

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire



Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Master
en
Médecine vétérinaire

THEME

**Comparaison et évaluation de deux techniques
d'identification et d'étude de la sensibilité aux
antibiotiques des bactéries responsables de
mammites chez la vache laitière**

Présenté par :

Melle CERBAH Melissa

Soutenu publiquement, le

09/07/2023

Devant le jury :

Mr BAROUDI Djamel

MCA (ENSV)

Président

Mme BAAZIZI Ratiba

MCA (ENSV)

Examinatrice

Mme GUESSOUM
Myriam

MCB (ENSV)

Promotrice

2022-2023

Remerciements

Je formule ma profonde gratitude à « **Allah** » le tout puissant qui m'a donné de la volonté et du courage pour la concrétisation de ce modeste travail.

Je tiens à exprimer toute Ma reconnaissance et témoigner ma gratitude pour remercier ma promotrice Madame **Guessoum M.**, Maître de conférences à l'école nationale supérieure vétérinaire d'Alger qui m'a fait l'honneur d'encadrer mon travail, pour sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse et surtout ses judicieux conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je remercie également Monsieur **Baroudi D.**, Maître de conférences A à l'ENSV qui m'a fait l'honneur de présider mon travail.

Merci à Madame **Baazizi R.**, Maître de conférences A à l'ENSV qui m'a fait le plaisir de participer à notre jury de ce mémoire, ma profonde gratitude.

Mes sincères remerciements iront également au responsable et à l'ingénieur de laboratoire de l'école national supérieur vétérinaire Madame **Azzag N.** et Madame **Benfadel S.**, et à toute l'équipe de l'école nationale vétérinaire, les professeurs et toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à **Dr. Aigoun** et à l'ensemble des vétérinaires qui ont contribué à la réalisation des prélèvements. Respect à vous.

Mes vifs remerciements à **Dr. Lounis**, qui m'a donné la chance de participer à un atelier de présentation de kit au Sein du symposium National de la médecine vétérinaire.

Et enfin je remercie énormément le Professeur **Hanzen CH.** à qui j'ai eu l'occasion et l'honneur de rencontrer, pour son aide, son soutien moral et ses nobles conseils que je n'oublierai jamais.

Dédicaces

Je dédie ce travail

À mes chers parents Yazid et Naima, source de vie et d'amour, ceux qui m'ont arrosé de t' tendresse et d' espoir et quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point les remercier comme il se doit

À mes frères et ma sœur : Abdel Wahab, Malik et Massiva

À Madame Guessoum Myriam, ma chère promotrice

À toutes les personnes de ma grande famille

À l'honorable Maître, Christian Hanzen

Et bien évidemment à tous mes collègues de la promotion, sans exception.



Résumé

L'identification bactériologique des germes et l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques sont deux aspects cruciaux de la microbiologie médicale. Ces processus sont essentiels pour diagnostiquer et traiter les infections bactériennes de manière efficace.

L'objectif de ce travail est d'identifier les principaux germes responsables de mammite chez les vaches laitières et l'étude de la sensibilité de ces germes aux antibiotiques en utilisant deux techniques différentes, la technique classique et la nouvelle technique rapide par le Speed Mam Color afin de réaliser une étude comparative entre les deux.

L'étude a été effectuée sur 20 prélèvements de lait de mammite de vaches laitières appartenant à plusieurs élevages situés dans les régions de tizi Ouzou, Bouira et Boumerdes.

Le taux d'identification par les deux techniques était similaire par rapport à l'identification des entérobactéries et des Staphylocoques. Par contre, le kit a présenté plus de sensibilité aux autres germes comme les Mycoplasmes (5/20 ; 7.2%) et les Streptocoques (9/20 ; 15.79%). Concernant l'étude de la sensibilité aux antibiotiques, en plus de la rapidité des résultats d'antibiogramme, les antibiotiques testés par le kit sont les plus utilisés par les vétérinaires sur le terrain.

Malgré que le Speed Mam Color soit un test très facile à appliquer et rapide mais la technique classique reste aussi une excellente méthode d'identification et d'antibiogramme et elle nécessite seulement une bonne maîtrise.

Mots clés : mammite, identification bactériologique, sensibilité aux antibiotiques, technique classique, technique rapide, Speed Mam Color.

