Colibacillose »، إيشريشيا كولي « *E.coli* »، المقاومة للمضادات الحيوية، التصنيف المصلي « Stéréotupage » الدواجن.

AARN : *Algerian Antimicrobial Resistance Network*
RESAPATH : (Réseau d'Épidémiosurveillance de l'Antibiorésistance des bactéries pathogènes animales)
L'OIE : (Office Internationale des Épizooties)
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
E. coli : *Escherichia coli*
Gram- : Gram négative
C° : Degree Celsius
T° : Température
H : Heure
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
CNR E : Centre National de Référence des *Escherichia Coli*
ECEP : *E. coli* entéropathogènes
ECET : *E. coli* entérotoxinogènes
ECEI : *E. coli* entéroinvasifs
ECEH : *E. coli* entérohémorragiques
ECEAg : *E. coli* entéroagréatifs
ECAD : *E. coli* à adhésion diffuse
STEC : Shiga toxine *E. coli*
APEC : *Avian Pathogenic E.coli*
ExPEC : *E. coli* pathogènes Extra intestinale
SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique
VT ; Vérotoxines
GEI : Gastro-entérite Infantile
Stx : Shiga toxine
AE : Lésions type Attachement-Effacement
Spp : sous espèce
ATB : Antibiotique
PLP : Protéine Liaison Pénicilline
LPS : Lipopolysaccharide
EMB : Eosine Bleu de Méthylène
TSI : Tri Sugar Iron.
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute.
H₂S : Hydrogène sulfuré.
NCCLS : National Committee of Clinical Laboratory Standards
C3G : Céphalosporine de troisième génération
C1G : Céphalosporine de première génération
S : Sensible
I : Intermédiaire
R : Résistant
Api 20 E : Api 20 Entérobactéries
X 1.000 : Grossissement fois mille
Me Farland : Mac Farland
BLSE : Beta-lactamase à spectre étendu

Tableau 1 : Caractères biochimiques d' <i>E. coli</i>	4
Tableau 2 : liste des antibiotiques utilisés à titre curatif	21
Tableau 3 : Provenance des poulets prélevés, à l'abattoir de Bordj Menaiel	29
Tableau 4 : Tableau de lecture de la galerie Api20El	34
Tableau 5 : Antibiotiques testés et leurs charges	36
Tableau 6 : Prévalence des <i>E. coli</i> chez les poulets prélevés	40
Tableau 7 : Sérotypage des souches <i>E. coli</i>	43
Tableau 8 : Pourcentage de souches résistantes par antibiotique	44
Tableau 9 : Étude de l'association entre les résistances	46
Tableau 10 : Sérotype et antibiorésistance	47
Tableau11 : Détection des BLSE	49

Figure 1 : Structure microscopique d' <i>Escherichia Coli</i>	3
Figure 2 : Les différents types d'antigènes d' <i>E coli</i>	5
Figure 3 : Mécanismes d'interaction des différents pathovars d' <i>E. coli</i>	8
Figure 4 : Résistance par altération des porines	25
Figure 5 : Excrétion de l'antibiotique par efflux	26
Figure 6 : Résistance par production de β -lactamase	27
Figure 7 : mécanismes de résistance aux antibiotiques	28
Figure 8 : Inoculation de la galerie API 20E	33
Figure 9 : Sérum mono spécifique O1, O2 et O78.....	35
Figure 10 : Disposition des disques d'antibiotique par boîte de Pétri	37
Figure 11 : Colonies d' <i>E .coli</i> sur gélose Mac conkey	41
Figure 12 : Colonies d' <i>E .coli</i> sur gélose EMB	41
Figure 13 : Morphologie des bactéries <i>E.coli</i> à Gram ⁻ sous microscope (G 1000)	41
Figure 14 : Tubes du milieu TS1	42
Figure 15 : Galerie API 20 E après inoculation	42
Figure 16 : Galerie API 20 E après incubation 18 h à 37°C et ajout des réactifs	42
Figure 17 : Sensibilité global des souches <i>E.coli</i> aux antibiotiques testés.....	44
Figure 18 : Fréquence des multirésistances des <i>E.coli</i>	45
Figure 19 : Analyse des correspondances multiples entre le sérotype et la résistance aux différentes betas lactamines.....	48
Figure 20 : Résultats de l'antibiogramme	49
Figure 21 : Résultat du test double disque.....	49

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS	
1. Historique.....	3
2. Morphologie et culture.....	3
3. Caractères biochimiques	4
4. Structure antigénique	4
5. Les E coli pathogènes... ..	6
5.1. Chez l’homme... ..	6
5.2. Chez la volaille	8
CHAPITRE 2 : LA COLIBACILLOSE	
1. Les facteurs de virulence.....	9
1.1. Les adhésines	9
1.2. Le système aérobactine	10
1.3. La résistance au pouvoir bactéricide du sérum	10
1.4. Toxines.....	10
1.5. Hémagglutination.....	11
2. L’expression clinique	11
2.1. La colibacillose respiratoire et la colisepticémie.....	11
2.2. Mortalité embryonnaire et du jeune poussin	13
2.3. Le syndrome de la grosse tete	13
2.4. Ovarites et salpingites chronique chez l’adulte	14
2.5. les formes plus rares	14
3. Données épidémiologiques	15
3.1. Habitat et source de contamination	15

3.2. Importance sanitaire et économique	16
3.3. Les sérotypes	17
4. Diagnostic	17
4.1. Diagnostic du laboratoire	17
4.2. Diagnostic différentiel	18
5. Traitement et prévention	19

CHAPITRE 3 : LES ANTIBIOTIQUES ET L'ANTIBIORESISTANCE

1. Définition	20
2. Classification	20
3. Les antibiotiques en médecine vétérinaire	20
3.1. Utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire	21
A. Utilisation à titre thérapeutique curatif	21
B. Utilisation en métaphylaxie	21
C. Utilisation en antibio-prévention	22
D. Utilisation en tant qu'additifs dans l'alimentation animale	22
4. Impact de l'antibiothérapie vétérinaire sur la santé humaine	22
4.1. Résidus de traitement et flore intestinale humaine	22
4.2. Diffusion des bactéries résistantes entre l'animale et l'homme	23
5. L'antibiorésistance	23
5.1. Définition	23
5.2. Mécanismes de résistance	24
5.2.1. Mécanismes génétiques	24
5.2.2. Mécanismes biochimiques	24

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

1. Prélèvement et stratégie d'échantillonnage	29
1.1. Lieu et période de prélèvement	29

1.2. Préparation des prélèvement	30
2. Analyse bactériologique	30
2.1. Isolement et identification des <i>E .coli</i>	30
2.1.1. Isolement des souches	30
2.1.2. identification des souches	30
2.1.2.1. Coloration de Gram.....	30
2.1.2.2. Etude biochimique.....	31
A. Testes d'orientation rapide.....	31
B. Galerie biochimique miniaturisée	32
2.2. conservation des soches.....	35
3. Etude sérologique	35
4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	36
5. recherch de la β -Lactamase a spectre étendu ches les <i>E .coli</i>	38
5.1. T este de synergie	38
5.2. Test de confirmation de double disque.....	39

RESULTATS

1. Isolement et identification des souches <i>E .coli</i>	40
2. Sérotypage	43
3. Résistance aux antibiotique	43
3.1. La résistance individuelle.....	44
3.2. La multirésistance.....	45
3.3. Association entre les sérotypes et l'antibiorésistance	47
3.4. La recherche des BLSE	48

DISCUSSION	50
-------------------------	----

CONCLUSION	57
-------------------------	----

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

L'aviculture constitue un secteur très important, en Algérie. Ses produits assurent plus de 50% de la ration alimentaire moyenne en produits d'origine animale. Cette branche a enregistré le développement le plus remarquable, au cours des quinze dernières années, grâce aux importants investissements consentis par le secteur privé et public, et cela suite à l'engouement des consommateurs pour les produits d'origine avicole. Les volailles ont quitté la basse-cour pour une production rationalisée, industrialisée, dont la filière s'est structurée. Cependant, alors que l'industrie en aviculture passe généralement par une bonne maîtrise des facteurs d'ambiance, les importantes densités d'animaux, en élevage, augmentent considérablement le risque d'apparition de pathologies d'origine diverse comme la colibacillose.

La colibacillose aviaire ou infection à *Escherichia Coli* (*E. coli*) représente, à l'heure actuelle, l'une des plus importantes cause de pertes économiques, dans le secteur avicole, et constitue l'un des motifs de saisie les plus fréquents, à l'abattoir. Cette infection, dont la voie d'entrée principale du germe est le tractus respiratoire, engendre des lésions et des manifestations qui peuvent être variables, suivant l'âge de l'animal, et affecte essentiellement les élevages de poulet de chair et de la dinde. Les *E. coli* responsables sont les APEC: *Avian Pathogenic E. coli*. Les sérotypes les plus fréquents et considérés comme pathogènes sont O1K1, O2K1 et O78K80. Etant donné le peu de connaissances et l'énorme diversité des souches APEC, en matière de facteurs de virulence, aucun vaccin n'est disponible pour lutter efficacement contre la colibacillose. L'antibiothérapie qui demeure encore le seul moyen de lutte contre cette maladie conduit inéluctablement au développement de la résistance aux antibiotiques (Stordeur et Mainil, 2002., Robineau et Moalic, 2010).

Dans le monde, l'antibiorésistance représente actuellement un problème majeur aussi bien en santé animale qu'en santé humaine car les possibilités de traitement en cas d'infections sont réduites. L'évolution de ce phénotype chez les bactéries animales fait l'objet de toutes les attentions: soit parce que ces bactéries peuvent être directement transférées à l'homme, par contact ou via la chaîne alimentaire, soit parce que les mécanismes de résistance de ces bactéries peuvent être transférés à des bactéries humaines. De nombreux gènes de résistance sont portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides qui permettent le transfert du mécanisme de résistance d'une souche bactérienne à une autre.

Dans ce cadre, différents groupes de travail comme l'OIE (organisation internationale des épizooties) ou l'OMS (organisation mondiale de la santé) ont pour objectif la détection

des phénotypes de résistance aux antibiotiques afin de limiter efficacement leur diffusion (chaîne alimentaire, l'environnement) et de préserver l'action thérapeutique de ces molécules chez l'homme et l'animal (Brisabois, 2001). En France, c'est le RESAPATH (réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales) qui est chargé de suivre l'évolution de la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes animales. En Algérie, en 1999, le réseau national de la surveillance de la résistance aux antimicrobiens, à usage humain et vétérinaire, a été créé. Ce réseau qui regroupe les laboratoires algériens est officiellement répertorié, sur internet, par l'OMS : *Algerian Antimicrobial Resistance Network* (AARN).

En Algérie, la colibacillose aviaire est responsable de grandes pertes économiques dans les élevages avicoles se traduisant par la baisse de performance, perte de poids et mortalités. A cela viennent s'ajouter les frais en antibiothérapie qu'engendrent les diverses manifestations de cette maladie. Quelques études menées à l'Est, au Centre et à l'Ouest du pays sur l'antibiorésistance des souches *E. coli*, isolées de poulets atteints de colibacillose, ont indiqué des taux élevés de résistance vis-à-vis d'antibiotiques utilisés, en élevage aviaire (Hammoudi et Aggad, 2008 ., Messai et al, 2011., Aggad et al, 2010). Vu le manque de données épidémiologiques permettant une étude de la résistance microbienne à plusieurs antibiotiques, le choix de l'antibiotique est tout à fait aléatoire. De plus, l'utilisation anarchique des antibiotiques par nos éleveurs, sans avis vétérinaire, est une pratique de plus en plus courante, en Algérie.

L'objectif de notre étude préliminaire a porté d'une part sur la détermination de la prévalence des souches APEC chez des poulets de chairs suspectés de colibacillose (isolement et sérotypage des *E. coli*) et d'autre part sur l'étude des profils de résistance à des antibiotiques testés par le réseau AARN pour l'espèce aviaire. Les prélèvements ont été réalisés sur des poulets issus de l'abattoir de Bordj Menaiel, l'une des principales zones de production de volailles, en Algérie.

E. coli fait partie de la microflore bactérienne normale du tractus digestif de l'homme ainsi que de celle de la plupart des animaux. *E. coli* colonise de façon asymptomatique le tractus digestif des nouveau-nés, dans les premières heures qui suivent la naissance, et constitue dès lors l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin (Grimont, 1987).

1. Historique

Le genre *Escherichia* a été dénommé d'après le médecin allemand Theodor Escherich (1857-1911) qui, en 1885, publia ses travaux basés sur l'observation sous microscopie d'un court bâtonnet, à Gram négatif, aux extrémités arrondies, présent dans les matières fécales et l'intestin d'enfants (Escherich, 1885).

C'est en 1919, que Castellani et Chalmers lui donnent son nom définitif en hommage à Escherich. *Escherichia* est ensuite devenu le genre-type de la famille des *Enterobacteriaceae* et *E. coli* l'espèce type de ce genre.

2. Morphologie et culture

E. coli est un bacille Gram négatif, coloré, non sporulé, appartenant à la famille des entérobactéries. La taille (2-3 x 0.6 μm) et la forme peuvent varier et de nombreuses souches possédant des flagelles péritriches sont mobiles.

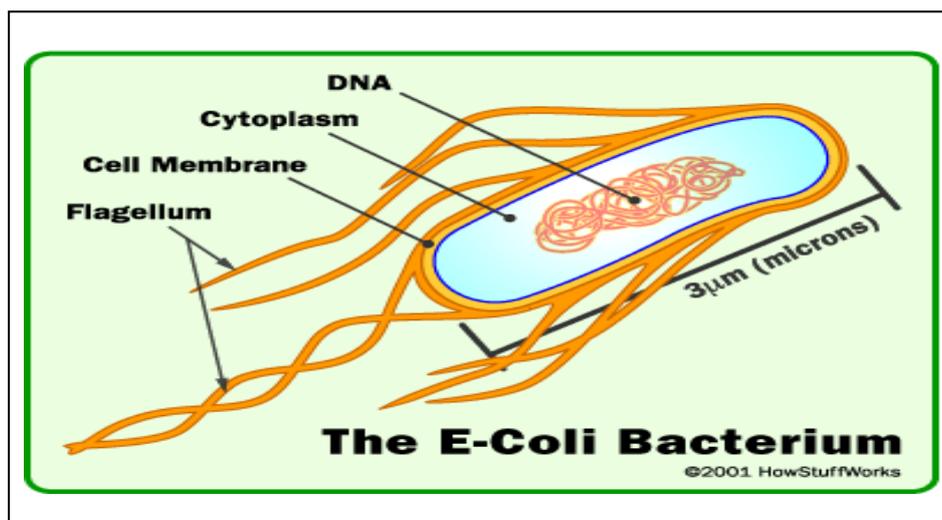


Figure 1 : Structure microscopique d'*Escherichia Coli* (WIKIPEDIA)

E. coli pousse sur milieu ordinaire, à des températures comprises entre 18 et 44° C. Après une incubation de 24 heures sur gélose agar, à 37°C, les colonies sont convexes, lisses et incolores. Elles ont, en général, un diamètre compris entre 1 et 3 mm avec une structure granulaire et une marge intacte (Gross, 1991).

3. Caractères biochimiques

Au sein de la famille des enterobacteriaceae, *E. coli* est identifiée en pratique courante par les caractères suivants : indole+, uréase⁻, H₂S⁻TDA⁻,VP⁻ et LCD⁺. Elle possède une catalase mais elle est dépourvue d'oxydase. Les principaux caractères biochimiques permettant l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille sont regroupés, dans le tableau 1.

Tableau^o1 : Caractères biochimiques d' *E. coli* (Avril. J. L, Monteil. H, Dobernat.H, Denis. F. *Bactériologie Clinique. Édition ELLIPSE*)

Test	ADH	ONPG	CC	GEL	H2S	IND	MAL	PDA	LCD
Résultats	(+)/-	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	-	(+)/-
Test	ODC	TDA	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC	
Résultats	(+)	(+)	(+)	(+)/-	-	(+)	(+)	-	

+ : Caractère positif - : Caractère négatif +/- : caractère inconstant

ADH : Arginine déshydrogénase. **β Gal** : Bêta galacto-D pyranoside. **CC** : Citrate de Christensen

CS : citrate de Simmons. **Gel** : Gélatinase. **H₂S** : Hydrogène sulfuré. **IND** : Indole. **MAL** : Malonate. **PDA** : Phényl alanine désaminase. **LDC** : Lysine décarboxylase. **ODC** : Ornithine décarboxylase. **URE** : Uréase. **NIT** : Nitrate réductase. **VP** : Réaction de VogesProskauer. **TDA** : Tryptophane désaminase. **GLU** : Glucose. **LAC** : Lactose

4. Structures antigéniques

Chaque souche d'*E. coli* est définie par un sérotype lui-même déterminé par l'association de différents antigènes. Ce sérotype est déterminant dans la pathogénicité de la bactérie. Les différents types d'antigènes sont :

Les antigènes somatiques O

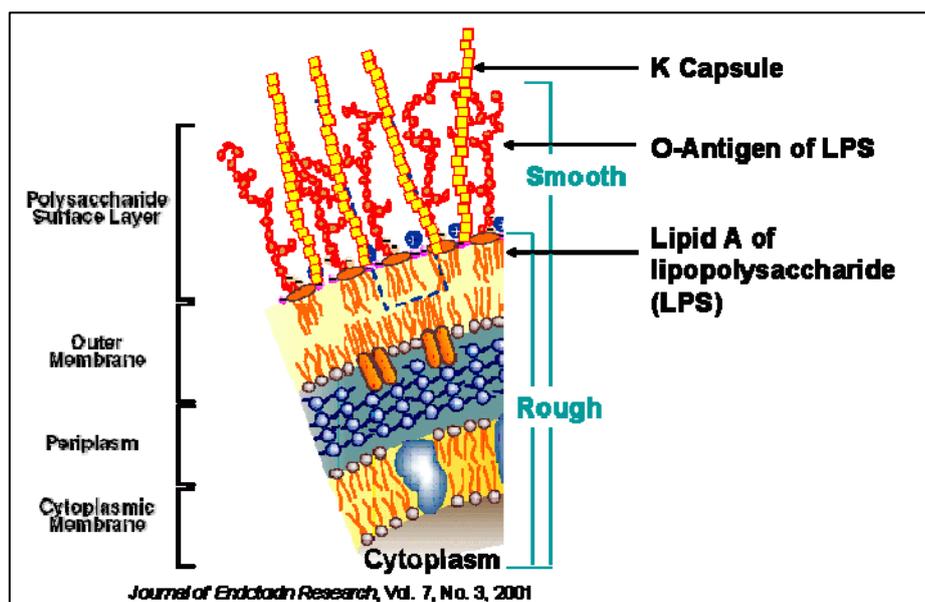
On distingue environ 157 antigènes somatiques de type O (Ag O) chez les colibacilles. L'antigène somatique ou antigène de la paroi est l'endotoxine libérée lors de l'autolyse des cellules. Il est composé de complexes des phospholipides et polysaccharides avec une fraction protéique résistant à l'ébullition. Quinze (15) sérotypes sont actuellement recensés chez les volailles.

Les antigènes capsulaires K

L'antigène capsulaire (Ag K), dont on dénombre 99 types différents, est constitué de polymères d'acides contenant des sucres réducteurs (2%). Ils peuvent être dénaturés lors du chauffage à 100°C, pendant une heure. Selon leur stabilité à la chaleur, les antigènes K sont subdivisés en 3 groupes: L, A et B. Ils sont localisés à la surface des cellules, associés à la virulence de la souche et interviennent lors de l'agglutination des antigènes O.

Les antigènes flagellaires H

L'antigène flagellaire (Ag H) est utilisé pour l'identification d'*E. coli* et il n'intervient pas dans la pathogénicité. Il s'agit de protéines détruites lors du chauffage 100°C.



Figure°2 : Les différents types d'antigènes d'*E coli*

5. Les *E. coli* pathogènes

L'espèce *E. coli* est subdivisée en de nombreuses souches pathogènes pour l'homme et les animaux (voir annexe), sur la base de la possession de propriétés ou de la production de facteurs spécifiques qui sont responsables de leur pouvoir pathogène. Ces souches pathogènes sont classiquement divisées en souches à tropisme intestinal (entérotoxigènes, entéropathogènes, entérohémorragiques, vérotoxigènes et entéro-invasives) et en souches à tropisme extra-intestinal (uropathogènes et invasives).

Le centre national de référence (CNR) des *E. coli* et des *Shigella* définit deux catégories de pathovars pour *E. coli* (<http://www.pasteur.fr/sante>), en se basant sur leur tropisme :

- les *E. coli* à l'origine de pathologies intestinales
- les *E. coli* à l'origine de pathologies extra intestinales.