Abstract

Bacteriological identification of pathogens and studying their antibiotic susceptibility are crucial aspects of medical microbiology. These processes are essential for diagnosing and effectively treating bacterial infections.

The objective of this study is to identify the main pathogens responsible for mastitis in dairy cows and study the susceptibility of these pathogens to antibiotics using two different techniques: the classical technique and the new rapid technique using Speed Mam Color, in order to carry out a comparative study between the two.

The study was conducted on 20 milk samples from cows with mastitis belonging to various farms located in the regions of Tizi Ouzou, Bouira, and Boumerdes.

The identification rate using both techniques was similar for identifying enterobacteria and Staphylococci. However, the kit showed higher sensitivity for other pathogens such as Mycoplasmas (5/20; 7.2%) and Streptococci (9/20; 15.79%). Regarding the study of antibiotic susceptibility, in addition to the rapidity of the antibiotic susceptibility test results, the antibiotics tested by the kit are the most commonly used by veterinarians in the field.

Although Speed Mam Color is a very easy and rapid test to apply, the classical technique remains an excellent method for identification and antibiotic susceptibility testing, requiring only good mastery.

Keywords: mastitis, bacteriological identification, antibiotic sensitivity, classical technique, rapid technique, Speed Mam Color.

ملخص

تعتبر تحديد الجراثيم المسببة لالتهاب الضرع في الأبقار الحليب ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية جانبين حاسمين في علم الأحياء الدقيقة الطبية. هذه العملية ضرورية لتشخيص وعلاج العدوى البكتيرية بشكل فعال.

يهدف هذا العمل إلى تحديد الجراثيم الرئيسية المسببة للتهاب الضرع في الأبقار الحليب ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية باستخدام تقنيتين مختلفتين: التقنية التقليدية والتقنية السريعة الجديدة، وذلك لإجراء دراسة مقارنة بين الاثنتين.

تم إجراء الدراسة على 20 عينة من حليب التهاب الضرع في الأبقار الحليبية التي تعود لعدة مزارع في مناطق تيزي وزو، بويرة، وبومرداس.

أظهرت النتائج أن نسبة التحديد بواسطة الطريقتين كانت مماثلة فيما يتعلق بتحديد البكتيريا المعوية والعنقوديات العنقودية. ومع ذلك، أظهرت التقنية الجديدة حساسية أكبر في تحديد جراثيم أخرى مثل المايكوبلازما (20/5؛ 7.2%) والعقديات (20/9؛ 15.79%).

فيما يتعلق بدراسة حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية، فإن التقنية الجديدة لا تقدم فقط نتائج سريعة في اختبار الحساسية، بل تستخدم أيضًا المضادات الحيوية التي يستخدمها الأطباء البيطريون بشكل أكثر شيوعًا في الميدان.

على الرغم من أن التقنية الجديدة هي اختبار سهل التطبيق وسريع، إلا أن التقنية التقليدية لا تزال طريقة ممتازة لتحديد الجراثيم وتتطلب فقط إتقانًا جيدًا.

كلمات مفتاحية: التهاب الضرع، التحديد البكتيري، الحساسية للمضادات الحيوية، التقنية التقليدية، التقنية السريعة.

Remerciements.....	ii
Résumé.....	iv
Abstract	v
ملخص	vi
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	x
Introduction.....	xii
Partie bibliographique.....	14
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	1
I. Généralité sur les germes responsables de mammites.....	1
I.1. Les bactéries contagieuses.....	2
I.2. Les bactéries environnementales.....	3
II. Les types de mammites.....	4
II.1. Mammite subclinique	4
II.2. Mammite clinique	4
II.3. Mammite aiguë.....	4
II.4. Mammite aiguë et gangréneuse	5
II.5. Mammites chroniques ou récidivantes.....	5
III. Diagnostique bactériologique des mammites	6
III.1. Bactériologie culturelle au laboratoire	7
III.1.1. Atouts et limites de la bactériologie au laboratoire	9
III.1.2. Marges de progrès	11
III.2. Autres méthodes	12
III.2. 1. Le Speed® mam color	12
III.2.2. Polymerase chain reaction	12
III.2.3. Test immuno-enzymatique	13
IV. Techniques d'antibiogramme	14
IV.1. Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices	14
IV.2. Antibiogramme par diffusion en milieux gélosé	15
IV.3. Autres méthodes d'identification des résistances	16