5.1. Chez l'homme

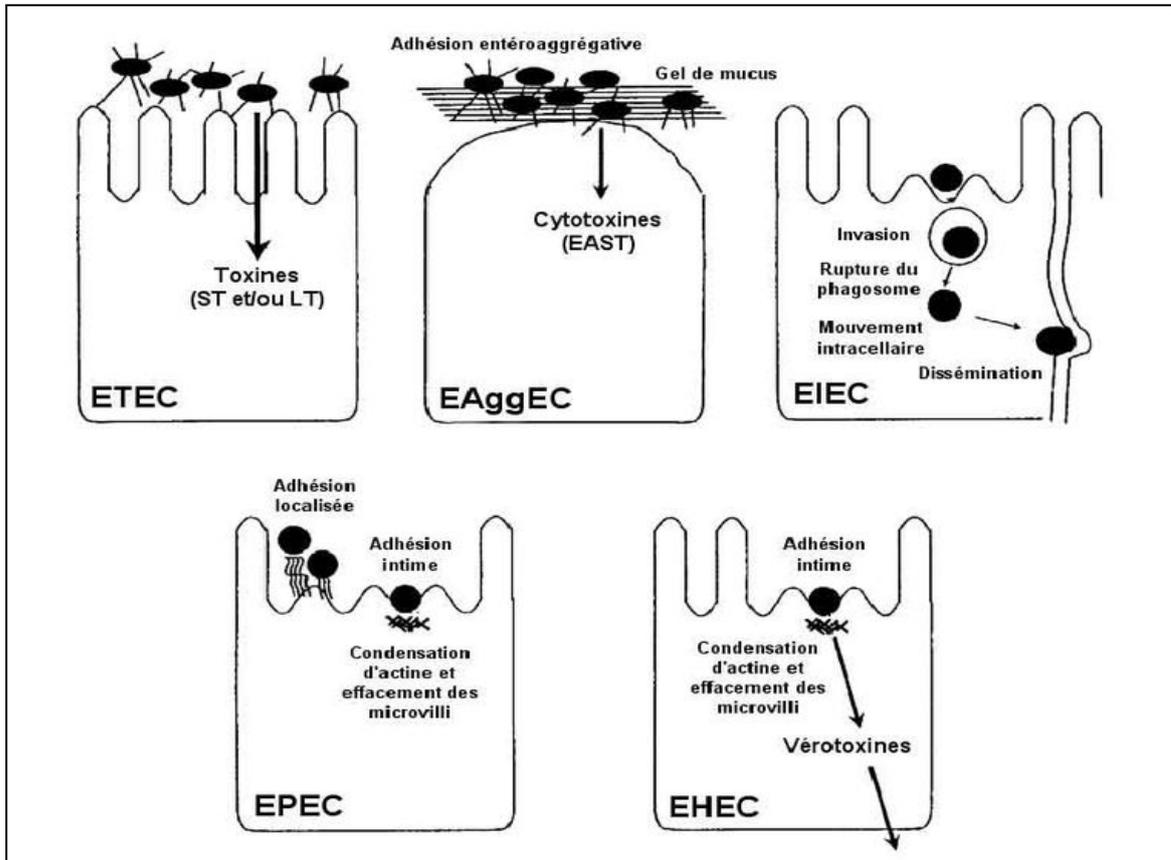
Parmi les *E. coli* à l'origine de pathologies intestinales, principalement de diarrhées, le CNR propose la classification suivante :

- **les *E. coli* enterotoxigènes, ETEC**, dont la pathogénicité est liée à la sécrétion de deux types de toxines, une toxine thermostable ST et une thermolabile LT.
- **les *E. coli* entéropathogènes, EPEC** dont la pathogénicité est liée aux lésions d'attachement/effacement (AE), définies par un attachement de ces bactéries sur les cellules intestinales et par un effacement des microvillosités, consécutif à une altération du cytosquelette.
- **les *E. coli* entérohémorragiques, EHEC**, qui induisent des colites hémorragiques chez l'homme, et qui, particulièrement chez les enfants, peuvent se compliquer en un syndrome hémolytique et urémique (SHU) (insuffisance rénale sévère pouvant nécessiter une dialyse ou une transplantation rénale) et en un purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) (troubles nerveux associés), chez les personnes âgés. Ces affections peuvent être mortelles.

Dans un rapport sur les *E. coli* qui provoquent des diarrhées (Molbak et Scheutz, 2006), l'OMS ajoute une septième classe: les *E. coli* attachant et effaçant, **AEEC**, définis comme des *E. coli* qui s'attachent aux entérocytes et effacent les microvillosités, et qui ne produisent pas toujours de verocytotoxines. Les EPEC ne sont qu'un sous-type des AEEC.

- **les *E. coli* entéroinvasifs, EIEC**, à l'origine de syndromes dysentériques, et dont la pathogénicité est proche des *Shigella*. Ces *E. coli* ont acquis la capacité à envahir les cellules épithéliales, ce qui provoque des ulcérations de la muqueuse du gros intestin.
- **les *E. coli* entéroaggrégatifs, EAggEC** (on retrouve parfois le sigle EAEC dans la bibliographie), caractérisés par un type d'adhésion agrégative en «brique empilées», à l'origine de nécroses du pôle apical des villosités avec œdème inflammatoire et hémorragique de la sous muqueuse.
- **les *E. coli* à adhérence diffuse, DAEC**, qui ont acquis la capacité d'adhérer aux cellules Hep-2* et qui paraissent uniformément dispersées sur toute la surface des cellules épithéliales.

Les *E. coli* à l'origine de pathologies extra intestinales (**ExPEC**) ont acquis la capacité à dépasser les défenses immunitaires de leur hôte, et à se propager dans l'organisme. Ils peuvent induire chez leurs hôtes des infections du tractus urinaire (ITU) : on parle souvent d'**UPEC**, Urinary Pathogenic *E. coli* ; des méningites néonatales: on parle de NMEC*, Neonatal Meningitis *E. coli* ; ou des septicémies (Mokadyet *et al*, 2005). Ils posent problème autant en médecine humaine, (notamment à cause des multiples résistances acquises portées le plus souvent par des plasmides), qu'en médecine animale du fait des fortes pertes économiques induites, notamment en filière avicole.



Figure°3 : Mécanismes d’interaction des différents pathovars d’*E. coli* (kaper et al, 2004)

5.2. Chez la volaille

Les *E. coli* pathogènes chez la volaille sont connues sous l’appellation : APEC (Avian Pathogenic *E. coli*). Le pouvoir pathogène des APEC est décrit dans le chapitre 2.

La colibacillose aviaire est une pathologie majeure, en élevage avicole, causée par les APEC. Les infections à *E. coli* représentent la grande majorité des complications bactériennes de syndromes respiratoires recensées chez la volaille. Elles sont à l'origine des diverses pathologies notamment extra intestinales et sont responsables de grandes pertes, dans l'industrie aviaire. La colibacillose est souvent considérée comme une infection secondaire, à l'exception de l'infection de la membrane vitelline (Nakamura *et al*, 1992; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005 ; Souillard *et al.*, 2006).

1. Les facteurs de virulence

Un certain nombre de facteurs de virulence ont été étudiés et semblent être associés aux APEC : les *fimbriae* de type P et de type F1, l'hémagglutinine, la résistance au sérum et le système de l'aérobactine. D'autres facteurs de virulence pourraient être présents mais leur rôle dans la pathogénicité reste encore à définir.

1.1. Les Adhésines

Les adhésines (fimbriaires ou afimbriaires) sont impliquées dans l'adhérence des bactéries, au tractus respiratoire. Les seules études actuelles ont été menées sur les *fimbriae* de type 1 ou F1 et les *fimbriae* de type P (Stordeur et Mainil, 2002). L'adhésion aux cellules épithéliales est un préalable au développement de nombreuses pathologies. Cette adhésion permet, en effet, à la bactérie de résister aux défenses mécaniques (péristaltisme, miction...) et, donc de se multiplier sur place, provoquant la formation de micro colonies (Mainil, 2003).

- **Fimbriae de type 1**

Les *fimbriae* de type 1 sont constitués d'une protéine majeure FimA, associée à d'autres protéines auxiliaires (FimF et FimG) et d'une adhésine FimH. Plusieurs variants des *fimbriae* de type 1 existent chez les APEC et semblent associées aux sérotypes des souches (Dozois *et al*, 1995). In vivo, les *fimbriae* de type 1 sont exprimés surtout dans la trachée, les poumons et les sacs aériens. Son expression ne fut jamais observée dans d'autres organes ni dans le sang (Dozois *et al*, 1994).

- **Fimbriae de type P**

La présence des fimbriae de type P est significativement plus fréquente chez les souches isolées de poulets septicémiques que chez des souches isolées de poulets sains (Dozois et *al.*, 1992). Le rôle de cette adhésine n'est cependant pas encore tout à fait élucidé. Elle ne semble pas jouer de rôle majeur dans l'adhésion aux cellules du pharynx et de la trachée, suggérant que le récepteur de cette adhésine n'y est pas présent (Dozois et *al.*, 1995; Pourbaksh et *al.*, 1997a).

1.2. Le système aérobactine

La faible quantité de fer disponible, dans les liquides physiologiques, ne permet pas aux bactéries de pouvoir s'y multiplier. C'est pourquoi, elles ont acquis un système très efficace de captation du fer leur permettant de survivre en présence de faibles concentrations en fer (Dho et *al.*, 1984; Lafont et *al.*, 1987; Emery et *al.*, 1992). Le déterminisme génétique du système aérobactine chez les *E. coli* aviaires est probablement plasmidique, comme l'ont montré des études préliminaires localisant l'opéron aérobactine sur des plasmides Col Y (Valvano, 1992). Il n'est cependant pas exclu que, dans certaines souches, ces gènes puissent être portés par le chromosome

1.3. La résistance au pouvoir bactéricide du sérum

La résistance au pouvoir bactéricide du sérum est un phénomène multifactoriel faisant intervenir des antigènes de surface de la bactérie qui interfèrent avec les défenses non spécifiques de l'hôte. Elle peut être appréciée en mettant un inoculum connu de bactéries en présence de sérum et en effectuant des comptages bactériens à intervalles réguliers. L'étude de Ellis et *al* (1988) sur 25 souches d' *E. coli* isolées de dindes, montre que la résistance au pouvoir bactéricide du sérum est souvent associée à la virulence mesurée par un test de létalité sur dindonneau. Dozois et *al* (1992) ont mis en évidence une association de même type.

1.4. Toxines

Les entérotoxines protéiques sont classées selon leurs caractéristiques biochimiques et structurales ou selon leurs modes d'action, en deux groupes (Cohen et Karib, 2006) :

- Les entérotoxines cytotoniques affectent les cellules épithéliales intestinales pour en altérer les fonctions sécrétoires
- Les entérotoxines cytotoxiques agissent sur l'épithélium intestinal en y provoquant des dommages histologiques importants.

Quelques études ont démontré que les souches APEC sont capables de produire des toxines pouvant être impliquées dans le processus pathogénique (Salvadori *et al.*, 2001).

1.5. Hémagglutinine

Récemment, il a été montré que le gène *tsh* isolé d'une souche APEC de poulet et localisé sur un plasmide codant pour une hémagglutinine sensible à la température, est associé préférentiellement à ces souches et ne se retrouve pas chez des souches d'*E.coli* isolées de fèces d'animaux sains (Provence et Curtiss III, 1994).

2. L'expression clinique

Contrairement à ce qui se passe chez les mammifères, *E. coli*, chez les volailles, n'est qu'assez peu impliqué, en pathologie digestive mais participe à des syndromes variés évoluant sous forme septicémique ou localisée: maladie respiratoire chronique, omphalite, synovite, salpingite ou coligranulomatose (Lecoanet, 1992). Ces infections extra intestinales, systémiques sont dues aux propriétés invasives des souches APEC et la dissémination des bactéries se fait, le plus souvent, à partir du système respiratoire. Les manifestations cliniques diffèrent suivant l'âge de l'animal (Dho-Moulin, 1993).

2.1. La colibacillose respiratoire et la colisepticémie

La colibacillose respiratoire et la colisepticémie représentent une dominante pathologique chez les poulets de chair élevés industriellement. Elles se présentent souvent chez les animaux de 6 à 10 semaines comme une complication d'une infection mycoplasmique ou virale (virus de la bronchite infectieuse IBV, virus de la maladie de Newcastle NDV dont les souches vaccinales) survenue dans les deux ou trois premières semaines de vie, les conditions d'ambiance jouant un rôle déterminant dans l'apparition et la gravité du processus (Lecoanet, 1992).

- **La maladie respiratoire chronique**

Il s'agit de la maladie des sacs aériens ou maladie respiratoire chronique qui apparaît principalement chez les poulets âgés de 5 à 12 semaines avec un pic entre 6-9 semaines. Les oiseaux malades sont prostrés, anorexiques et présentent des symptômes respiratoires non spécifiques (éternuements, râles, toux, jetage, larmolements et sinusite). L'extension de l'infection (aérosacculite) provoque des lésions fibrineuses des séreuses (péricardite et une périhépatite). Plus rarement, une panophtalmie, une salpingite, et des infections des os et des structures synoviales peuvent apparaître après une septicémie. La morbidité dépasse souvent (20%) et la mortalité reste inférieure à (5%) sauf complications (Salvadori et al., 2001). Les formes subcliniques provoquent une diminution de la prise alimentaire et les conséquences de la maladie sont surtout d'ordre économique et condamnent les oiseaux à l'abattage (Gross, 1991 ; Lecoanet, 1992).

- **La colisepticémie**

E. coli est isolée d'une maladie infectieuse intense ressemblant à la fièvre typhoïde et au cholera chez des poulets et des dindes adultes. Les oiseaux affectés sont en bon état général et ont le jabot plein, ce qui indique la nature aiguë de l'infection. Les lésions les plus caractéristiques sont un foie vert et des muscles pectoraux congestionnés. Parfois de petits points blancs sur le foie sont décrits. Lors d'une colisepticémie moins virulente, il y a une tendance à développer une péricardite et une péritonite (Jeffrey et al., 2002).

La plupart des *E coli* sont responsables de péricardite après une phase de septicémie. La péricardite est habituellement associée à une myocardite qui entraîne des changements sensibles au niveau de l'électrocardiogramme, souvent avant que les lésions macroscopiques n'apparaissent. Le sac péricardique devient trouble et l'épicarde devient œdémateux et recouvert d'un exsudat colore. Le sac péricardique est souvent rempli d'un exsudat fibrineux jaunâtre. L'association péricardite myocardite entraîne une baisse de la pression sanguine au niveau de l'artère carotide de 150 à 40 mm de mercure juste avant la mort.

2.2. Mortalité embryonnaire et du jeune poussin

Des poules inoculées expérimentalement peuvent excréter des *E. coli* dans plus de 26% de leurs œufs alors que 0,5 à 6 % des œufs d'une poule saine renferment des *E. coli*. En effet la bactérie peut occasionnellement être isolée de vitellus d'apparence normal. Dans cette pathologie, on peut considérer que celle-ci est l'agent primaire de l'infection (Gross, 1994., Jordan et Patisson., 1996, Dho Moulin et Fairbrother., 1999).

La contamination fécale est la principale source d'infection des œufs. Les autres sources, plus rares, sont les infections ovariennes ou les salpingites. En raison du gradient de température, les micro-organismes sont aspirés à travers la coquille poreuse, tandis que d'autres peuvent pénétrer de façon active en faveur de l'humidité de la surface de la coquille (Bains, 1979). Le lieu de l'infection est le vitellus de l'embryon. De nombreux embryons meurent avant l'éclosion, particulièrement en fin d'incubation. Ensuite l'incidence de l'infection augmente peu après l'éclosion et se réduit après 6 jours: quelques-uns meurent peu après l'éclosion et la perte de poussins continue jusqu'à l'âge de 3 semaines. Les poulets éclos d'œufs contaminés par *E. coli* présentent souvent une inflammation de l'ombilic (omphalite), cause de mortalité. Les poulets ou la volaille survivant plus de 4 jours peuvent présenter une péricardite, preuve de la diffusion systémique depuis le sac vitellin. Mais il est aussi possible de n'avoir aucune mortalité : les seules manifestations de l'infection du vitellus étant la rétention du sac infecté et la réduction du gain de poids (Gross, 1991). Suite à l'infection par *E coli*, le contenu normal du sac vitellin (visqueux, jaune-vert) change pour devenir plus liquide, marron jaune voire caséux.

La révélation microscopique, au niveau de l'enveloppe, semble bénigne. L'enveloppe est œdémateuse, il y a une zone externe de tissu connectif, puis une couche de cellules inflammatoires (polynucléaires, hétérophiles et macrophages), une couche de cellules géantes, une zone nécrotique (polynucléaires, hétérophiles et bactéries) et ensuite le contenu infecté du sac vitellin (Gross, 1991).

2.3. Le syndrome de la grosse tête

Cette maladie est caractérisée par une inflammation aigue à subaigue des cellules de la peau et du tissu sous cutané de la tête et des régions périorbitaires. La colonisation des tissus par les colibacilles est secondaire à une infection par des agents prédisposant comme les virus ou des teneurs élevés en ammoniac (White et al, 1990).

La morbidité est souvent faible (1%), mais les animaux qui présentent les symptômes en meurent dans la majorité des cas (Parreira et al, 1998). La maladie apparaît le plus souvent aux alentours de la 30^{ème} semaine et les conséquences les plus importantes sont des retards de croissance qui résultent de l'infection et entraînent des pertes économiques conséquentes.

2.4. Ovarites et salpingites chroniques chez l'adulte

Les formes génitales observées chez les poulettes de 4 à 13 semaines ou chez les adultes accompagnent ou non les manifestations respiratoires et se traduisent par des chutes de ponte survenant en particulier au 2-3^{ème} mois de ponte, des morts subites (2 à 3% par mois) ou des diarrhées blanches. L'autopsie révèle des lésions d'ovario-salpingites et de péritonite (Gross, 1991 ; Lecoanet, 1992).

2.5. Les formes plus rares

- **Infection synoviale**

E. coli a été isolée d'articulations de poulets. Cette infection synoviale est souvent le témoin d'une septicémie. De nombreux oiseaux guérissent au bout d'une semaine, tandis que les autres développent une infection chronique et peuvent devenir décharné (Gross, 1991)

- **La coligranulomatose ou maladie de Hjiarre**

La coligranulomatose est une forme de colibacillose devenue relativement rare. Néanmoins la mortalité peut atteindre plus de 75 %. Elle est caractérisée par l'apparition de multiples petites formations nodulaires sur l'intestin grêle, le mésentère et le foie (Gross, 1991).

- **Entérite**

E. coli a été isolée chez des volailles lors d'entérites mais les recherches ne sont pas suffisantes pour indiquer qu'il s'agit de l'étiologie. L'infection du tractus digestif par *E. coli* est habituellement secondaire à d'autres affections du type coccidiose, entérite nécrotique, histomonose, parasitisme (vers ou champignons), ou suite à des circonstances débilitantes telle la malnutrition (Pakpinyo et al., 2002). Les lésions observées correspondent à une inflammation sévère de l'intestin, de larges plaques épaissies et œdémateuses contenant du sang et du mucus. Les poulets atteints présentent une diarrhée, à différents degrés de déshydratation, et une baisse rapide de l'état général (Bains, 1979).

- **La dermatite à *E. coli***

Elle a été rapportée pour la première fois par Randall, en 1984, en Angleterre. C'est une maladie de surpeuplement et de mauvaise hygiène associée à des problèmes de santé, dans les élevages. D'ailleurs les élevages ayant peu de problèmes de santé ont aussi peu de saisies causées par la dermatite nécrotique. *E. coli* est la cause prédominante de ces lésions bien que d'autres agents tels que *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus Vulgaris* et *Streptococcus dysgalactiae* ont aussi été isolés (Gomis et al., 1997).

3. Données épidémiologiques

3.1. Habitat et source de contamination

L'espèce *E. coli* fait partie de la flore intestinale présente normalement chez l'homme et chez de nombreux animaux. Les animaux peuvent constituer un réservoir et la dissémination, dans l'environnement, provient essentiellement de contaminations fécales qui peuvent aussi contaminer l'eau, les sous-produits d'activités agroalimentaires et les aliments pour animaux. Toutes les espèces aviaires sont sensibles à *E. coli*. Certains facteurs prédisposent les volailles à la maladie. Le jeune âge, le stress, un taux élevé d'ammoniac, une baisse de la température et des infections concomitantes favorisent la colibacillose (Cohen et Karib, 2006., Kaper, 2005).

Le plus important réservoir des *E. coli* aviaires est le tractus digestif de l'animal dont 10 à 15 % de la population colibacillaire appartient à des sérotypes potentiellement pathogènes. Chez le poulet, les concentrations sont de l'ordre de 10⁶ colibacilles par gramme de matière fécale. Les plus grandes concentrations étant retrouvées chez les animaux de moins de 3 semaines, essentiellement au niveau du tractus digestif postérieur (Gross, 1994 ; Dhomoulin et Fairbrother, 1999).

Les *E. coli* sont très facilement véhiculées par la poussière qui constitue une source importante de contamination en élevage (Oyetunde, 1978). La transmission des souches pathogènes, via l'œuf, est aussi très fréquente et responsable d'un taux important de mortalité chez le jeune poussin. La source majeure d'infection de l'œuf semble être la contamination fécale de sa surface lors de la ponte avec, ensuite, une transmission rapide de la souche pathogène, à l'ensemble du lot après l'éclosion (Stordeur et Mainil, 2002).

L'inhalation de poussière contaminée par les coliformes est la plus importante source d'infection des sacs aériens. L'exposition à la poussière et à l'ammoniac entraîne la déciliation du tractus respiratoire supérieur des oiseaux. Ensuite les voies respiratoires non indemnes deviennent très sensibles à l'invasion d' *E. coli* ce qui permet aux *E. coli* inhalées d'infecter les sacs aériens (Gross, 1991, Monroe et al., 2003).

Le lieu précis où les *E. coli* se déposent au niveau du tractus respiratoire n'est pas connu. Pour éliminer les particules inhalées, les poumons des oiseaux dépendent principalement de la phagocytose par les cellules épithéliales de la zone des para-bronches. Ils ne possèdent pas de défense cellulaire similaire aux macrophages alvéolaires des mammifères, au niveau de la zone d'échange des gaz. D'autre part il n'y a aucun mécanisme de défense cellulaire au niveau des sacs aériens et leur protection dépend de l'afflux de polynucléaires hétérophiles, lors de l'inflammation. Ainsi, les régions d'échanges gazeux entre le poumon et les sacs aériens sont relativement sensibles à la pénétration et à la multiplication des bactéries. La zone des capillaires aériens du poumon est alors un important site d'entrée des *E. coli*, dans le système circulatoire des oiseaux (Pourbakhsh et al., 1997 b).

3.2. Importance économique et sanitaire

La colibacillose aviaire est une maladie fréquente en élevage industriel des volailles et une des principales causes de la mortalité chez les poulets et les dindes. Cette pathologie est une cause significative des pertes économiques, dans l'élevage industriel des volailles, et représente une importante cause de saisie à l'abattoir (El Fadil et al., 1996).

Les pertes dues à la colibacillose sont si importantes que l'on doit s'attacher à trouver un traitement ou une prophylaxie efficace (Chanteloup et al., 1991). Son importance économique est considérable. Les pertes dues à la colisepticémie correspondent aux mortalités observées aux contre-performances économiques des lots infectés aux troubles de la reproduction, chute de l'éclosabilité, augmentation de la mortalité en coquille ou pendant les premiers jours (Mogenet et al., 1997).

3.3. Les sérotypes

Les premières études menées sur les colibacilles aviaires par Sojka et Carnaghan (1961) montrent que les sérogroupes les plus fréquents sont O1, O2, O35 et O78. Les dernières études réalisées montrent que les plus présents et les plus pathogènes sont les sérotypes O1, O2 et O78, représentant de 15 à 61 % des souches isolées bien que d'autres soient aussi présents. Les autres sérotypes représentés de manière significative sont: O8, O15, O18, O35, O88, O109, O115 et O116. Ces résultats ont été confirmés sur une grande collection de souches aviaires isolées d'animaux morts de colibacillose, par le biais d'une enquête épidémiologique et par un test de létalité sur poussins d'un jour (Blanco et *al.*, 1997).

4. Diagnostic

La suspicion de la colibacillose repose d'abord sur le tableau clinique et la présence de lésions telles que de l'aérosacculite, parfois accompagnée de périhépatite et de péricardite. Il faut, cependant, garder à l'esprit que ces lésions peuvent aussi être engendrées par d'autres agents pathogènes (Strodeur et Mainil, 2002). Les manifestations cliniques et l'autopsie des oiseaux malades ne permettent qu'une suspicion de la maladie mais seule l'examen bactériologique précise l'agent responsable avec certitude.

4.1. Diagnostic de laboratoire

- **Isolement et identification**

En présence de lésions évoquant la colibacillose, seuls un isolement et une identification de l'agent responsable sur la base de réactions biochimiques permettront de confirmer la maladie. Les prélèvements seront réalisés, à partir du sang du cœur et des tissus affectés (foie, rate, sac péricardique), en évitant toute contamination par le contenu intestinal. Les prélèvements seront ensemencés en milieux appropriés (bleu d'éosine méthylène ou EMB, Mac Conkey agar ou Drigalski agar).

Un diagnostic présomptif d'infection par *E. coli* peut être fait si la plupart des colonies apparaissent sombres avec des reflets métalliques sur gélose EMB ou roses vifs avec un précipité sur la gélose Mac Conkey. Les colibacilles sont ensuite mis en évidence par croissance sur galerie biochimique miniaturisée qui donne les caractéristiques biochimiques de l'agent isolé (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

L'isolement d'une souche d'*E. coli*, à partir d'une lésion, pose toujours le problème de son identification comme pathogène ou non pathogène. *E. coli* étant un hôte habituel du tube digestif des volailles, l'isolement d'une souche non pathogène ne peut pas être totalement exclu. Il est donc nécessaire de compléter de caractériser les souches potentiellement pathogènes par le sérotypage et par le criblage des gènes codant pour les facteurs de virulence par des techniques de biologie moléculaire. Par ailleurs, des lésions similaires à celles de la colibacillose peuvent aussi être causées par d'autres bactéries.

- **Caractérisation des souches pathogènes**

Le sérotypage est, actuellement, la méthode la plus utilisée dans les laboratoires de diagnostic, Elle permet de caractériser les souches sur la base des antigènes de surface qu'elles possèdent. Les antigènes somatiques des sérogroupe O1, O2, et O78 sont présents sur les souches isolées de prélèvements pathologiques, dans environ 60% des cas. Les problèmes rencontrés en diagnostic proviennent ainsi de la difficulté à identifier comme pathogènes ou non pathogènes les 40% de souches qui n'appartiennent pas à ces 3 sérogroupe majoritaires.

Des tests sur animaux (par exemple test de létalité sur poussin d'un jour) permettent aussi de confirmer que certaines de ces souches sont effectivement pathogènes mais ce type de test, s'il apporte des précisions appréciables reste trop lourd à mettre en œuvre pour un diagnostic de routine.

4.2. Diagnostic différentiel

Les lésions observées ne sont pas spécifiques d'une infection par *E. coli*. D'autres agents peuvent être responsables de lésions similaires comme la pasteurellose, la salmonellose, le coryza infectieux, la variole aviaire, les mycoplasmoses ou tuberculose dans le cas de la maladie de Hjarre (Guerin et Boissieu, 2008).

5. Traitement et Prévention

Le traitement est basé sur une antibiothérapie. L'antibiogramme est nécessaire du fait des nombreuses antibiorésistances observées sur les isolats de terrain. Si le choix est possible, il est préférable d'utiliser des molécules comme les quinolones par voie orale (acide nalixidique, acide oxolinique, fluméquine, enrofloxacin), les lincosamides par voie orale, les aminosides par voie parentérale, les bêtalactamines par voie orale et les tétracyclines. Certains antibiotiques, comme les aminosides, la colistine, la spectinomycine ou la framycétine, ne franchissent pas la barrière intestinale : ils sont donc inactifs s'ils sont administrés par voie orale sur les colibacilloses systémiques (Jean-Luc Guerin et Cyril Boissieu).

La prévention sanitaire est fondée sur la maîtrise des facteurs de risque : alimentation et conditions environnementales, qualité de l'eau, plus globalement et le respect des règles de biosécurité. On peut aussi administrer aux poussins de 1 jour des flores probiotiques (définies) ou des flores digestives normales (non définies) de sujets adultes (*Jean-Luc Guerin et Cyril Boissieu*). La prévention médicale consiste à faire appel à des vaccins inactivés administrés aux reproducteurs pour protéger les jeunes poussins avec les anticorps d'origine maternelle.

Les antibiotiques

Les antibiotiques sont la principale classe des médicaments vétérinaires. Ils sont utilisés, depuis les années 50, pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne chez les animaux producteurs de denrées alimentaires et les animaux de compagnie.

1. Définition

Les antibiotiques sont des substances élaborées par certains micro-organismes ou des substances semi-synthétiques voire entièrement synthétiques. Ils ont une toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes. (Quinn et al 2003). À doses faibles, ils sont bactériostatiques ou bactéricides. Cependant, un antibiotique bactéricide à une concentration peut s'avérer bactériostatique à une concentration plus faible (Singleton, 2005).

2. Classification

Les antibiotiques, quel que soit leur origine, naturelle, semi-synthétique ou synthétique peuvent être classés en fonction de leur spectre d'activité, mécanisme d'action, la souche productrice, la voie de biosynthèse ou la structure chimique (Perry et al, 2004). L'abondance des molécules d'antibiotiques a rendu nécessaire leur classification en famille (Beraud, 2001), dans lesquelles les différents produits partagent une structure chimique et un mécanisme d'action identique (Fancher et Avril, 2002).

3. Les antibiotiques en médecine vétérinaire

Les antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire appartiennent aux mêmes familles, à l'exception de quelques sous familles spécifiques de la médecine humaine.

Les traitements antibiotiques ont pour objectifs la maîtrise des maladies, la restauration ou le maintien du bien-être animal et la prévention de la transmission des agents pathogènes aux autres animaux voire à l'Homme.

Les affections les plus souvent traitées sont digestives et respiratoires. Pour plusieurs types de production d'élevages intégrés (volaille, veau ou poisson), où les animaux sont élevés en groupe dans des salles, les conditions d'élevage amènent les vétérinaires à prescrire des traitements de groupes.

Pour d'autres types de production, les traitements sont individuels. Chez les animaux de compagnie, les traitements sont le plus souvent individuels.

3.1. Utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire

En médecine vétérinaire, il existe quatre usages possibles des antibiotiques, chacun ayant un objectif précis (Schwarz, 2001).

A. Utilisation à titre thérapeutique curatif

Les antibiotiques peuvent être utilisés à titre thérapeutique curatif. L'objectif est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité (Zanditenas, 1999). Le traitement a aussi pour effet de réduire la souffrance et de restaurer la production (lait, viande). Il réduit l'excrétion bactérienne, permettant dans certains cas d'obtenir une guérison bactériologique et, lors d'infection zoonotique, il peut éviter la contamination humaine.

En Algérie, les principaux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : liste des antibiotiques utilisés à titre curatif

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques	Familles d'antibiotiques	Antibiotiques
Beta lactamines	Ampicilline/amoxicilline Amoxicilline+acide clavulanique Oxacilline Pénicilline Cefalexine Ceftiofur/ cefotaxime Cephalothine	Quinolones	Acide nalidixique Acide oxolinique Flumequine Norfloxacine Enrofloxacin
Aminosides	Neomycine	Tetracyclines	Tétracycline
Macrolides	Tilmicosine Erythromycine Spiramycine		
Polypeptides	Colistine	Glycopeptides	Vancomycine
Sulfamides	Trimethoprime+sulfaméthoxazole		

B. Utilisation en métaphylaxie

Lorsqu'une infection collective et très contagieuse se déclare, dans un élevage, avec de grands effectifs et évolue sur un mode aigu, avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer une (des) bactérie(s), l'ensemble du groupe d'animaux est traité. Les sujets qui sont exposés mais ne présentent pas encore de signes cliniques (sains ou en incubation) font donc l'objet d'un traitement en même temps que ceux qui sont déjà malades.

Cette pratique est qualifiée de métaphylaxie. Elle permet de traiter les animaux soumis à la pression infectieuse alors qu'ils sont encore en incubation ou lorsque les manifestations cliniques sont très discrètes. La métaphylaxie est généralement mise en œuvre à partir d'un seuil d'atteinte des animaux au sein du lot de 10 à 15 % de l'effectif (Maillard, 2002).

C. Utilisation en antibio-prévention

Les antibiotiques peuvent être administrés à des périodes critiques de la vie, sur des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue. Dans ces conditions, on parle d'antibio-prévention car le traitement permet d'éviter totalement l'expression clinique. Cette modalité d'utilisation des antibiotiques est adaptée à une situation sanitaire donnée et doit être provisoire et ponctuelle. L'antibio-prophylaxie est également utilisée lors d'opérations chirurgicales pour prévenir les infections.

D. Utilisation en tant qu'additifs dans l'alimentation animale

L'usage des antibiotiques dans l'aliment à titre d'additifs est très limité actuellement. Ces « antibiotiques régulateurs de flore » (ARF) ou « antibiotiques promoteurs de croissance » (AGP pour « antibiotic growth promoters ») sont utilisés à des doses très faibles, non curatives et en vue d'améliorer la croissance des animaux par un effet régulateur, au niveau de la flore intestinale. Ces antibiotiques sont tous des agents chimiothérapeutiques non utilisés en médecine humaine pour limiter les risques de sélection de résistance vis-à-vis de molécules d'intérêt médical majeur pour la médecine humaine (Source : AFSSA, 2006). Cet usage fait l'objet de nombreuses critiques et il est totalement interdit au sein de l'union Européenne, depuis 2006 (Soulsby, 2007).

4. Impact de l'antibiothérapie vétérinaire sur la santé humaine

4.1. Résidus de traitement et flore intestinale humaine

Des résidus d'antibiotiques sont parfois retrouvés dans le lait ou la viande, après un traitement antibiotique préventif ou thérapeutique des animaux. Les résidus d'antibiotiques présents, dans les denrées animales, représentent un danger dont les risques associés sont

d'ordres allergique, toxicologique, microbiologique et industriel. Ces résidus peuvent notamment perturber la flore intestinale humaine. En effet, même à très faibles doses, les antibiotiques ingérés ont un impact sur l'écologie de la flore intestinale comme cela a été montré *in vitro* (Carratal et al ,1996)) et *in vivo* (Corpert et al , 1989), ce qui peut comporter certains risques pour la santé humaine.

4.2 Diffusion des bactéries résistantes entre l'animal et l'Homme

Les animaux de rente et les animaux de compagnie, comme les humains, peuvent être des réservoirs de bactéries résistantes et le développement de bactéries résistantes peut se produire aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. La dissémination de ces bactéries résistantes entre les différents hôtes (animal-animal, humain-humain, animal-humain ou humain-animal) peut se produire par contact direct ou par contact avec des matières contenant des bactéries (salive, fèces, ...) mais peut également se produire par la contamination de la nourriture, de l'air ou de l'eau. Lorsqu'elle atteint un nouvel hôte, la bactérie peut coloniser ou infecter. Elle peut alors disséminer ses gènes de résistance aux bactéries présentes (commensales ou pathogènes) mais également recevoir elle-même des gènes de résistance d'autres bactéries.

5. L'antibiorésistance

La résistance aux antibiotiques est un sérieux problème en Algérie et dans le monde entier. Le développement de la résistance acquise aux antibiotiques est un défi pour les médecins et les vétérinaires. L'émergence et le développement de la résistance chez les bactéries pathogènes pour l'homme et l'animal est le résultat de plus de 50 ans d'usage de ces molécules avec une mauvaise compréhension de l'impact écologique de leur usage sur la microflore bactérienne (Acar et Rostel, 2001)

5.1. Définition

Les phénomènes de résistance ont été caractérisés aussi bien par des cliniciens que par des bactériologistes et des généticiens. Il n'existe pas une mais plusieurs définitions de la résistance. La résistance bactérienne aux antibiotiques a en fait deux définitions (Chabbert, 1982) :

- Un germe est dit résistant quand la concentration d'antibiotique qu'il est capable de supporter est plus élevée que la concentration atteignable *in vivo*.
- Une souche est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Rapport technique n°210 de l'OMS, 1961).

Une définition clinique associe la notion de succès et d'échec clinique, une bactérie résistante qui échappe au traitement.

D'un point de vue génétique la résistance est due soit à la modification de l'information génétique endogène, soit à l'acquisition de matériel génétique exogène (Guillot, 1988).

5.2. Mécanismes de résistances

A. Mécanismes génétiques

On distingue deux types de résistance d'une bactérie à un antibiotique :

- naturelle ou intrinsèque lorsque la souche bactérienne est naturellement sensible à l'action de l'antibiotique. C'est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce bactérienne et est programmé sur le génome bactérien. Les bactéries naturellement sensibles définissent le "spectre d'activité" de l'antibiotique ;
- acquise lorsqu'elle provient de l'acquisition d'un gène de résistance par mutation du chromosome ou, cas le plus fréquent, par intégration de ce gène dans un plasmide (Courvalin et Philippon, 1989 ; Duval et Soussy, 1990 ; Fontaine et Cadoré, 1995 ; Bories et Louisot, 1998).

La résistance par mutation chromosomique concerne environ 10 % des cas isolés en clinique tandis que la résistance par acquisition de gènes concerne la quasi-totalité des antibiotiques et correspond à la majorité des cas isolés en clinique 90% (Courvalin et Philippon, 1989 ; Courvalin et Trieu-Cuot, 1989).

B . Mécanismes biochimiques

• La modification de la perméabilité membranaire

Pour agir, les antibiotiques doivent pénétrer dans la cellule bactérienne. Beaucoup d'antibiotiques utilisent les systèmes de transport propres à la bactérie pour ses échanges avec l'extérieur pour entrer. Pour résister, la bactérie contrecarre cette entrée de toxiques en diminuant la perméabilité de sa membrane par :

1) Une altération des porines : ce mode de résistance n'affecte que les bactéries Gram-. Chez ces bactéries, la membrane externe constitue une barrière de diffusion très efficace. L'antibiotique ne peut traverser cette barrière qu'en empruntant des structures particulières : les porines. Le passage des antibiotiques, à travers les porines, est d'autant plus facile que les molécules sont de petites tailles, neutres et très hydrophiles. Toute modification des porines rend le passage des molécules hydrophobes (comme la famille des bêta-lactamines) encore plus difficile. L'absence de passage ou l'augmentation du temps de passage protège les bactéries et les rend résistantes.(Julian,1997).



Figure 4: Résistance par altération des porines

- 2) Une inhibition du transport actif
- 3) Une inhibition de la pénétration à travers les peptidoglycane recouvrant la membrane plasmique chez les bactéries gram +.
- 4) La modification de la composition du lipopolysaccharide (LPS), soit dans le polysaccharide, soit dans le core, peut aussi être à l'origine d'une diminution de la perméabilité.

Ce mécanisme n'est, cependant, pas très performant car il suffit d'augmenter les doses d'antibiotiques pour faire face à cette baisse de la perméabilité membranaire. Néanmoins, ce système, lorsqu'il est associé à d'autres systèmes de résistance, peut protéger de façon efficace la bactérie même à des doses importantes d'antibiotiques. (Julian 1997) , (Marina,1998).

• L'efflux

Il s'agit d'une excrétion active de l'antibiotique par des pompes à protons hors de la cellule. La cellule élimine, ainsi, l'antibiotique plus rapidement qu'il n'entre. Le fonctionnement de la pompe, qui est constituée d'une protéine produite par la bactérie, nécessite de l'énergie. Ce système est très efficace puisqu'il peut venir à bout de doses d'antibiotiques 100 fois supérieures aux doses thérapeutiques.(Stuart , 1989)

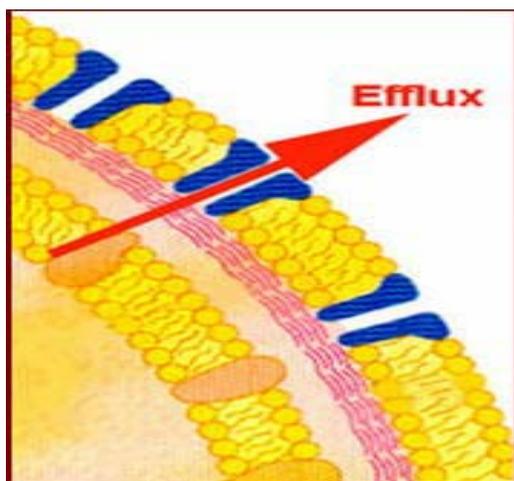


Figure 5 : Excrétion de l'antibiotique par efflux

- **La modification de la cible**

Cela se produit lorsqu'un antibiotique donné ne peut se lier à la cible sur laquelle il agit habituellement. La bactérie modifie ses ribosomes, ses enzymes de synthèse de la paroi bactérienne, son ADN gyrase, son ADN polymérase...

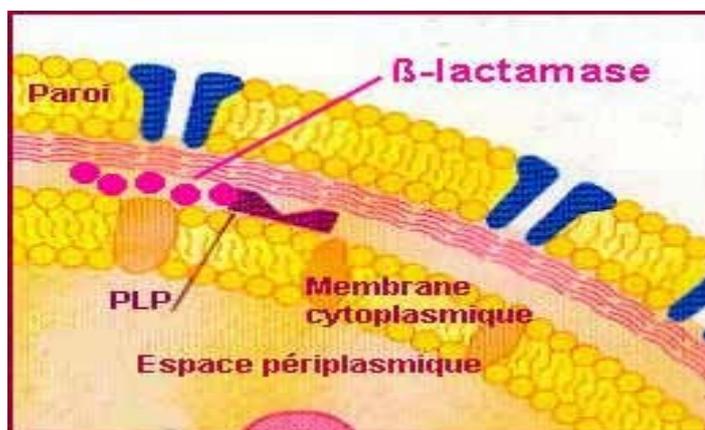


Figure 6 : Résistance par production de β -lactamase

Une mutation peut induire une modification de la cible de l'antibiotique utilisé. À cause d'une moindre affinité, l'efficacité sera réduite. On retrouve ce phénomène pour de nombreuses familles d'antibiotiques : méticilline et nouvelles PLP (protéines de liaisons des pénicillines), macrolides et méthylation de l'ARN, rifampicines et mutation de l'ARN polymérase ADN-dépendante. Ce mécanisme de résistance est fréquent pour les quinolones : la bactérie résistante synthétise une ADN gyrase moins sensible (kall, 2002).

- **Résistance par inactivation enzymatique de l'antibiotique**

La synthèse de certaines enzymes peut réduire ou annuler l'efficacité d'un antibiotique. Ce mécanisme est décrit contre les Beta-lactamines, les aminosides et le chloramphénicol. Dans le cas des Beta-lactamines, qui représentent la principale famille d'antibiotiques la plus utilisée dans le monde et qui est due à leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et leur faible cout pour certaines molécules (Livermore 1985). Les bactéries ont développé différents mécanismes pour contrecarrer l'action des β -lactamines, principalement la synthèse des enzymes (β lactamase) qui inactivent les β -lactamines par modification chimique.

Ces enzymes catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame des antibiotiques de la famille des β -lactamines, donnant un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antimicrobienne (Matagne *et al.*, 1998).

La production des β -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu et le plus important des bactéries vis-à-vis des β -lactamines (Livermore 1995). La plus grande partie de ces enzymes a été mise en évidence chez les bacilles à Gram- dont ils sont exportés dans le milieu périplasmique. Les gènes qui codent pour ces enzymes sont d'origine chromosomique ou plasmidique. Ces gènes ont aussi été détectés sur des transposons et des intégrons.

La classification moléculaire des β -lactamases tient compte de la structure primaire des différentes β -lactamases et les divise en 04 classes (A à D). La classe A est la plus diversifiée : on y retrouve les pénicillinases des bactéries à Gram+, les β -lactamases plasmidiques à large spectre qui hydrolysent les céphalosporines avec autant d'efficacité que les pénicillines, les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) qui hydrolysent les céphalosporines de 3^{ème} génération et les monobactames.

La majorité de ces enzymes est sensible aux inhibiteurs suicides comme l'acide clavulanique. Les principaux représentants de ce groupe sont les β -lactamases du type TEM, SHV et CTX-M.

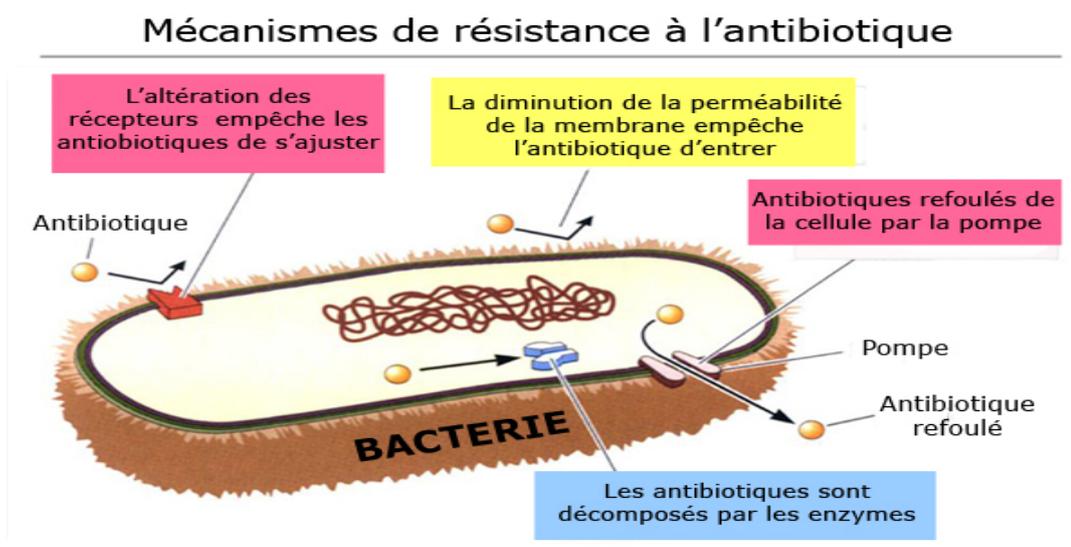


Figure 7 : mécanismes de résistance aux antibiotiques (Anonyme 2)
(<http://www.bacteriologie.net/generale/resistanceantibiotiques.html>)

OBJECTIF

L'objectif de notre étude est de déterminer d'une part la prévalence des souches *E.coli*, à partir de poulets suspectés de colibacillose et d'autre part d'étudier leur sensibilité aux antibiotiques. Pour atteindre notre objectif, nous avons réalisé les étapes suivantes:

- Isolement et identification des souches *E. coli*, à partir de poulets retirés de la chaîne d'abattage, à l'abattoir de Bordj Menaiel ;
- Sérotypage des souches *E. coli* : recherche des sérogroupes O1, O2 et O78 qui sont les plus fréquemment rencontrés chez les APEC ;
- Étude de la sensibilité des souches isolées à 12 antibiotiques :
 - À usage aviaire: amoxicilline, ampicilline, colistine, norfloxacine, acide nalidixique, tétracycline, triméthoprime+sulfaméthoxazole ;
 - Dans le cadre de l'épidémiologie: chloramphénicol et nitrofurane ;
 - Pour la recherche des BLSE: amoxicilline+acide clavulanique, cefotaxime et céphalothine.

1. PRÉLÈVEMENT ET STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE

1.1. Lieu et période de prélèvement

Les prélèvements ont été réalisés, dans un abattoir de viandes blanches dans la région de Bordj Menaiel, l'une des principales zones de production de volailles, en Algérie. L'abattoir possède une capacité d'abattage de plus de 6000 poulets par jour. Nous avons effectué 15 visites, à raison d'une visite par semaine, de mars à juillet 2011

Les prélèvements ont été effectués sur 200 poulets (abattus vers l'âge de 45 jours), issus des fermes localisées dans 07 régions (tableau 3), suspectés de colibacillose et retirés de la chaîne d'abattage. Les poulets présentaient soit des lésions caractéristiques de colibacillose soit un retard de croissance ainsi qu'une mauvaise assimilation

Tableau 3: Provenance des poulets prélevés, à l'abattoir de Bordj Menaiel

Région	Alger	Boumerdès	Bouira	Bordj Menaiel	Draa Ben Kheda	Lakhdaria	Tizi-Ouzou	TOTAL
Nombre de poulets	23	42	39	30	25	19	22	200

1.2. Préparation des prélèvements

Sur les 200 poulets, nous avons prélevé un seul organe, le foie (un des organes filtres qui concentrent le germe recherché). Chaque foie a été prélevé stérilement, dans des pots stériles, puis acheminé, au Laboratoire de Microbiologie de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'El Harrach. Les prélèvements ont été transportés dans une glacière et conservés à + 4°C.

2. ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE

2.1. Isolement et Identification des *E.coli*

Une fois au laboratoire, les échantillons recueillis ont été directement traités pour l'isolement et l'identification d'*E. coli*, selon le protocole décrit ci-après.

2.1.1. Isolement des souches

Pour chaque échantillon, le foie est retiré du pot puis sa surface est soigneusement flambée. A l'aide d'une pince et des ciseaux, l'organe est coupé finement en morceaux.

Pour isoler les *E.coli*, nous avons utilisé le milieu de culture Mac Conkey et le milieu EMB (milieu eosine bleu de méthylène). Sur le milieu Mac Conkey, on ensemence par la technique d'épuisement après avoir introduit, directement, une anse stérile dans les morceaux de foie. Les cultures sont incubées, à 37°C pendant 18 h à 24 h. A fin de purifier les souches isolées, les colonies présumées d'*E. coli* ont été prélevées, à partir de la gélose Mac Conkey, puis repiquées sur gélose EMB. Après incubation, à 37°C pendant 18 h à 24 h, les colonies présumées d'*E.coli* ont été étudiées.

2.1.2. Identification des *E.coli*

Les souches *E. coli* ont été identifiées par la coloration de Gram et l'étude biochimique.

2.1.2.1. Coloration de Gram

Cette coloration permet d'identifier les bactéries Gram⁺ et les bactéries Gram⁻. Sur une lame propre, on dépose une goutte d'eau et on étale une colonie bactérienne, à l'aide d'une anse de platine. Après une fixation à la chaleur, on réalise les étapes suivantes :

- Coloration au cristal violet, pendant 1 minute, puis rinçage à l'eau du robinet ;
- On fait réagir le lugol, pendant 20 secondes, puis on rince à l'eau ;
- Décoloration à l'alcool 90°, pendant 5 à 10 secondes, puis rinçage abondant à l'eau ;
- Recoloration à la fuschine, pendant 1 minute, rinçage à l'eau puis séchage de la lame ;
- Observation au microscope avec de l'huile à immersion.

2.1.2.2. Étude biochimique

Chaque culture pure a été soumise à une série de tests biochimiques : dans un premier temps un test d'orientation rapide puis par ensemencement sur une galerie miniaturisée.

A) Test d'orientation rapide

Avec une anse stérile, des souches présumées d'*E. coli* ont été prélevées de la gélose EMB et utilisées pour effectuer les tests suivants :

➤ Le test oxydase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram⁻. Il permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme respiratoire : la cytochrome oxydase.

Un disque pré-imprégné d'oxalate de diméthyl-para-phénylène diamine à 1% est mis dans 0,5 ml d'eau physiologique contenant les colonies bactériennes. Le tout est incubé à 37°C pendant 30 min. L'apparition d'une coloration violette sur le disque permet de confirmer que la bactérie est oxydase⁺ (possède la cytochrome oxydase). Dans le cas contraire, la bactérie est oxydase⁻.

➤ Gélose TSI

La gélose TSI (*Triple Sugar Iron*) permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.

L'ensemencement du milieu s'effectue, à l'aide d'une anse, par des stries serrées au niveau de la pente, suivi d'une piqure centrale profonde. Les tubes, bouchons desserrés, sont incubés à 37°C pendant 18-24h.

➤ Milieu urée-indole

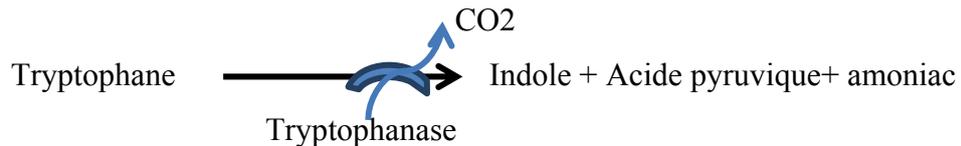
Le milieu urée-indole ou urée tryptophane a été utilisé pour mettre en évidence l'uréase et la production d'indole grâce à une tryptophanase.

- Recherche d'une uréase: c'est une enzyme qui hydrolyse l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniac, responsables de l'alcalinisation du milieu. L'enzyme est décelable par un indicateur colorée :



0,5 ml du milieu urée-indole est abondamment ensemencé avec la culture obtenue sur gélose EMB. Après 18h à 24h d'incubation à 37°C, la réaction est positive si la couleur vire au rouge violacé. Elle est considérée comme négative si la couleur reste inchangée (jaune).

- Recherche de la production d'indole: la tryptophanase bactérienne permet la dégradation du tryptophane présent dans le milieu urée-indole, en indole, pyruvate et amoniac



Quelques gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées au milieu urée-indole. La présence d'indole est révélée par la formation d'un anneau rouge à la surface du milieu.

B) Galerie biochimique miniaturisée

La galerie API 20E comporte 20 micro tubes contenant des substrats déshydratée. Ces substrats sont mis en solution par addition de la suspension bactérienne à identifier qui reconstitue les milieux. Les réactions produites, pendant la période d'incubation, se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (figure). Ces tests sont les suivants :

- ✓ -Test de la β -galactosidase (ONPG) ;
- ✓ -Test de lysine décarboxylase (LDC), ornithine decarboxylase (ODC) et de l'arginine dèshydrolase (ADH) ;
- ✓ -Test du citrate (CIT) ;
- ✓ -Test de la production d'hydrogène sulfuré (H_2S) ;
- ✓ -Test de l'urée (URE) ;
- ✓ -Test de la Tryptophane Désaminase (TDA) ;
- ✓ -Test de l'indole (IND) ;
- ✓ -Test de Voges-Pros kauer (VP)
- ✓ -Test de diffusion du pigment noir (GEL) ;
- ✓ -Pour les neuf tests restants de la galerie, ils concernent l'étude de l'acidification des glucides et dérivés : glucose, mannitol, inositol, sobitol, rhamnose, saccharose, melibiose, amygdaline et arabinose.

➤ **Ensemencement de la galerie**

• **Préparation de la galerie**

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

• **Préparation de l'inoculum**

Faire une suspension bactérienne, dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

• **Inoculation de la galerie**

Remplir les tubes et les cupules des tests: CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne. Remplir uniquement les tubes des autres tests. Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S, en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. Refermer la boîte d'incubation et mettre dans une étuve à 37°C, pendant 18h à 24 heures.

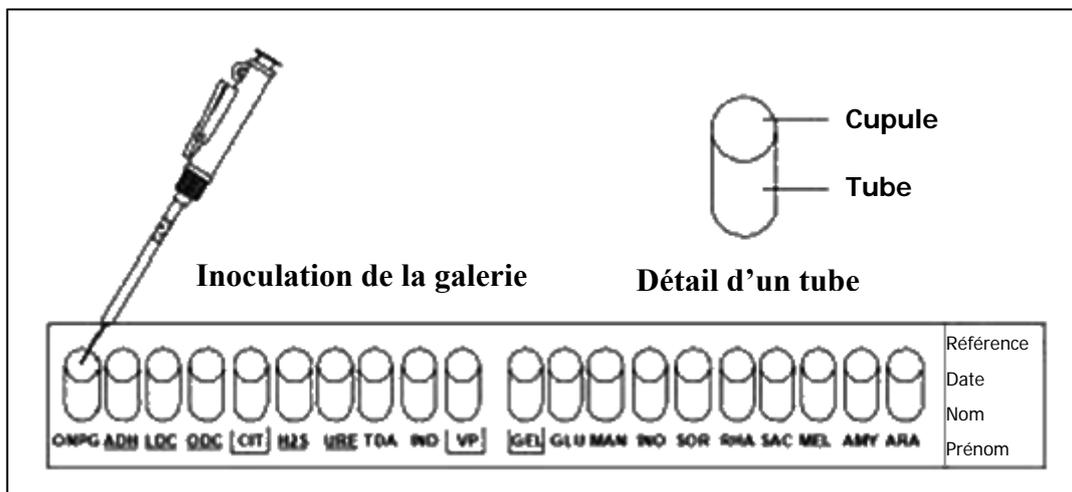


Figure 8 : Inoculation de la galerie API 20^E

• **Lecture**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture Tableau II.2. Il faut réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs.

Tableau 4 : Tableau de lecture de la galerie Api 20E

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	Beta-galactosidase	incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H₂S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/ fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / Immédiat	
			jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND / 2 mn, maxi	
			jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
Ox	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	Ox / 5-10 mn	
			incolore	Anneau violet
NO₃-NO₂	Tube GLU	Production de NO ₂	NIT 1 + NIT 2 / 2-3 mn	
			Jaune	Rouge
		Réduction au stade N ₂	Zn	
			Rouge	Jaune
MOB	Microscope	Mobilité	Immobile	Mobile
MAC	Milieu de MacConkey	Culture sur	Absence	Présence
OF	Glucose	Fermentation : sous huile Oxydation : à l'air	Vert	Jaune
			Vert	Jaune
CAT		Possession d'une catalase	H₂O₂ / 1-2 mn	
			Pas de bulles	Bulles

• **Identification**

Avec le tableau d'identification, on compare les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau. Avec le catalogue analytique, les tests sont regroupés en groupe de 3 et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner, à l'intérieur de chaque groupe, les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre de 7 chiffres, qui sert de code d'identification.

2.2. Conservation des souches

Toutes les souches identifiées *E. coli* ont été conservées de la façon suivante : à l'aide d'une pipette pasteur, plusieurs colonies sont raclées puis repiquées, dans des tubes contenant le milieu de conservation (Institut Pasteur) .Après une incubation de 24 h à 37°C, les tubes sont bien vissés puis conservés.

3. ÉTUDE SÉROLOGIQUE

Le sérotypage est déterminé par une réaction d'agglutination sur lame, en utilisant des sérums mono spécifiques (réactifs coagglutinés aviaires): O1, O2, O78 (Biovac, Angers, France) (Figure 10).



Figure 9: Sérum mono spécifique O1, O2 et O78 (Photo personnelle)

La technique consiste à incuber des colonies d'*E. coli* avec les sérums testés. Si la souche possède l'antigène correspondant à l'antisérum testé, il se forme des agglutinats visibles à l'œil nu (parfois plus visibles si on regarde la lame par dessous).

On dépose sur une lame en verre propre, une goutte du sérum à tester. À l'aide d'une anse de platine, nous avons prélevé 3 à 4 colonies de la souche bactérienne que nous avons mise en suspension dans la goutte (c'est la bactérie elle-même qui sert de révélateur). Nous avons ensuite étalé la goutte tout en agitant avec des petits mouvements la lame.

Technique de contrôle qualité

Pour le contrôle de la qualité des réactifs testés, nous avons procédé au protocole suivant : dans 30 µl d'eau physiologique, une goutte de chaque réactif utilisé a été ajoutée. La présence d'agglutination signifie que les réactifs sont de mauvaise qualité tandis qu'une

absence d'agglutination, les réactifs sont alors jugés de bonne qualité.

Contrôle de la souche:

30 μ l d'eau physiologique + 2-3 colonies si la souche est sur milieu solide

30 μ l d'eau physiologique + 30 μ l de suspension si la souche est en milieu liquide.

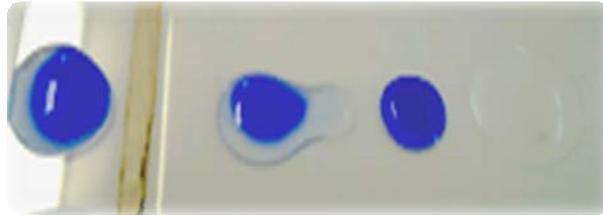


Figure : Contrôle de la souche (Photo personnelle)

• **Lecture**

L'évaluation qualitative de l'agglutination est: + (agglutination faible); ++ (agglutination moyenne); +++(agglutination forte). Une réaction est considérée positive à partir de ++.

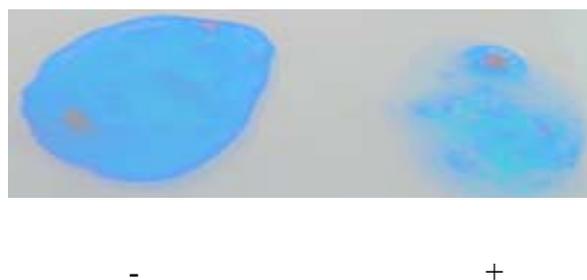


Figure : résultats d'agglutination

4. ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

La sensibilité est déterminée par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide (Müller-Hinton (MH), Institut Pasteur d'Algérie) selon les normes CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) recommandées par l'OMS et adoptées par le réseau national de surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques

Tableau 5 : Antibiotiques testés et leurs charges

Famille d'antibiotique	Antibiotique testé	Charge (ug/disque)	Sigle
Beta lactamines	Amoxicilline	10	AMX
	Ampicilline	25	AM
	Amoxicilline+acide clavulanique	10	AMC
	Cephalothine	30	KF
	Cefotaxime	30	CTX
Polypeptides	Colistine	30	CT
Sulfamides	Trimethoprim+sulfamethoxazole	23,7	SXT
Quinolones	Norfloxacin	30	NOR
	Acide nalidixique	30	NA
Tetracyclines	Tétracycline	10	TE
Phénicoles	Chloramphénicol	30	C
Furanes	Nitrofurane	30	F

● Protocole

Une suspension bactérienne est préparée à partir de quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques déchargées dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile (0,9%).

Cette suspension est ensuite bien homogénéisée. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland. La suspension peut être ajustée en ajoutant, soit de la culture si elle est trop faible ou de l'eau physiologique stérile si elle est trop forte.

L'ensemencement, sur de la gélose MH, est réalisée de la façon suivante : après avoir trempé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, on l'essore en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, séchée, de haut en bas, en stries serrées.

On répète l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. On finit l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

Les disques d'antibiotiques sont déposés sur la culture bactérienne de la façon suivante (Figure 10) : à l'aide de pinces bactériologiques stériles, on dispose chaque disque d'antibiotique en le pressant délicatement pour s'assurer de son application. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 18-24h.

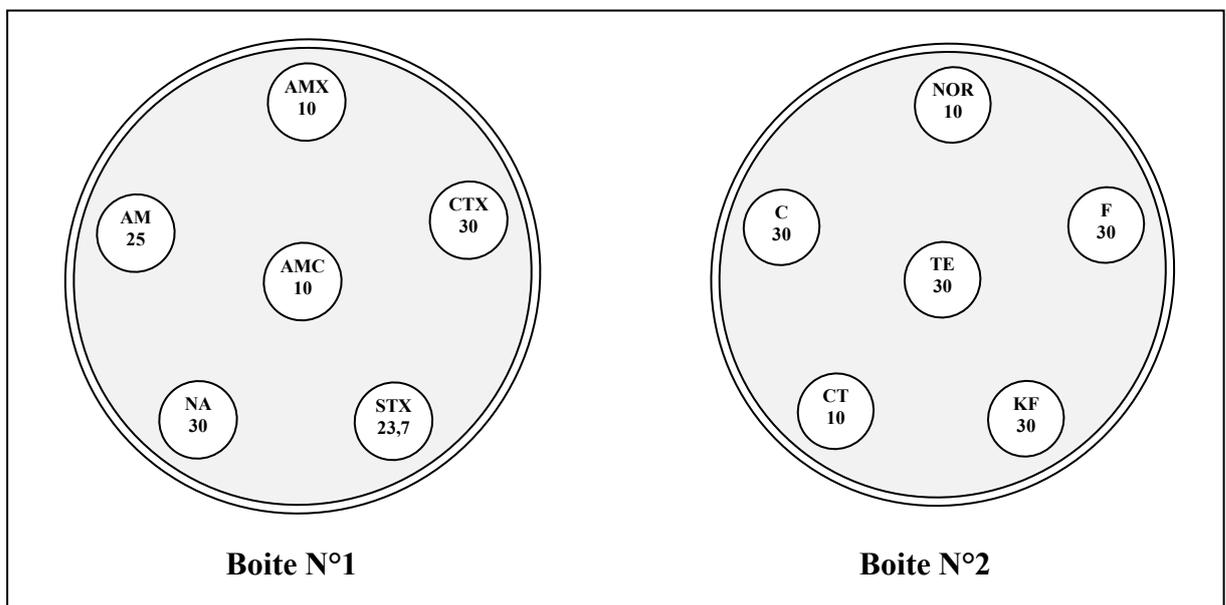


Figure 10 : Disposition des disques d'antibiotique par boîte de Pétri.

Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.

• **Lecture**

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en millimètres, à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée. Les résultats sont comparés aux valeurs critiques figurant dans le tableau de lecture de CA-SFM 2010 (Annexe).

5. RECHERCHE DES B-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI

Les β -lactamases à spectre élargi ou étendu désignent les enzymes « β -lactamases » produites par les entérobactéries. Ces enzymes codent pour la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et monobactam (aztreonam), mais n'ont aucune activité vis-à-vis des céphamycines (cefoxitine, moxalactam) ni des carbapénèmes (imipénème).

Méthode de détection

On a effectué deux tests : le teste de synergie et le test de confirmation

5.1. Test de synergie: (selon Jarlieret *al.*, 1988)

- ***Principe***

Les BLSE inactivent les Céphalosporines de 3^{ème} génération et sont sensibles aux inhibiteurs de β lactamases comme l'acide clavulanique. Ceci se traduit le plus souvent, sur l'antibiogramme, par une image de synergie caractéristique dite « en Bouchon de Champagne » entre un disque de C3G et un disque imprégné d'un inhibiteur de β -lactamase

- ***Technique***

La recherche de la β -lactamase à spectre élargi se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme : on dépose un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10 μ g), à 30 mm, centre à centre, d'un disque de C3G, la cefotaxime (CTX 30 μ g). On incube pendant 18 h, à 35 °C.

- ***Lecture***

La production d'enzyme se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques : Amoxicilline+ acide clavulanique et le cefotaxime.

5.2. Test de confirmation: technique du double disque

Ce test est réalisé systématiquement devant l'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G

• **Technique**

A partir d'une culture de 18 h, on prépare une suspension bactérienne d'une opacité égale à 0.5 Mc Farland, On ensemence, à l'aide d'écouvillonnage, la boîte de MH et on applique les disques d'antibiotiques de la façon suivante :

On dépose un disque d'AMC (20/10µg) et un disque de C3G (CTX 30µg), à une distance de 30mm (centre à centre). On laisse diffuser les antibiotiques, pendant une heure, à la température ambiante (sur la paillasse , la boîte sera déposée le couvercle vers le haut.). Après 1 h d'incubation, on ôte le disque d'AMC et on le remplace par un disque de CTX. On Incube la boîte à 35°C pendant 18 h.

• **Lecture**

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliqué après pré diffusion du disque de l'AMC est supérieur ou égal à 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de C3G.

RESULTATS

1. Isolement et Identification Dessouches *E. COLI*

Sur les 200 foies prélevés de poulets suspectés de colibacillose, nous avons isolé un total de 150 souches d'*E. coli*, ce qui représente une prévalence de 75%. Aucune souche d'*E. coli* n'a été isolée des 50 poulets. Sur les 07 régions étudiées, les prélèvements positifs ont une prévalence de +50%, majoritairement (Tableau 6).

Tableau 6 : Prévalence des *E. coli* chez les poulets prélevés

Région	Nombre de foies	Prélèvements positifs	Prévalence
Alger	23	23	100 %
Boumerdes	42	17	40.86 %
Bouire	39	29	74.36 %
BordjMnaiel	30	26	86.67%
Draa Benkhada	25	14	56%
Lakhdaria	19	19	100 %
TiziOuzou	22	22	100 %
Total	200	150	75 %

Les souches *E. coli* ont été isolées et identifiées grâce à leurs caractères morphologiques et biochimiques.

Caractères morphologiques

➤ À l'œil nu

Sur gélose Mac Conkey, les colonies d'*E. coli* sont apparues rondes, bombées, brillantes, à bord net, de 2 à 3 mm de diamètre, de couleur rose clair (lactose +) et entourées d'un halo opaque (la précipitation de sels biliaires). Plusieurs types différents de colonies Lactose+ et qui appartiennent d'après les tests biochimiques soit au genre *E. coli* ou à d'autres genres d'entérobactérie lactose+ tels que les autres coliformes (*Citrobacter*, *Enterobacter*). Sur gélose EMB, les colonies d'*E. coli* ont présenté les caractéristiques suivantes : couleur violet foncé; bombées, faiblement confluentes, de 2 à 3 mm de diamètre, à centre noir étendu à plus des 3/4 du diamètre et qui présentent un éclat métallique verdâtre en lumière réfléchie (Figure 11 et 12).



Figure11 :Colonies d'*E .coli*
sur gélose Mac conkey
(Photo personnelle)

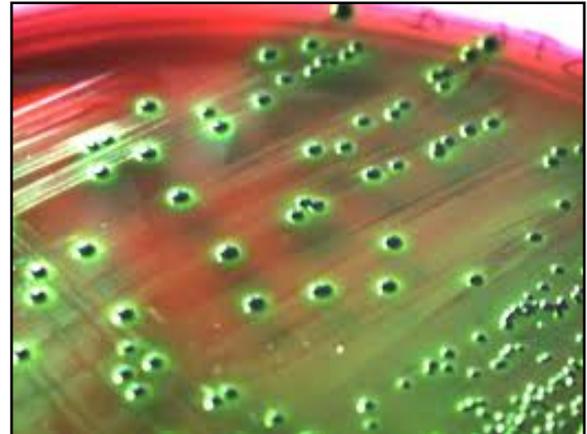


Figure 12 :Colonies d'*E .coli*
sur gélose EMB
(Photo personnelle)

➤ Sous microscope optique

L'identification est basée sur l'observation microscopique (1.000) de bacilles fins de $0,5\mu\text{m}$ de diamètre sur 2 à $3\mu\text{m}$ de long, dont la coloration de Gram est négative (Figure 13).

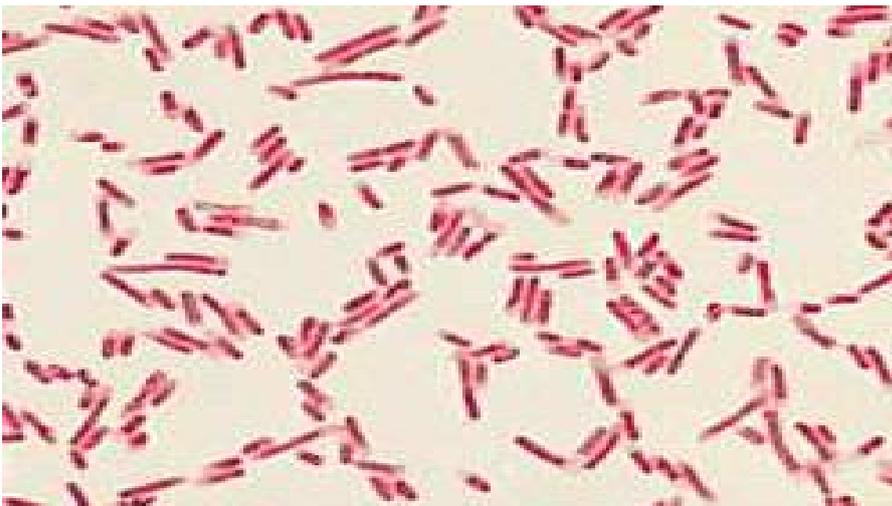


Figure 13 :Morphologie des bactéries *E.coli* à Gram⁻sous microscope(G 1000)

Profil biochimique

Les profils biochimiques d'*E.coli* isolées sont quasiment identiques, à savoir par :

➤ Le test d'orientation rapide

Le profil biochimique recherché est le suivant : oxydase⁻, H₂S⁻, Lactose⁺, glucose⁺, saccharose⁺, Gaz⁺, indole⁺ et urée⁻

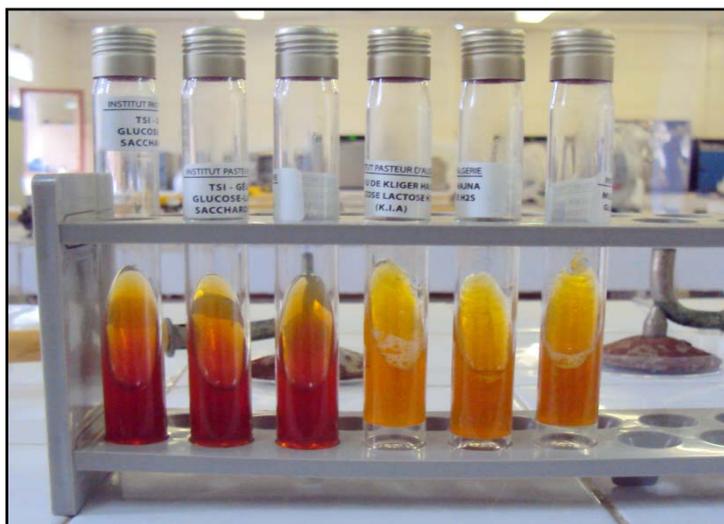


Figure 14: Tubes du milieu TS1 avant et après incubation (Photo personnelle)

➤ La galerie API20 E

Les souches identifiées comme *E. coli* ont présenté le phénotype ci-dessous



Figure 15 : Galerie API 20 E après inoculation (Photo personnelle)

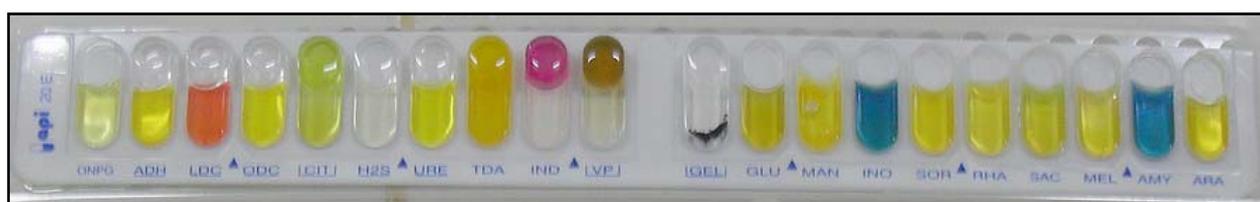


Figure 16 : Galerie API 20 E après incubation 18 h à 37°C et ajout des réactifs (Photo personnelle)

2. SÉROTYPAGE

Le résultat du sérotypage des 150 souches d'*E.coli* est représenté dans le tableau 7

Dans notre étude 53.3 % (80/150) des souches d'*E.coli* appartiennent aux sérotypes recherchés. Le sérotype dominant est le O78 (34/150 soit 22,7%), suivi du sérotype O2 (26/150 soit 17,3%) et O1 (20/150 soit 13,3%). Le pourcentage des souches non typables est de 46.7% soit (70/150) (Tableau ci-dessous). Ces trois sérogroupes ont été isolés dans les 07 régions d'où proviennent les poulets, à l'exception du sérotype O1, dans la région d'Alger. Le plus grand nombre de souches d'*E.coli* de sérotype O78 (12 souches) a été isolé dans la région d'Alger tandis que le sérotype O1 (6 souches) et O2 (9 souches), à Bordj Menaïel.

Tableau 7 : Sérotypage des souches *E. coli*

Région	Nombre de souches par sérotype			
	O1	O2	O78	NTP
Alger	0	1	12	10
Boumerdes	2	1	1	13
Bouire	2	4	8	15
BordjMnaïel	6	9	1	10
Draa Benkhada	3	3	1	7
Lakhdaria	2	4	5	8
TiziOuzou	5	4	6	7
Total	20 (13.3%)	26 (17,3%)	34 (22,7%)	70 (46,7%)

NTP: non typable

3. RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Les 150 souches d'*E.coli* ont été testées pour leur sensibilité aux 12 antibiotiques. Sur chaque antibiogramme et pour chaque antibiotique testé, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés. Les valeurs ont été comparées aux valeurs critiques de la souche *E. coli* ATCC 25922 (voir annexe) pour permettre de classer les bactéries dans l'une des catégories : Résistante (R), Intermédiaire (I) ou Sensible (S).

Sur les 1800 résultats, 1054 (59%) étaient résistants, 631 (35%) étaient sensibles et 115 (5%) étaient intermédiaires (Figure 17). On constate donc que c'est le phénotype résistant qui est le plus fréquent.

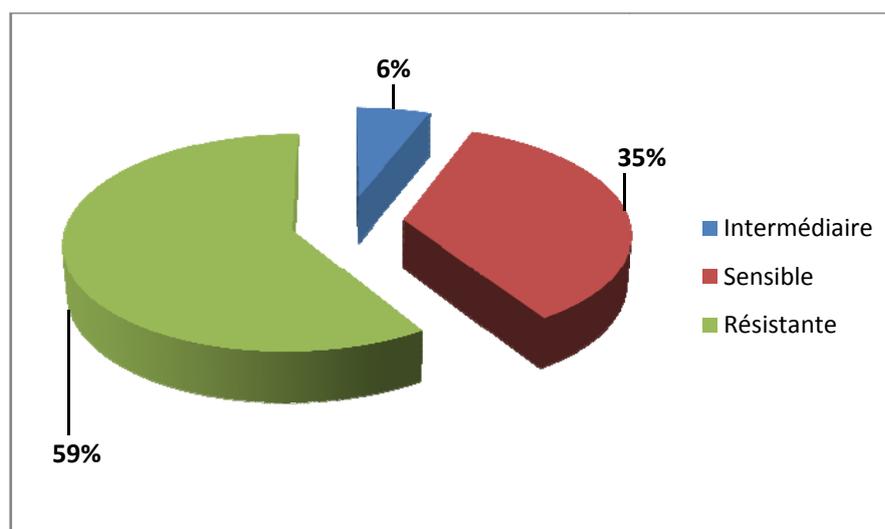


Figure 17 : Sensibilité global des souches *E.coli* aux antibiotiques testés

3.1. La résistance individuelle

Vis-à-vis de chaque antibiotique testé, le pourcentage de souches résistantes est présenté dans le tableau 8.

Tableau 8: Pourcentage de souches résistantes par antibiotique

Famille d'antibiotiques	Antibiotiques	Nombre de souches résistantes (%)
Beta lactamines :	- Amoxicilline	130 (86%)
	- Ampicilline	119 (79,3%)
Aminopenicillines	-Amoxicilline + acide clavulanique	83 (55,3%)
Cephalosporines	- Cefotaxime	13 (8,6%)
	- Cephalotine	143 (95,3 %)
Polypeptides	- Colistine	34 (22,6 %)
Sulfamides	- Trimethoprime+sulfamethoxazole	124 (82,6 %)
Quinolones	- Norfloxacin	36 (24 %)
	- Acide nalidixique	134 (89,33%)
Tétracyclines	- Tetracycline	139 (92,66%),
Phénicolés	- Chloramphenicol	62 (41,33%)
Furanes	- Nitrofuranes	37 (24,66%)

Le groupe I : comprend les antibiotiques pour lesquels de très hauts niveaux de résistance sont relevés (de 70 à 100%). Ces antibiotiques par ordre décroissant sont : l'acéphenalotine avec un taux de résistance (95,3%), la tétracycline (92.66%), l'acide nalidixique (89.33%), l'amoxicilline (86%), la triméthoprime+sulfaméthoxazole (82,6%) et l'ampicilline (79.3%)

Le groupe II comprend les antibiotiques pour lesquels des niveaux moyens de résistance de (30 à 70%) sont observés. Ce sont l'amoxicilline+ acide clavulanique avec un taux de (55.3%) et le chloramphenicol avec un taux de (41.33%).

Le groupe III comprend les antibiotiques pour lesquels des niveaux bas de résistance ont été observés (0 à 30%). Il s'agit des nitrofuranes (24.66%), la norfloxacine (24%), la colistine (22.6%) et la cefotaxime (8.6%).

3.2. La multi résistance

Si on s'intéresse aux profils de résistance des 150 souches pour les 12 antibiotiques, on constate que toutes les souches sont multirésistantes. Le profil le plus courant est une résistance à 6 antibiotiques (38/150 soit 25%) suivi d'une résistance à 8 antibiotiques (35/150 soit 23%), d'une résistance à 7 antibiotiques (33/150 soit 22%), d'une résistance à 9 antibiotiques (14/150 soit 9%), d'une résistance à 5 antibiotiques (11/150 soit 7%), d'une résistance à 10 antibiotiques (10/150 soit 7%) et d'une résistance à 3 antibiotiques (4/150 soit 3%). On constate donc que toutes les bactéries résistent au moins à 3 antibiotiques mais qu'aucune bactérie ne résiste à plus de 10 antibiotiques sur les 12 testés (Figure 18).

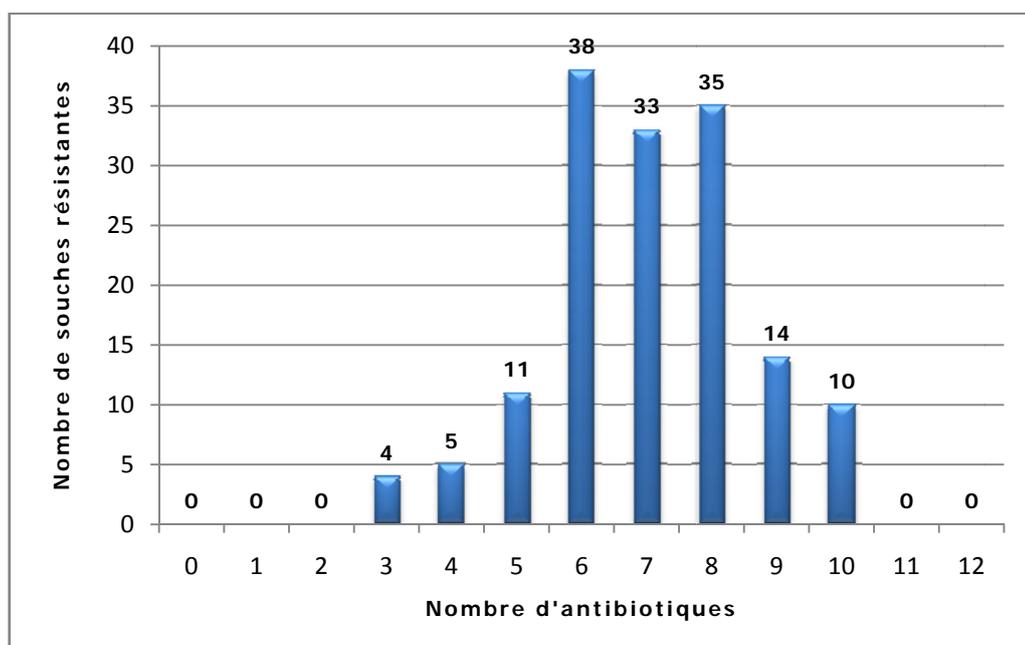


Figure 18 :Fréquence des multirésistances des *E.coli*.

Nous avons ensuite étudié les associations entre les résistances (tableau 9) par un test statistique d'indépendance (CHI carré).

Tableau 9: Étude de l'association entre les résistances

AM	AMC	CTX	KF	SXT	CT	NA	F	C	TE	NOR	
26,6 SS	9 NS	2 NS	2,29 NS	2 NS	7,36 NS	1,14 NS	19,2 SS	15,98 SS	1,8 NS	1,14 NS	AMX
	6 NS	3,7 NS	1,91 NS	4,49 NS	1,53 NS	1,75 NS	14,18 SS	10,22 S	3,1 NS	1,85 NS	AM
		1,7 NS	5,84 NS	4,64 NS	9,32 NS	7,7 NS	13,50 SS	8,02 NS	3,84 NS	6,08 NS	AMC
			0,7 NS	0,89 NS	0,56 NS	1,06 NS	0,06 NS	0,4 NS	1,13 NS	1,28 NS	CTX
				1,54 NS	5,44 NS	0,88 NS	10,16 S	23,76 SS	0,58 NS	4,2 NS	KF
					4,55 NS	23,5 SS	4,74 NS	4,49 NS	1,48 NS	2,78 NS	SXT
						0,79 NS	7,81 NS	9,28 NS	2,58 NS	1,21 NS	CT
							4,88 NS	12,38 S	39,3 SS	1,61 NS	NA
								7,15 NS	4,35 NS	7,61 NS	F
									2,65 NS	2,66 NS	C
										5,45 NS	TE

Les chiffres correspondent à la valeur du chi carré.

NS. Non significatif ($p > 0,05$), S : significatif ($p < 0,05$), SS : très significatif ($p < 0,01$).

On constate que la résistance à l'amoxicilline est liée à la résistance à l'ampicilline, le nitrofurane-et le chloramphénicol. La résistance à l'ampicilline est liée à la résistance à la nitrofurane et au chloramphénicol. La résistance à l'amoxicilline et l'acide clavulanique est liée à la résistance au nitrofurane. La résistance à la céphalothine est liée à la résistance à la nitrofurane et à la résistance au chloramphénicol. La résistance à la combinaison SXT est liée à la résistance à l'acide nalidixique. La résistance à l'acide nalidixique est liée à la résistance au chloramphénicol et à la tétracycline. Aucune autre association n'est significative.

Sur la base des résultats des antibiogrammes, on peut tenter d'établir un degré de parenté entre les souches en comparant leurs profils de résistance. Si on réalise une telle analyse, on constate que les 150 souches se répartissent en 106 résistotypes différents soit un polymorphisme de (70,7%).

3.3. Association entre les sérotypes et l'antibiorésistance

Tableau 10: Sérotype et antibiorésistance

Antibiotiques	Nombre de souches résistantes			
	O78	O2	O1	Autres sérotypes
Amoxicilline	32	23	16	59
Ampicilline	26	24	18	51
Amoxicilline +acide clavulanique	12	19	11	41
Cefotaxime	0	1	1	11
Cephalotine	32	25	19	67
Colistine	23	3	2	6
Sulfamides	27	24	17	56
Noroflaxacine	12	7	5	12
Acide nalidixique	33	24	16	61
Tétracycline	34	23	17	65
Chloramphénicol	8	12	12	30
Nitrofurane	13	5	2	17

L'étude de l'association entre le sérotype et les profils de résistance aux antibiotiques des différentes souches par un test d'indépendance (Chi carré) n'a permis que de mettre une légère association ($p < 0,05$) entre le sérotype et la résistance à la cefotaxime.

Le test d'indépendance est un test global, pour avoir une image plus précise, nous avons réalisé une analyse des correspondances multiples (ACM) (figure 19). Le sérotype O78 et la sensibilité à l'amoxicilline + acide clavulanique semble associé ainsi que le sérotype O1 et les phénotypes suivants : résistance à l'ampicilline, résistance à l'amoxicilline, résistance à la céphalothine et sensibilité à la cefatoxime.

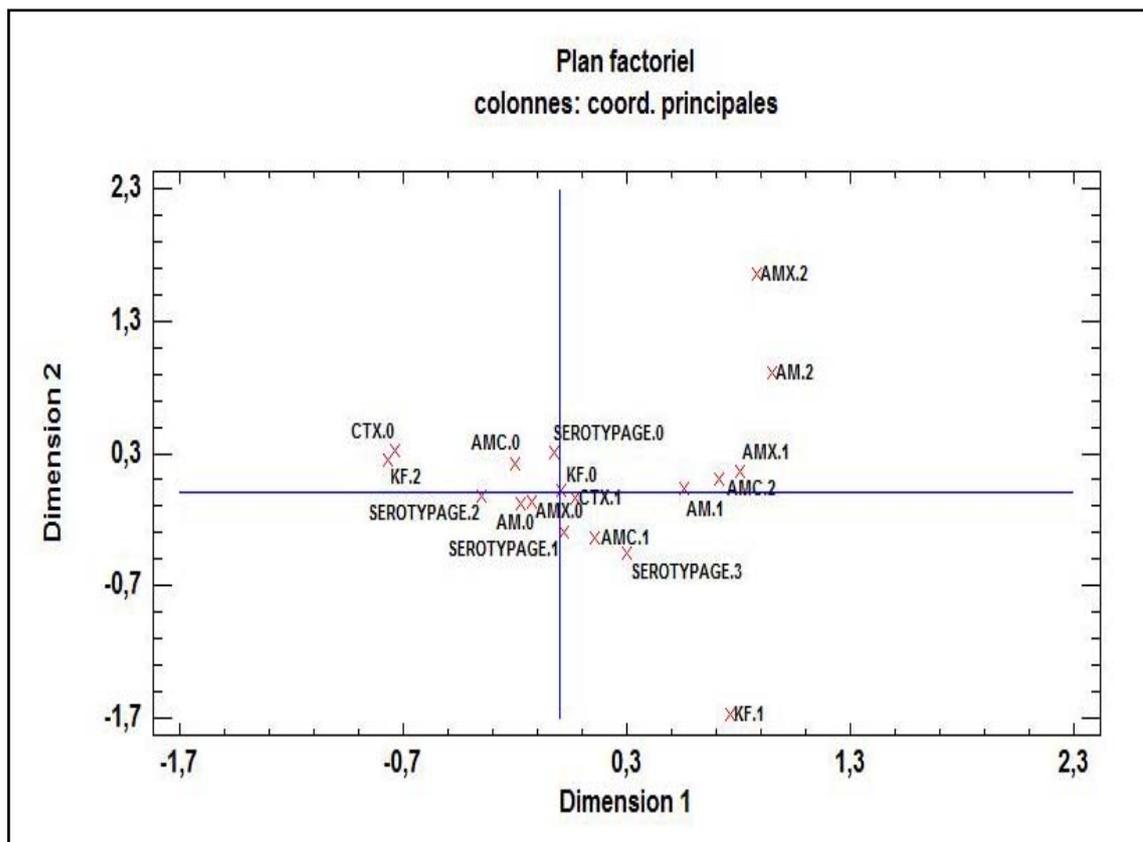


Figure 19 : Analyse des correspondances multiples entre le sérotype et la résistance aux différents bêta-lactamines.

3.4. La recherche des BLSE

Sur les 150 souches testées, 13 (8,7%) étaient résistantes à la céfotaxime (C3G) avec un diamètre (≤ 27 mm) et sont donc suspectées de produire des BLSE. Sur les 13 souches qui sont résistantes à la céfotaxime, 11 souches sont non typables : une seule souche appartient au sérotype O1 ou O2. Aucune souche n'appartient au sérotype O78

Sur les 13 souches, la détection des BLSE a été réalisée en associant 02 tests : le test de synergie et le test de confirmation (Tableau 11).

Tableau 11: Détection des BLSE

N° de la souche	Test de Synergie	Test de confirmation
2	+	+
3	+	-
4	+	-
5	+	-
6	+	+
7	-	-
25	+	+
28	-	-
31	-	-
43	+	-
111	-	-
112	-	-
137	+	+

Les résultats montrent que sur les 13 souches, 08 souches sont positives au test de synergie. En associant le test de synergie et de confirmation (figures 20 et 21), 04 souches de notre collection d'*E. coli* (n°2, 6, 25 et la 137) sont positives aux 02 tests. Par ailleurs, ces 04 souches sont résistantes à l'amoxicilline et l'ampicilline, sensibles à l'association (amoxicilline + acide clavulanique) et sont résistantes à une C1G (la céphalotine). Ces résultats préliminaires indiquent que ces 04 souches pourraient donc être productrices de BLSE. Ces 04 souches n'appartiennent à aucun des 03 sérogroupes recherchés, dans notre étude.



Figure 20 :Résultats de l'antibiogramme
(Photo personnelle)



Figure 21:Résultat du test double disque
(Photo personnelle)

DISCUSSION

1. PRÉVALENCE DES *E COLI*

Les résultats de notre étude montrent que sur les foies prélevés de 200 sujets suspectés de colibacillose, au moins une souche d'*Ecoli* a été isolée de 150 sujets en provenance des 07 régions étudiées, ce qui représente une prévalence de (75%). Cette forte prévalence peut être expliquée par le fait que la population ciblée était une population à risque puisque nous nous sommes intéressés qu'à des animaux malades chez lesquels on suspectait une colibacillose. En effet, les sujets présentaient soit des lésions caractéristiques de colibacillose ou bien été retirés de la chaîne d'abattage pour retard de croissance. Sur 50 sujets, les prélèvements étaient négatifs pour *E. coli* et donc undiagnostic différentiel avec la colibacillose s'impose dans ce cas.

2. LE SEROTYPAGE

Des études précédentes (Dozoiset *et al.*, 1992 ; Dho-moulin et Faribrother, 1999) ont indiqué que les sérotypes les plus fréquemment rencontrés chez les APEC sont les sérotypes O1, O2 et O78. Les résultats de notre étude nous indiquent que (53,3%) des souches *E. coli* appartiennent à l'un de ces trois sérogroupes. Ces sérogroupes ont été retrouvés dans les 07 régions d'où provenaient les poulets, à l'exception du O1 dans la région d'Alger. Le nombre de poulets qui n'est pas représentatif de la région d'Alger explique vraisemblablement ce résultat. Nos résultats sont presque similaires à ceux d'une étude réalisée dans la région ouest d'Algérie (Tiaret et Tlemcen) avec un taux de 52% (Aggad *et al.*, 2010). Par contre, une autre étude effectuée à Tiaret, Mostaganem et Oran a rapporté un taux nettement plus élevé de l'ordre de 82% (Hammoudi et Aggad, 2008).

Parmi ces 3 sérogroupes, le sérotype dominant est le O78 (22,7%), suivi du sérotype O2 (17,3%) et O1 (13,3%). Nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par Aggad *et al.*, 2010 avec des taux de 21% pour O78, 16% pour O2 et enfin 15% pour O1 sur 100 souches d'*E.coli* isolées d'organes différents. Hammoudi et Aggad, (2008), ont obtenu les pourcentages suivants: 44% (O78), 29% (O2) et 9% (O1). Dozoiset *al* (1992) ont montré que sur les 112 isolats d'*E. coli*, les sérogroupes O78 (52%) et O1 (6%) étaient les plus fréquents. En revanche, Blanco *et al* (1998) ont montré que sur 625 souches, (5,4%) d'isolats appartenaient au sérotype O2, (3,2%), au sérotype O78 et (2,08%) au sérotype O1.

Dans notre étude, 46% des *E. coli* sont non typables et donc appartiennent à des sérogroupes différents de ceux testés et certains peuvent être pathogènes. En effet, une étude chinoise a indiqué que d'autres sérogroupes ont été caractérisés chez les APEC comme O5, O6, O8, O16, O17, O19; O25, O36, O103, O119, O120, O141, O157, O163 et O167 (Zhao *et al.*, 2010).

Les sérogroupes des APEC sont divers et variés. Les souches APEC ne sont pas clonales et donc ce n'est pas la même souche qui cause des ravages dans les élevages comme le confirme les études de détermination des pathotypes ou des génotypes (Stordeuret *al.*, 2003 ; Zahoet *al.*, 2010). Ce polymorphisme parmi les souches APEC est également confirmé dans notre étude par la présence d'un nombre très important de résistotypes différents (106) et donc un degré de polymorphisme important (plus de 70%).

Cette diversité pourrait être due aussi à l'aspect opportuniste des infections par les APEC. Les souches APEC présentes dans l'intestin de l'animal profitent d'une infection primaire (Mycoplasmes, virus, ...) et d'une immunité diminuée pour franchir la barrière intestinale et devenir des germes invasifs pouvant alors coloniser des organes profonds comme le foie. Il est d'ailleurs connu que la plupart des APEC produisent des sidérophores (Stordeuret *al.*, 2003, Onse et al, 2007) ce qui est une caractéristique des bactéries invasives et surtout septicémiques. Dans ce contexte, c'est la bactérie la plus apte qui causera l'infection quelque soit son sérotype. Ceci nécessite de la part de la souche APEC de posséder une batterie de gènes de virulence suffisante pour lui permettre de devenir invasive (Stordeuret *al.*, 2003).

3. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Sur l'ensemble des antibiogrammes réalisés, le phénotype résistant est dominant avec une prévalence de (59%). A l'heure actuelle, le traitement de la colibacillose repose essentiellement sur l'antibiothérapie. Les antibiotiques les plus utilisés sont les bêta lactamines, les quinolones et les sulfamides. Dans notre étude, la prévalence de (59%) de souches résistantes peut être expliqué par l'utilisation abusive et anarchique des antibiotiques, sur le terrain, qui conduit à la sélection de souches bactériennes résistantes par élimination de la population sensible et l'émergence de souches résistantes (Boues et Loisol, 1998; Sanders, 2005).

3.1. LES BÉTA LACTAMINES

- L'amoxicilline et l'ampicilline

Les 2 molécules testées sont l'amoxicilline et l'ampicilline avec un niveau de résistance respectivement de (86%) et (79,3%). Autre fois, ces 2 antibiotiques étaient les molécules les plus utilisées dans le traitement des infections causées par *E. coli*, ce qui explique que de nos jours, la sensibilité de cette bactérie, à ces deux molécules, a beaucoup diminué. En Algérie, des études ont été menées dans les régions du Centre (Bouzagh, 2010) et de l'Est (Messai et al (2011) d'Algérie. Les résultats obtenus concordent avec ceux de notre étude : dans la région Centre, les taux sont de l'ordre de (84,3 %) et de (76%) pour l'amoxicilline et l'ampicilline et, dans la région Est, de l'ordre de (84%) et de (87%) respectivement. Divers mécanismes de résistance des *E. coli* vis-à-vis de ces molécules ont été décrits : par imperméabilisation, par altération des PLP ou par production de β -lactamases.

- Les céphalosporines

Les 2 molécules testées sont la cephalothine et la céfotaxime pour la recherche des BLSE.

La cefotaxime (C3G) est efficace sur les souches testées avec un taux de résistance de (8,6%) contrairement à la cephalothine (C1G) avec un taux de (95,3%) sur les 150 souches. La résistance bactérienne la plus faible a été observée vis à vis de la cefotaxime. Dans une première étude chinoise, seulement 3% des souches sont résistantes à cette molécule (Zhao et al. 2005). Dans une autre étude menée en Chine, (11,5%) des souches collectées, entre 2004 et 2007, se sont montrées résistantes à la céfotaxime (Li et al., 2010). La C1G, la cephalothine, semble peu efficace contre les souches isolées par contre la C3G reste efficace pour les combattre. Cependant, les antibiotiques représentés par les C3G jouent un rôle important dans le traitement des infections invasives graves en médecine humaine, d'où leur importance dans le domaine de la santé publique (Paterson et Bonomo, 2005). Les cas de résistance contre les C3G sont de plus en plus fréquents en médecine humaine et vétérinaire. La résistance acquise d'*E. coli* aux céphalosporines, par la production de BLSE, est présente chez toutes les espèces animales mais a subi une nette augmentation dans les élevages intensifs de poulets de chair, à travers le monde (Bortolai et al., 2010). La prévalence des BLSE étaient de 3,6% pour des *E. coli* isolés de matières fécales chez des poulets prélevés dans des abattoirs en Grande Bretagne (Randall et al., 2011). Sur des poulets importés au Royaume-Uni, 7,6% étaient porteurs d'*E. coli* BLSE positives (Dhanji et al., 2010).

En Chine, les APEC productrices de BLSE ont émergé, à partir de 2004, pour atteindre (18,5%) chez les souches isolées entre 2004 et 2007 (Li *et al.*, 2010).

Dans notre étude, les 13 souches résistantes à la céfotaxime ont été soumises au test de synergie et de confirmation pour la détection des BLSE. Les résultats préliminaires ont montré que 04 souches pourraient être productrices de BLSE. En effet, le profil de résistance doit être aussi déterminé vis-à-vis des monobactams (aztreonam), et la sensibilité vis-à-vis des céphamycines et aux carbapénèmes. En effet, la synthèse d'une BLSE par une entérobactérie confère à celle-ci une résistance croisée à toutes les bêta lactamines sauf les céphamycines et les carbapénèmes.

Les *E. coli* résistantes aux céphalosporines peuvent être transmises du poulet à l'homme non seulement par contact direct entre l'animal et l'homme, mais aussi indirectement via la consommation de viande de poulets ou par contact avec, des eaux de surface ou des légumes qui ont été contaminés à partir du poulet comme réservoir (Van den Bogaard *et al.*, 1999 en Blake *et al.*, 2003).

Vu que les gènes codant pour la résistance BLSE sont situés sur des éléments génétiques mobiles (Thomson et Moland, 2000), il est possible que la transmission de la résistance aux céphalosporines ait lieu, à partir des *E. coli* résistantes aux céphalosporines ingérées vers les bactéries commensales et pathogènes humaines après passage par l'humain. Une étude néerlandaise de Leverstein-van Hall *et al.* (2011) a démontré que les *E. coli* résistantes aux céphalosporines présentes chez les volailles vivantes, sur la viande de poulet et chez l'homme, contiennent en grande partie les mêmes gènes de résistance BLSE.

3.2. LES POLYPEPTIDES

La molécule testée est la colistine. Le taux de résistance vis-à-vis de la colistine est de 22,6%. C'est l'une des molécules vis-à-vis de laquelle un bas niveau de résistance a été observé. Un bas niveau de résistance a aussi été rapporté par Bouzagh (2010), entre 14 et 16% , dans le centre d'Algérie, et des pourcentages plus faibles, 6%, 3%, 5% et 0% ont été enregistrés par Blanco *et al* (1997), en Espagne, Hammoudi et Aggad (2008), Zharaei et FarashiBonab (2006), en Iran, et Messai *et al* (2011).

Le faible taux de résistance vis-à-vis de la colistine peut être expliqué par l'utilisation modérée de cette molécule, en élevage avicole. Ce polypeptide a une activité élevée contre la plupart des bactéries Gram⁻.

Par ailleurs, la colistine n'est pas absorbée par l'intestin et donc elle est inactive *per os* sur les colibacilles systémiques. Elle est utilisée en association avec les bêta lactamines car cette association procure un effet synergique et peut aider à la maîtrise des colibacilles pathogènes respiratoires encore en situation intestinales.

3.3.LES TETRACYCLINES

Concernant la tétracycline, notre étude révèle 92,6% de souches résistantes à cette molécule. C'est l'un des taux de résistance les plus élevés et qui concordent avec les résultats obtenus par Filali et *al* (1989) de l'ordre de 82%, Amar et *al* (1994) avec un taux de 75% , Messai et *al* (2011) avec un taux de 98,3% et Salehi et *al* (2006) avec 94%. Cette grande résistance peut être expliquée par le fait que les tétracyclines représentent la plus ancienne molécule utilisée en thérapie, à titre préventif ou en tant que facteur de croissance. De plus, la de larges gammes de génériques sont disponibles sur le marché algérien, à des prix abordables

3.4.LES SULFAMIDES

Dans notre étude, le taux de résistance à l'association triméthoprime+sulfaméthoxazole est élevé soit de l'ordre de 82,6%. Ce résultat est proche de ceux obtenus, en Iran, par ZharaeiSalehi et Frashi (2006) qui obtiennent 80%, en Algérie, par Messai et *al* (2011) avec un taux de 82% et Ahmed Ammar (2009) avec un taux de 70%, Saberfar et *al* (2008) et Yang et *al* (2004) avec des taux respectifs de 72% et 70%. En revanche, nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par Hammoudi et Aggad (2008), Filali et *al* (1988) et Blanco et *al* avec des taux de 42%, 58% et 63% respectivement.

En élevage aviaire, cet anti infectieux est très souvent prescrit dans la prévention contre les salmonelles et lors de coccidioses. Cette molécule est utilisée quasi systématiquement en association avec des anti-coccidiens dans le traitement et la prévention, conduisant ainsi à son inefficacité contre les colibacilles

3.5.LES PHENICOLES ET LES FURANES

Nous avons enregistré un taux de résistance anormalement élevé vis-à-vis du chloramphénicol (41.3%) et le nitrofurane (24%). Pour le chloramphénicol, ce résultat est comparable à celui obtenu par Saberfar et *al* (2008) avec 52% de souches résistantes, et par Messai (2011) avec un taux de 45%.

Par ailleurs, des niveaux de résistance plus bas ont été enregistrés par Zhao et al (2005), Kim et al (2007) et Bloncko et al (1997) avec des taux de l'ordre de 11%, 9% et 8%. Pour le nitrofurane, le taux enregistré, dans notre étude, est similaire à ceux rapportés par Bouzagh (2010) avec (21%) de souches résistantes et Messai et al (2011), avec un taux de (18%).

Le chloramphénicol et le nitrofurane sont des molécules suspendues d'homologation et donc ne sont plus disponibles sur le marché officiel et sont interdites d'utilisation chez les animaux de rente. Ils ont été testés dans notre étude, dans le cadre de l'épidémiologie de surveillance. Les résultats que nous avons obtenus pourraient indiquer une résistance acquise antérieure ou une utilisation illégale de ces molécules

3.6. LES QUINOLONES

Deux molécules appartenant à cette famille d'antibiotiques ont été testées dans cette étude: l'acide nalidixique qui est l'archétype des quinolones et la norfloxacine qui est une fluoroquinolone.

Dans notre étude, le taux de résistance à l'acide nalidixique est de (89,3%) alors qu'il n'est que de (24%) pour la norfloxacine. Dans l'étude de Zhao et collaborateur (2005), le taux de résistance à l'acide nalidixique est de 59% alors que le taux de résistance à la ciprofloxacine (une autre fluoroquinolone proche de la norfloxacine) est de 3%. Dans une étude horizontale, menée dans différents pays, les taux de résistance aux fluoroquinolones chez *E. coli* isolés de poulets variaient de 0% dans une étude canadienne à 53% dans une étude espagnole (Harada et Asai, 2010).

L'acide nalidixique est utilisé depuis de nombreuses années alors que les fluoroquinolones sont d'usage plus récent. C'est d'ailleurs pour faire face à la résistance de plus en plus importante à l'acide nalidixique que les fluoroquinolones ont été créées. Le mécanisme de résistance implique principalement des mutations dans le gène *gyrA* de l'ADN gyrase. La résistance aux fluoroquinolones implique des mutations non seulement dans le gène *gyrA* mais aussi dans les gènes *gyrB* et *gyrC*, et donc elle est plus difficile à acquérir.

3.7. LA MULTIRÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Dans notre étude, les 150 souches d'*E. coli* (100%) isolées sont multi résistantes. Il n'existe aucune bactérie qui ne soit résistante qu'à un seul antibiotique. Elles résistent au moins à 3 antibiotiques et au maximum à 10 antibiotiques. Le profil le plus courant est une résistance à 06 antibiotiques chez 38 souches (25%).

En comparant les profils de résistance des souches, on constate que les 150 souches se répartissent en 106 résistotypes différents soit un polymorphisme de 70,7%.

Des études rapportent que les souches *E. coli* aviaires ont été identifiées chez d'autres souches *E. coli* isolées d'autres animaux et chez l'homme. De ce fait, les souches *E. coli* aviaires peuvent être une source potentielle de transmission de gènes qui codent aussi pour la résistance aux antibiotiques. Van Den Boggard et al, (2001) ont isolé des souches *E. coli* chez les humains qui travaillent en promiscuité avec les oiseaux, exprimant les mêmes antibiotypes que les souches aviaires. Ceci indique que la transmission de la résistance des souches aviaires aux souches humaines est possible. La multirésistance aux antibiotiques présente un risque majeur pour l'élevage avicole et la santé humaine (échecs thérapeutiques). En effet, une classe d'antibiotiques, à laquelle, une bactérie est résistante pourra conférer à une autre bactérie une résistance à des classes d'antibiotiques non reliées, engendrant ainsi un large phénotype de résistance. Ces souches peuvent transférer leur large phénotype d'antibiorésistance par transmission verticale à leur descendance et par transmission horizontale, à des espèces différentes de bactéries, permettant ainsi la diffusion de différents profils.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'isoler des *E. coli* du foie de 150 poulets sur 200 sujets suspectés de colibacillose. La majorité (53,3%) des *E. coli* isolées appartient aux sérogroupes pathogènes classiques des APEC à savoir O1, O2 et O78. L'appartenance à ces sérotypes reconnus comme pathogènes et la recherche des facteurs de virulence pourra confirmer le diagnostic de la colibacillose.

L'étude du profil de résistance aux antibiotiques de ces souches a permis de montrer que l'ensemble des souches étaient multirésistantes avec une résistance à au moins trois antibiotiques différents. De plus, la présence de phénotype de résistance à des molécules à usage humain comme la cephalothine et la cefotaxime est préoccupante. En effet, 96% des souches de notre collection semblent avoir acquis le gène de résistance à la céphalothine et 2,6% des souches seraient productrices de BLSE.

L'utilisation intensive d'antibiotiques, dans les élevages de poulets, conduit à maintenir une pression de sélection importante en faveur de la prolifération de souches d'*E. coli* multirésistantes. De plus, étant donné que de nombreux gènes de résistance sont portés par des éléments génétiques mobiles comme les plasmides et les transposons, il est probable que ces résistances puissent se transmettre de souche à souche.

L'usage ciblé et parcimonieux des antibiotiques doit permettre de réduire le taux de résistance parmi les souches bactériennes d'origine vétérinaire permettant de garantir leur efficacité, à long terme, sous peine de se trouver face à des germes qu'on ne pourra plus combattre par l'antibiothérapie. Par ailleurs, étant donné que certaines *E. coli* sont aussi des agents zoonotiques, il est possible que ces résistances se retrouvent chez l'homme et se transmettent aux bactéries de l'homme rendant l'éradication des souches pathogènes et principalement, en milieu hospitalier, de plus en plus problématique.

A

Acar J, Rostel B (2001) Antimicrobial resistance: an overview. *Rev.Sci. Tech.*, **20** (3), 797-810.

AFSSA, 2006. Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*, 214p.

Aggad H., Ahmed Ammar Y., Hammoudi A., Kihal M., 2010. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis. *Global Veterinaria* 4 (3): 303-306.

Avril J. L., Monteil H., Dobernath H., Denis F., 2009. Bactériologie Clinique. Édition ELLIPSE: 171, 172, 175, 208, 294, 295.

B

Bains, B.S. (1979). A Manual of Poultry Diseases. Roche Publishing, Switzerland. 6- Barrow, G.I.; Feltham, R.K.A. (1993). Cowan. and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd Edition. Cambridge University Press. , New York, USA.

Beraud R., Del Castillo J., Huneault L., 2001. Problématique de l'antibiorésistance, *Le Point Vétérinaire*, 187, 27-32.

Blanco JE., Blanco M., Mora A., Jansen WH., Garcia V., Vasquez ML., Blanco J., 1998. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Vet Microbiol* 61:229—235.

Bories G., Louisot P., 1998. Rapport concernant l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation animale. Février 1998.

Bouzagh T., 2010. Étude rétrospective sur l'évolution du microbisme (*Escherichia coli* et *Salmonella*) dans la filière chair dans la région du centre de l'Algérie, Thèse de magistère, École Nationale Supérieure Vétérinaire, 198 pages.

Brisabois A., 2001. Intérêt et limites des techniques de caractérisation des *Salmonella*. *Epidémiologie et Santé Animale*. 39, pp. 31- 42.

C

Carman R. J., Woodburn M. A., 2001. Effects of low levels of ciprofloxacin on a chemostat model of the human colonic microflora. *Regul Toxicol Pharmacol* 33:276-84.

Carratala, J., A. Fernandez-Sevilla, F. Tubau, M. A. Dominguez, and F. Gudiol.

1996. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in fecal flora of cancer patients receiving norfloxacin prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:503-5.

Chanteloup N.K., Dho M., Esnault E., Bree A, Lafont J., 1991. Serological conservation and location of the adhesion of avian *Escherichia Coli* type 1 Fimbriae. *Microb.Patho.*, 10: 271 – 280.

Cohen N., Ennaji H., Hassar M., Karib H., 2006. The Bacterial quality of red meat and offal in Casablanca (Morocco). *Mol.Nutr.FoodRes.* 50:557-562.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM) Antibiogramme Vétérinaire, Recommandation 2010. 50 pages. URL : <http://www.sfm.asso.fr/> (page consultée le 12/09/2010).

Corpet, D. E., S. Lumeau, and F. Corpet. 1989. Minimum antibiotic levels for selecting a resistance plasmid in a gnotobiotic animal model. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:535-40.

Courvalin P., Philippon A. 1989- Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens. Page :332-355- *Bactériologie médicale*, édition : Leminor Léon et Véron Michel.

Courvalin P., Trieu-cuot P. 1989- Plasmides et transposons de résistance aux antibiotiques. Page : 316-326.- *Bactériologie médicale*, édition : Leminor Léon et Véron Michel.

D

Dhanjia, Michel Doumitha, Olivier Clermontb, Erick Denamurb, Russell Hopea, David M. Livermorea, Neil Woodforda., 2010 :Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* and its CTX-M-15-like extended-spectrum β -lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36 (2010) 355–358.

Dho M., Lafont J.P., 1984. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and non-lethal for chicks. *Avian Dis.*, 28, 1016-1025.

Dho-Moulin M .. 1993A. *nn.Méd.Vét.* 137.3 53-57.

Dho-Moulin, M. et J. M. Fairbrother, 1999. *Vet. Res.* (30), 299-316.

Dozois CM., Fairbrother JM., Harel J., Bosse M., 1992. Pap- and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect. Immun.* **60**, 2648-56.

Dozois CM., Chanteloup N., Dho-Moulin M., Bree A., Desautels C., Fairbrother JM., 1994: Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (Type 1) fimbrial antigens in chicken experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **38**, 231-239.

Dozois CM., Pourbakhsh SA., Fairbrother JM., 1995: Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet. Microbiol.* **45**, 297-309.

Duval J., Soussy C.J. 1990- Antibiothérapie. Masson, 4ème édition.

E

Elfadil AA., Vaillancourt JP., Meek AH., Julian RJ., Gyles CL., 1996: Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. *Avian Dis.* **40**, 690-698.

Ellis M.G., Arp I.H., Lamont S.J., 1988 : Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. *Am. J. Vet. Res.*, **49**, 2034-2037.

Emeryd.A., Nagaraja K.V., Shawd.P., Newman J.A., White D.G., 1992 : Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis.*, **36**, 504-511.

Escherich T., 1885: Die Darmbacterium des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte der Medizin.* **3**:515.

F

Farmer JJ., 3rd, Davis BR., Hichman-Brenner FW., McWhorter A., Huntley-Carter GP., Asbury MA., Riddle C, Wathen-Grady HG., Elias C, Fanning GR., 1985: Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* **21**, 46-76.

Filali, E., Bell, J.G., Houad®, M.E.I., Huggens, M.B., Cook, J.K., 1988. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* strain isolated from chickens with colisepticemia in Morocco. *Comp. Immun. Microbial. Infect. Dis.* **11**, 121±124.

G

Gomis-Yagües, V., Boluda-Botella, N. and Ruiz-Beviá, F., 2000. Gypsum precipitation as an explanation of the decrease of sulfate concentration during seawater intrusion. *J. of Hydrol.*, **228**, 48-55.

Grimont, P. A. D., 1987 : Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect*:6-10.

Gross W.B., Calnekb.W., Barnes H.J., BEARD C.W., Reidw.M., 1991: Colibacillosis. Disease of poultry 9th ed .Anes: Iowa state University Press. **1991**, 138 – 144.

Gross WG: Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. **In: Gyles CL., 1994:** *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Oxon. Cab international: Wallingford, p 237-259.

H

Hammoudi A., Aggad H., 2008: Antibioresistance of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Colibacillosis in Western Algeria *Turk. J. Vet. Anim. Sei.* 32(2), 123-126.

Harada, K., Asai, T., 2010 : Role of Antimicrobial Selective Pressure and Secondary Factors on Antimicrobial Resistance Prevalence in *Escherichia coli* from Food-Producing Animals in Japan. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.*

J

Jeffrey, J. S., L. K. Nolan, K. H. Tonooka, S. Wolfe, C. W. Gidding, S. M. Horne, S. L. -- Foley, A. M. Lynne, J. O. Ebert, L. M. Elijah, G. Bjorklund, S. J. Pfaff-McDonough, R. S. Singer, C. Doetkott (2002): Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Dis.* 46, 48-52.

Jordan FTW., Pattison M., 1996: Poultry diseases. W. B. Saunders Company: London, 38-43.

Julian Davies et Didier Mazel., 1997 : Comment la résistance vient aux bactéries, *Biofutur* 170, septembre, pages 14 à 17.

K

Kall Weiss., 2002 : La résistance bactérienne, extrait de *Le médecin du Québec*, volume 37, numéro 3, mars, pages 41 à 47.

Kim TE., Jeong YW., Cho SH., Kim SJ., Kwon HJ., 2007: Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3309-3315.

Kaper JB. Pathogenic *Escherichia coli* (Editorial). *IJMM* 2005; 295: 355-356. **STORDEUR, P and MAINIL, J (2002)** La colibacillose aviaire. *Annales de Médecine Vétérinaire* **146:** 11-18.

L

Lafont J.P., Dho M., D'hauteville H.M., Bree A., Sansonetti P.J., 1987: Presence and expression of aerobactin genes in virulent strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 55, 193-197.

Lecoanet., 1992: Colibacilloses aviaires. Dans manuel de pathologie aviaire, imprimerie du cercle des élèves de l'école vétérinaire d'Alford .Ed par J.BRUGERE PICOUX et A. SLIM.: 237 – 240.

Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, Platteel T, Fluit AC, van de Sande-Bruinsma N, Scharinga J, Bonten MJM, Mevius DJ., 2011: Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology and Infection* ,Epub.

Lin Li a,b,1, Zhi-Gang Jiang a,1, Li-NingXiaa,c, Jian-ZhongShen a, Lei Dai a, Yang Wanga, Si-Yang Huang a, Cong-Ming Wua., 2010 :Characterization of antimicrobialresistance and molecuларdeterminantsof beta-lactamase in Escherichia coli isolatedfromchickens in China during 1970–2007. *VeterinaryMicrobiology*144 ,505–510.

Livermore DM 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *ClinMicrobiol Rev* 8: 557-584.

M

Maillard R.,2002 : Antibiothérapie respiratoire*La Dépêche Vétérinaire*, 80, p15-17

Mainil J., Jacquemin E., Oswald E. 2003: Prevalence and identity of cdt-relatedsequences in necrotoxicogenic Escherichia coli. *Vet. Microbiol.*,94, 159-165.

Marina Julienne et Denis Sergent., 1998 : Résistance aux antibiotiques: l'état d'urgence, *Eurêka* n°31, Mai, pages 18 à 23.

Matagye , A, Lamotte-Brasseur J. J-M. Frère .1998. Catalyticpropertiers of class A, B-Lactamases : efficiency and diversity .*Biochem . J.*, 330 : 581-598.

Messai, C., Khelef, D., Boukhors, K.T., Adjou, K and Goucem, R ., 2011 : Antibiorésistance de souches *E.coli*isolées de poulets de chair atteints de colibacillose, à l'abattoir avicole de Sétif. *Pratique Vétérinaire Mars-Avril*: 2-7.

Mogenet L., Bezille P.,Guyonnet J. etKarembe H .,1997: Comparaison de la flumequine [flumisol] à l'Amoxicilline [Vetromoxin: poudre orale] dans deux modes d'administration par voie orale en traitement de la colibacillose du poulet approche pharmaco dynamique et clinique. *Rev. Med. Vet.*, 148, 10: 793 – 804.

Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Extensive genediversity in septicemic *E. coli*strains.*J ClinMicrobiol.* 2005 Jan;43(1):66-73.

Molbak K., Scheutz F. Verocytotoxin-producing *E. coli* and otherdiarrhoeagenic*E. coli* In: World Health Organisation. *Waterborne Zoonoses*. J.A. COTRUVO, A. DUFOUR,G. REES,

et al. Londre: IWA Publishing. Pages 213-237. Egalement disponible en ligne: http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/zoonoses.pdf : 231-245.

N

Nakamura K., Cook JK., Frazier JA., Narita M., 1992: Escherichia coli multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with infectious bronchitis virus and/or Escherichia coli. *Avian Dis*, **36**, 881-890.

O

Oyetunde O.O.F, Thomson R.G., Carlson H.C., 1978: Aerosol exposure of ammonia, dust and Escherichia coli in broiler chickens. *Can. Vet. J.*, **19**, 187-193.

P

Pakpinyo, S., D. H. Ley, H. J. Barnes, J. P. Vaillancourt, and J. S. Guy. 2002. Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in naturally occurring cases of poult enteritis-mortality syndrome. *Avian Dis*. **46**:360–369.

Parreira VR., Yano T., 1998: Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS). *Vet Microbiol*, **62**. 111-119.

Paterson, D. L., and Bonomo, R. A., 2005: Extended spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews.*, **18**, 657-86.

Perry J.J., Staley J.T et Lory S. 2004 : Microbiologie. Edition Dunod. Paris. 891p.

Pourbakhsh SA., Boulianne M., Martineau-Doize B., Dozois CM., Desautels C, Fairbrother JM., 1997b : Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Dis* **41**, 221-233.

Provence DL., Curtiss III R., 1994: Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun*, **1369-1380**.

Q

Qin, X., Y. Razia, J. R. Johnson, J. R. Stapp, D. R. Boster, T. Tsosie, D. L. Smith, C. R. Braden, K. Gay, F. J. Angulo, and P. I. Tarr. 2006. Ciprofloxacin-resistant gram-negative bacilli in the fecal microflora of children. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3325-9.

R

Randal C.J., Meakins P.A., Harris M.P and Watt D.J.: A new skin diseases in broilers. Vet. Rec. 1984: 114 – 146.

Robineau B., MoalicPY., 2010: Une maladie d'actualité en production aviaire: La colibacillose. *Bull AcadVétb'rcmce*, tome **163** - n°3.

Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson et L. K. Nolan, 2005, Vet. Res. (36), 241-56.

S

Saberfar E, Pourakbari B., Chabokdavan K., TajDolatshahi F, 2008: Antimicrobialsusceptibilityof Escherichia coli isolatedfromIranianbroilerchickenflocks, 2005-2006. J ApplPoult Res. 17,302-304.

SalehiT.,FarashiBonab S., 2006: Antibioticssusceptibility pattern of *Escherichiacolistrains*isolatedfromchickenswith coli septicemia in Tabriz Province, Iran. International Journal of Poultry Science 5 (7): 677-684.

Salvadori MR., Yano T., Carvalho HF., Parreirav R., Gyles CL., 2001: Vacuolatingcytotoxinproduced by avianpathogenic Escherichia coli. *Avian Dis.* **45**, 43-51.

Sanders P., 2005: L'aaitibiorcsistancce en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale. Bull. Acad. Vét. France. Tome 158 -№2, 137 -143.

Schwarz, S., and E. Chalus-Dancla. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *VetRes***32**:201-25.

Singleton, P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et la biotechnologie. Paris : Ed. Dunod.

Sojka WJ., Carnaghan RB A., 1961: Escherichia coli infection in poultry". Res. Vet. Sci. 2.340-353.

Souillard, R., J.-Y. Toux, L. B. S. et V. Michel, 2006, Sciences et Techniques Avicoles (57), 14-22 Wang, Y., S. H. Huang, C. A. Wass, M. F. Stins et K. S. Kim, 1999, Infect. Immun. (67), 4751-6.

Soulsby, L. 2007. Antimicrobials and animal health: afascinatingnexus. J AntimicrobChemother**60 Suppl 1**:i77-8.

Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Vétérinaire à l'Echelle Nationale, selon les recommandations de L'OMS, 4 e m e édition, 2008.

Stordeur P., Beaupain N., Mainil J., 2003 : Caractérisation génotypique de souches invasives aviaires d'*Escherichia coli* isolées en Belgique. *Ann MédVét*, **147**, 275-280.

Stordeur P., Beaupain N., Mainil J., 2003 : Caractérisation génotypique de souches invasives aviaires d'*Escherichia coli* isolées en Belgique. *Ann MédVét*, **147**, 275-280.

Stordeur P., mainil J., 2002 : La colibacillose aviaire. *Ann MédVét*, **146**, 11-18.

Stordeur P., Marlier D., Blanco J., Oswald E., Biet F., Dho-Moulin M, Mainil J., 2002: Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Vet Microbiol*, **84**, 231- 241.

Stuart B Levy., 1989 :Le paradoxe des antibiotiques: Comment le miracle tue le miracle, édition Belin,.

T

Thomson KS en Moland ES. Version 2000: the new β -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes and Infection*, 2000; 2:1225-1235.

V

Valvano, Jim; Kirkpatrick, Curry (1992). *Valvano: They Gave Me a Lifetime Contract, and Then They Declared Me Dead.* New York, NY: Pocket Books.

Van Den Bogaard AE., London N., Driessen C ,Stobberingh EE., 2001: Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry fanners and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemothe.*, **47**, 763-771.

W

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor.1990 :Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In D. G. M. Innis, J. Sninsky, and T. White [eds.], *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 315–322. Academic Press, San Diego, CA.

Z

Zhao S., Maurer JJ., Hubert S., De Villena JF., McDermott PF., Meng J., Ayers S., English L, White DG., 2005: Antimicrobialsusceptibility and molecularcharacterization ofavianpathogenic Escherichia coli isolates. VetMicrobiol. 107,215-224.

(<http://www.bacteriologie.net/generale/resistanceantibiotiques.html>)

<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrechr/ecolishig/fram-ecolishig146pathogenes.html> [page consultée le 14/09/2005].

ANNEXE 1

COMPOSITION DES MILIEUX DE CLUTURE UTILISÉS

1) Milieux d'isolement :

A- Gélose de Glucose- Lactose- Saccharose- H₂S / TSI (TRIPLE SUGAR IRON) :

La gélose TSI est un milieu d'identification rapide pour les entérobactéries, il permet de mettre en évidence la dégradation du glucose (avec ou sans production de gaz), du lactose, du saccharose et la production d'H₂S.

Composition :

• Peptone de viande	15g
• Proteose peptone	5g
• Extrait de viande	3g
• Extrait de levure	3g
• Glucose	1g
• Saccharose	10g
• Lactose	10g
• Citrate de fer ammoniacal	0,3g
• NaCl	5g
• Thiosulfate de sodium	0,3g
• Rouge de phénol	0,05g
• Agar	18g
• Eau distillée	1 L
• pH	7,4

B- Gélose Mac Conkey:

Milieu d'isolement des entérobactéries et permet la différenciation des bactéries lactose +, l'aspect des colonies d'*E. coli* sont rouges ou rose, pas mucoïde peut-être ronde avec un précipité opaque de sels biliaires.

Composition :

• Gelysate	17g
• Polypeptone	3g
• Lactose	10g
• Sels biliaires	5g
• Chlorure de sodium	5g
• Gélose	12,5g
• Rouge neutre	0,04
• pH	7,4

ANNEXE 1 (Suite)

C- Milieu Urée- Indole :

Composition :

- L-tryptophane 3g
- Phosphate dipotassique 1g
- Phosphate monopotassique 1g
- NaCl 5g
- Urée 20g
- Rouge de phénol 2,5g
- Eau distillée 1 L
- pH 6,7

D- BH1B (Brain Heart Infusion Broth) :

Milieu d'enrichissement pour les *E. coli*. Institut Pasteur d'Algérie composé de :

- Cœur de bœuf 5g
- Cerveau de veau 12,5g
- Glucose 2g
- Peptone 10g
- Chlorure de sodium 5g
- Sodium Dihydrogénophosphate 2,5g
- Eau distillée 1 L
- pH 7,4

2) Milieu pour antibiogramme :

Ø Mueller Hinton :

Utilisé pour l'étude de la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes.

Composition :

- Extrait de viande 3g
- Hydrolysate Acide de Caséine 17,5g
- Amidon 1,5g
- Agar 16g
- Eau distillée 1 L
- pH 7,3

ANNEXE 2

MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS



Gélose Mueller Hinton
(photo personnelle)



Gélose Mac-Conkey
(photo personnelle)



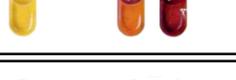
Gélose de Glucose- Lactose- Saccharose
(photo personnelle)



Milieu Urée- Indole
(photo personnelle)

ANNEXE 3

INTERPRÉTATION DES TESTS BIOCHIMIQUES D'UNE GALERIE API20E ET R• ACTIFS UTILISÉS

<p>ONPG - BETA GALACTOSIDASE Sous l'action d'une galactosidase, l'ONPG (orthonitrophényl-D galactopyranoside) incolore est hydrolysé et libère de l'orthonitrophénol de couleur jaune.</p>	
<p>ADH - ARGININE DIHYDROLASE La dégradation de l'arginine donne des dérivés aminés ou de l'ammoniaque entrainant une alcalinisation du milieu qui se traduit par le virage à l'orange ou au rouge de l'indicateur de pH (rouge de phénol).</p>	
<p>LDC - LYSINE DECARBOXYLASE La dégradation de la lysine donne de la cadavérine entrainant une alcalinisation du milieu qui se traduit par le virage à l'orange ou au rouge de l'indicateur de pH (rouge de phénol).</p>	
<p>ODC - ORNITHINE DECARBOXYLASE La dégradation de l'ornithine donne de la putrescine entrainant une alcalinisation du milieu qui se traduit par le virage à l'orange ou au rouge de l'indicateur de pH (rouge de phénol).</p>	
<p>CIT - CITRATE DE SIMMONS L'utilisation du citrate comme seule source de carbone entraine une alcalinisation du milieu de culture, soit un virage au bleu-vert de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol) préférentiellement dans la zone aérobie.</p>	
<p>H₂S - FORMATION DE H₂S La réduction des composés soufrés du milieu entraine la formation de H₂S qui donne un précipité noir en présence de sel de fer.</p>	
<p>URE - UREASE IFERGUSONI L'hydrolyse de l'urée donne de l'ammoniaque entrainant une alcalinisation du milieu qui se traduit par le virage au rouge de l'indicateur de pH (rouge de phénol).</p>	
<p>TDA - TRYPTOPHANE DESAMINASE La désamination oxydative du tryptophane (mise en jeu par la même enzyme que pour la phénylalanine: APP) produit l'acide indolpyruvique qui donne une coloration brun-rouge avec le chlorure ferrique (réactif TDA).</p>	
<p>IND - INDOLE Sous l'action d'une tryptophanase, le tryptophane est transformé en indole qui donne une coloration violette avec le réactif de Kovacs (réactif IND).</p>	
<p>VP - ACÉTOINE (ACÉTYL METHYL CARBINOL) La production d'acétoïne à partir de l'acide pyruvique est mise en évidence en milieu alcalin (réactif VP1) en présence de naphтол (réactif VP2). L'acétoïne donne dans ces conditions une coloration rose à rouge.</p>	
<p>GEL - PROTEOLYSE DE LA GELATINE La protéolyse de la gélatine de Kohn libère un pigment noir qui diffuse dans le tube.</p>	
<p>GLU - GLUCOSE</p>	
<p>MAN - MANNITOL INO - INOSITOL SOR - SORBITOL RHA - RHAMNOSE</p>	<p>SAC - SACCHAROSE MEL - MELIBIOSE AMY - AMYGDALINE ARA - L (+) ARABINOSE</p>
<p>L'utilisation de ces glucides entrains une acidification du milieu qui se traduit par le virage au jaune de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol).</p>	
<p>OX - CYTOCHROME OXYDASE La cytochrome oxydase entraine la formation d'un complexe violet avec la tétraméthylparaphénylène diamine (réactif OX) dans le tube ONPG ou H₂S.</p>	
<p>NIT - FORMATION DE NITRITES Sous l'action d'une nitrate-réductase, les nitrates présents dans le tube GLU sont réduits en nitrites mis en évidence par le réactif de Griess (réactifs NIT1 et NIT2) qui donne une coloration rouge.</p>	
<p>N₂ - FORMATION D'AZOTE Il y a transformation des nitrates en azote si la réaction de Griess reste négative après addition d'un peu de poudre de zinc dans le tube GLU, une fois la recherche de la formation de nitrates effectuée.</p>	
<p>GAZ - FORMATION DE GAZ Lors de l'utilisation des glucides, la production de gaz se traduit par la formation de bulles.</p>	
<p>N.B. Dans le tube GLU, la production de gaz à partir du glucose est inhibée par la présence de nitrate, par contre, on peut parfois observer la présence de bulles d'azote obtenue par réduction complète du nitrate.</p>	
<p>CAT - CATALASE La présence d'une catalase se traduit par la formation de bulles dans un des tubes positifs de glucose après addition d'une goutte d'eau oxygénée à 1,5%.</p>	



ANNEXE 4

Tableau 13 :

Un contrôle de qualité interne doit être organisé pour s'assurer de la validité des résultats obtenus. Les souches de référence recommandées sont les suivantes: *Staphylococcus aureus* CIP76.25(ATCC25923), *Escherichia coli* CIP76.24(ATCC25922), *Streptococcus uberis* CIP103219(ATCC19436) et *Pasteurella multocida* CIP103286(ATCC43137).

Tableau I – Limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) obtenus par diffusion en gélose (moyennes +/- 1 écart-type calculé sur un minimum de 600 tests)

Antibiotiques	Charge du disque	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP76.25	<i>Escherichia coli</i> CIP76.24	<i>Streptococcus uberis</i> CIP103219	<i>Pasteurella multocida</i> CIP103286
Pénicilline G	6µg(10UI)	35-40		35-40	
Oxacilline	5µg			30-38	
Amoxicilline	25µg		22-27		31-37
Amoxicilline+Ac.clavulanique	20/10µg		22-26		31-37
Céfalotine	30µg		18-22		
Céfoxitine	30µg	28-33	25-31		28-34
Ceftiofur	30µg		27-32	35-40	33-40
Céfuroxime	30µg		24-28		
Céfopérazone	30µg				
Céfalexine	30µg			31-37	
Gentamicine	500µg			23-29	
Gentamicine	15µg(10UI)	26-31	23-29		
Kanamycine	30µg	23-27	19-25		
Neomycine	30µg	24-28	19-25		
Acidénalidixique	30µg		24-29		
Enrofloxacin	5µg		30-37		30-36
Marbofloxacin	5µg	26-31			30-36
Triméthoprime+Sulfaméthoxazole	1,25/23,75µg	26-30	24-28	20-25	
Erythromycine	15µg	26-31		28-34	
Spiramycine	100µg	23-28		28-33	
Tylosine	30µg	21-25		22-27	
Tilmicosine	15µg				16-23
Lincomycine	15µg	27-32		30-37	
Florfenicol	30µg		22-26		30-36
Tétracycline	30µg	27-32		25-31	24-30
Acide oxolinique	10µg				23-30

ANNEXE 5

Tableau 14 : –Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative en médecine vétérinaire pour *Enterobacteriaceae*.

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Remarques
		S	R	S	R	
Amoxicilline	25µg	•4	>16	•21	<14	
Amoxicilline/ac.clavulanique	20/10µg	•4/2	>16/8	•21	<14	
Céfalexine	30µg	•8	>32	•18	<12	Sicéfalexine<12mm:recherche debêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) et de céphalosporinase haut niveau.
Ceftiofur	30µg	•2	>4	•21	<18	<p>BLSE: Amoxicilline-R, Amox+clav.-S-I-R, Céfalexine-I-R, Céfoxitine-S, Ceftiofur-S-I-R, Cefquinome-S-I-R Observation d'une synergie en "bouchon de champagne" entre le disque d'amoxicilline+ac.clavulanique et le disque de ceftiofur ou d'une autre C3G/C4G.</p> <p>Céphalosporinase haut-niveau: Amoxicilline-R, Amox+clav.-R, Céfalexine-R, Céfoxitine-R, Ceftiofur-I-R, Cefquinome-S-I Pas de synergie en "bouchon de champagne".</p> <p>Cf. règles (1) et (2)</p>
Céfopérazone	30µg	•4	>32	•21	<14	
Cefquinome	30µg	•2	>4	•22	<19	
Céfoxitine	30µg	•8	>32	•22	<15	Cette molécule n'est pas disponible en médecine vétérinaire et n'est donc pas concernée par la règle (1). Son utilisation dans les antibiogrammes permet d'affiner la détection des souches possédant une BLSE ou une céphalosporinase haut niveau.
Gentamicine	15µg (10UI)	•2	>4	•18	<16	
Kanamycine	30UI	•8	>16	•17	<15	
Néomycine	30UI	•8	>16	•17	<15	
Streptomycine	10UI	•8	>16	•15	<13	

(1) En cas de mise en évidence d'une **BLSE**, la souche doit être considérée comme résistante à toutes les bêta-lactamines disponibles en médecine vétérinaire, à l'exception de l'association amoxicilline-acide clavulanique. Pour cet antibiotique, le résultat brut (S, I ou R) n'est pas soumis à cette règle d'interprétation. Néanmoins, l'efficacité *in vivo* de l'amoxicilline-acide clavulanique sur une souche possédant une BLSE n'est pas documentée en médecine vétérinaire.

(2) En cas de mise en évidence d'une **céphalosporinase haut-niveau**, la souche doit être considérée comme résistante à toutes les bêta-lactamines disponibles en médecine vétérinaire.

ANNEXE 6

Tableau 15 :

<i>Réactifs Coagulinés</i>	
Conditions deconservation desréactifs	Les réactifs doivent être conservés impérativement à +4°C jusqu'à leur date de péremption indiquée sur chaque flacon compte-goutte. Ils ne doivent pas être congelés (Azoture de sodium : 0,5 %0).
Présentation dessouches à tester	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> : • partir de colonies fraîches sur boîtes de Pétri pour le mélange. • partir d'une suspension dense (DO à 580 nm comprise entre 1,4 et 1,8) et fraîche (- de 12 h) pour les réactifs individuels. Dans le cas d'éventuelles réactions croisées, diluer la suspension bactérienne au demi puis au quart et considérer que le sérotype de la souche est celui pour lequel la réaction d'agglutination apparaît en premier. · <i>Escherichia coli</i> : • partir de colonies fraîches sur boîtes de Pétri. Dans le cas d'éventuelles réactions croisées, effectuer le test à partir d'une suspension dense (DO à 580 nm comprise entre 1,4 et 1,8 ou EMF = 3) et tester les suspensions diluées au demi puis au quart. · <i>Streptococcus</i> : • partir de colonies fraîches sur boîtes de Pétri. Dans le cas d'éventuelles réactions croisées, effectuer le test à partir d'une suspension dense (DO à 580 nm comprise entre 1,4 et 1,8 ou EMF = 3) et tester les suspensions diluées au demi puis au quart. · <i>Autres</i> : • partir de colonies fraîches sur boîtes de Pétri.
Réalisation Témoins	<p>Après agitation énergique du réactif, mettre en contact, sur une lame, une goutte de réactif avec 3-4 colonies de la souche à tester ou une goutte de réactif avec 30 µl d'eau de suspension dense de la souche à tester.</p> <p>Réaliser deux témoins :</p> <ul style="list-style-type: none"> • contrôle réactif : 30 µl d'eau physiologique+ une goutte de réactif à chaque utilisation du réactif, • contrôle souche : 30 µl d'eau physiologique + 2-3 colonies si la souche est sur milieu solide ou 30 µl d'eau physiologique + 30 µl de suspension si la souche est en milieu liquide.
Lecture Interprétation desrésultats	<p>Apparition d'agglutinats en 30 secondes d'agitation si le test est réalisé avec des colonies et en 2 minutes si le test est réalisé avec des suspensions. Si le test est réalisé avec des suspensions diluées, le délai d'apparition des agglutinats peut être plus long. <i>L'évaluation qualitative de l'agglutination est de 1 à 3 +.</i></p> <p><i>Une réaction est considérée positive à partir de 2 +.</i></p> <p>Le sérotype de la souche testée est celui pour lequel des agglutinats apparaissent. En cas de réactions croisées, le sérotype de la souche correspond à celui pour lequel les agglutinats apparaissent en premier.</p>

ANNEXE 7

RESULTATS

SOUCHES	AMX	AM	AMC	CTX	KF	STX	CT	NA	F	C	TE	NOR	SEROTYPAGE	BLSE	TDD	ORIGINE
1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	Bouira
2	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	2	1	Bouira
3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	2	0	Bouira
4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	2	0	Bouira
5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	0	Bouira
6	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	2	1	Bouira
7	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	1	2	0	Bouira
8	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	Bouira
9	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	Bouira
10	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	3	0	0	Tizi-Ouzou
11	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	3	0	0	Tizi-Ouzou
12	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	2	0	0	Tizi-Ouzou
13	1	1	1	1	0	1	2	0	1	0	0	0	3	1	1	Tizi-Ouzou
14	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	2	1	1	Tizi-Ouzou
15	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	Tizi-Ouzou
16	0	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	1	2	0	0	Tizi-Ouzou
17	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	Tizi-Ouzou
18	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	Tizi-Ouzou
19	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	Tizi-Ouzou
20	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	0	Tizi-Ouzou
21	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	Tizi-Ouzou
22	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	2	0	0	Alger
23	0	0	0	1	0	1	1	0	2	1	0	1	3	0	0	Alger
24	0	0	0	1	0	1	1	0	2	1	0	1	0	0	0	Alger
25	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	2	0	2	1	Alger

ANNEXE 7

RESULTATS

SOUCHES	AMX	AM	AMC	CTX	KF	STX	CT	NA	F	C	TE	NOR	SEROTYPAGE	BLSE	TDD	ORIGINE
26	0	0	0	1	0	1	1	0	10	0	0	1	0	0	0	Alger
27	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	Boumerdès
28	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	2	0	Boumerdès
29	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	Boumerdès
30	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	Boumerdès
31	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	2	0	2	0	Boumerdès
32	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	Boumerdès
33	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	Boumerdès
34	0	0	0	1	0	0	2	0	2	1	0	2	0	0	0	Boumerdès
35	0	0	0	1	0	0	2	0	2	0	0	1	0	0	0	Boumerdès
36	0	0	1	1	0	0	2	1	1	0	0	0	1	1	0	Boumerdès
37	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	Boumerdès
38	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	Boumerdès
39	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	Boumerdès
40	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	Boumerdès
41	0	0	0	1	0	0	1	0	1	2	0	0	3	0	0	Boumerdès
42	0	0	0	1	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	Boumerdès
43	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	0	Boumerdès
44	2	1	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1	1	Alger
45	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	2	0	0	0	Alger
46	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	Alger
47	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	Alger
48	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	Alger
49	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	Alger
50	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	2	0	0	0	Alger

ANNEXE 7

RESULTATS

SOUCHES	AMX	AM	AMC	CTX	KF	STX	CT	NA	F	C	TE	NOR	SEROTYPAGE	BLSE	TDD	ORIGINE
51	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	2	2	0	0	Tizi-Ouzou
52	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	Tizi-Ouzou
53	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	Tizi-Ouzou
54	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	3	0	0	Tizi-Ouzou
55	0	0	1	1	1	0	1	0	2	2	0	1	3	0	0	Tizi-Ouzou
56	0	0	1	1	1	0	0	0	1	2	0	1	3	0	0	Tizi-Ouzou
57	1	0	1	1	1	0	0	0	2	2	0	1	1	0	0	Tizi-Ouzou
58	0	1	1	1	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	Tizi-Ouzou
59	0	1	1	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	Tizi-Ouzou
60	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	Tizi-Ouzou
61	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	Draa Ben Khedda
62	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	Draa Ben Khedda
63	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	Draa Ben Khedda
64	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	Draa Ben Khedda
65	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	Draa Ben Khedda
66	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	Draa Ben Khedda
67	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	0	Draa Ben Khedda
68	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	Draa Ben Khedda
69	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	3	0	0	Draa Ben Khedda
70	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	2	2	0	0	Draa Ben Khedda
71	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	2	2	0	0	Draa Ben Khedda
72	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	2	1	0	0	Draa Ben Khedda
73	0	0	1	1	0	1	1	0	1	2	1	1	1	0	0	Draa Ben Khedda
74	0	0	1	1	0	1	1	2	1	2	1	1	0	0	0	Draa Ben Khedda
75	0	0	1	1	0	1	1	2	1	2	1	1	0	0	0	Lakhdaria

ANNEXE 7

RESULTATS

SOUCHES	AMX	AM	AMC	CTX	KF	STX	CT	NA	F	C	TE	NOR	SEROTYPAGE	BLSE	TDD	ORIGINE
76	0	0	1	1	0	0	0	2	1	1	1	2	0	0	0	Lakhdaria
77	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	Lakhdaria
78	0	0	1	1	2	0	0	0	2	1	0	2	0	0	0	Lakhdaria
79	0	0	0	1	2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	Lakhdaria
80	0	0	0	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	Lakhdaria
81	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	Lakhdaria
82	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	Lakhdaria
83	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	Lakhdaria
84	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	Lakhdaria
85	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	2	0	0	Lakhdaria
86	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	2	0	0	Lakhdaria
87	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	Lakhdaria
88	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	2	0	0	Lakhdaria
89	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	Lakhdaria
90	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	Bouira
91	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	Bouira
92	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	Bouira
93	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	BorjMenaïel
94	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0	0	BorjMenaïel
95	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	2	1	0	0	BorjMenaïel
96	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	3	0	0	BorjMenaïel
97	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	2	2	0	0	BorjMenaïel
98	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	2	0	0	BorjMenaïel
99	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	2	1	0	0	BorjMenaïel
100	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	2	0	0	BorjMenaïel

ANNEXE 7

RESULTATS

SOUCHES	AMX	AM	AMC	CTX	KF	STX	CT	NA	F	C	TE	NOR	SEROTYPAGE	BLSE	TDD	ORIGINE
101	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	2	2	0	0	BorjMenaïel
102	1	2	0	1	0	1	1	0	2	1	0	1	1	0	0	BorjMenaïel
103	1	2	0	1	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	BorjMenaïel
104	2	2	0	1	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	BorjMenaïel
105	2	2	0	1	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	BorjMenaïel
106	2	0	0	1	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	BorjMenaïel
107	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	BorjMenaïel
108	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	BorjMenaïel
109	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	BorjMenaïel
110	0	2	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	BorjMenaïel
111	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	2	0	BorjMenaïel
112	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2	0	BorjMenaïel
113	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	1	1	0	0	BorjMenaïel
114	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	2	0	0	BorjMenaïel
115	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	2	0	0	BorjMenaïel
116	0	0	0	1	0	2	1	0	1	0	0	1	2	0	0	BorjMenaïel
117	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	BorjMenaïel
118	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	BorjMenaïel
119	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	3	0	0	Lakhdaria
120	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	3	0	0	Lakhdaria
121	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	3	0	0	Lakhdaria
122	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	3	0	0	Lakhdaria
123	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	3	0	0	Alger
124	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	3	0	0	Bouira
125	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	2	0	0	Bouira

ANNEXE 7

RESULTATS

SOUCHES	AMX	AM	AMC	CTX	KF	STX	CT	NA	F	C	TE	NOR	SEROTYPAGE	BLSE	TDD	ORIGINE
126	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	2	0	0	Bouira
127	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	3	0	0	Bouira
128	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	3	0	0	Bouira
129	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	2	3	0	0	Bouira
130	0	0	2	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	Bouira
131	0	0	2	1	0	0	1	0	1	1	0	0	3	0	0	Bouira
132	0	0	2	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	Bouira
133	1	2	2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	Bouira
134	1	1	2	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	Bouira
135	1	0	2	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	Bouira
136	1	1	2	1	0	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	Bouira
137	0	0	1	0	0	0	1	0	2	1	0	1	0	2	1	Bouira
138	0	0	2	1	0	2	1	0	2	1	0	1	2	0	0	Bouira
139	0	0	2	1	0	0	1	0	2	1	0	1	3	0	0	Bouira
140	0	0	2	1	0	0	1	0	2	1	0	1	3	0	0	Bouira
141	0	0	2	1	0	1	2	0	0	1	0	1	3	0	0	Alger
142	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	3	0	0	Alger
143	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	0	Alger
144	0	0	1	1	0	0	1	0	0	2	0	0	3	0	0	Alger
145	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	3	0	0	Alger
146	0	2	1	1	0	0	1	0	0	2	0	2	3	0	0	Alger
147	0	2	1	1	0	0	1	0	0	2	0	1	3	0	0	Alger
148	0	2	0	1	0	2	1	0	0	2	0	1	3	0	0	Alger
149	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	3	0	0	Alger
150	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	3	0	0	Alger