IV.4. Comparaison des différentes techniques de l'antibiogramme.....	17
V. Impact de l'antibiorésistance.....	19
VI.1. En santé humaine.....	19
VI.2. En santé animale.....	19
VI.3. La lutte contre l'antibiorésistance.....	20
Partie expérimentale.....	22
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	23
Objectif.....	23
1. Lieu de travail.....	23
2. Durée de l'étude.....	23
3. Prélèvements.....	23
I. Matériel.....	24
I.1. Matériel biologique.....	24
I.2. Appareillage et petit matériel.....	24
I.3. Milieux de culture.....	25
II. Méthodes.....	26
II.1. Au niveau des moyens classiques.....	26
II.1.1. Identification bactérienne.....	26
1. Examen microscopique.....	26
2. Examen macroscopique.....	26
3. Identification par galerie Api.....	27
II.1.2. Antibiogramme Classique.....	28
II.2. Speed Mam Color.....	30
II.2.1. Technique.....	32
II.2.2. Lecture.....	34
III. Résultats et Discussion.....	37
III.1. Au moyen de la technique classique.....	37
III.1.1. Nature et prévalence des germes.....	37
III.1.2. Sensibilité aux antibiotiques.....	39
III.2. Au moyen de kit rapide Speed Mam Color.....	40
III.2.1. Nature et prévalence des germes.....	40
III.2.2. Sensibilité aux antibiotiques.....	42
III.2. Comparaison des deux techniques.....	44
Conclusion et recommandations.....	46
Conclusion générale.....	47

Liste des figures

Figure 1 : Prise de prélèvement da lait (Cas de mammites cliniques)-----	24
Figure 2 : Le matériel utilisé pour l'application des deux techniques d'identification bactérienne -----	25
Figure 3 : Matériel utilisé pour la réalisation d'antibiogramme -----	29
Figure 4 : Dépôt de disques d'antibiotique sur Gélose Muller Hilton -----	30
Figure 5 : le Speed Mam Color -----	32
Figure 6 : Technique d'application du kit Mam Speed -----	34
Figure 7 : Changement de couleur des puits de kit signe d'une positivité-----	36
Figure 8 : Répartition des germes isolés en fonction du Gram-----	37
Figure 9 : Fréquence d'isolement des différentes espèces bactériennes -----	38
Figure 10 : Taux de résistance aux différents antibiotiques-----	40
Figure 11 : Fréquence de détection des différentes espèces bactériennes par le Kit -----	41
Figure 12 : Taux de résistance aux différents antibiotiques-----	43

Liste des tableaux

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des principales méthodes de détection de la sensibilité bactérienne	17
Tableau 2 : Liste de l’OMS des agents pathogènes prioritaires pour la recherche-développement de nouveaux antibiotiques	20
Tableau 3 : Fréquence d’isolement des différentes espèces bactériennes.....	38
Tableau 4 : Taux de résistance aux différents antibiotiques	39
Tableau 5 : Fréquence de détection des différentes espèces bactériennes par le Kit	41
Tableau 6 : Identification des germes responsables de mammite par le Speed Mam Color	42
Tableau 7 : Taux de résistance aux différents antibiotiques	43
Tableau 8 : Comparaison des résultats d’identification bactérienne	44

Liste des abréviations

CASFM : Société Française de Microbiologie médicale

EUCAST: Eurooean Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

CCS : Comptage des Cellules Somatiques

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

WGS : Whole Genome Sequencing (Séquençage du génome complet)

UFC : Unité Formant Colonie

H : Heure

MI : millilitre

UG : microgramme

UL : microlitre

UM : micromètre

Mm : millimètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OIE : Organisation mondiale e la santé animale

FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting

ECDC : Centre Européen de prévention et de Contrôle des maladies

Introduction

Dans le diagnostic d'une maladie bactérienne, l'identification de germe est une étape très importante, elle consiste à déterminer l'agent pathogène responsable de la maladie.

La mammites bovine c'est une inflammation de la glande mammaire chez la vache laitière, c'est une maladie multifactorielles majeure dans l'élevage laitier bovins.

Les infections mammaires sont courantes et l'identification des germes impliqués est fondamentale dans le diagnostic posé dans les laboratoires d'analyse de biologie médicale. La démarche de l'identification repose sur les moyens classiques et /ou automatisés.

Les moyens classiques sont utilisés depuis longtemps ; le principe d'identification à l'aide des moyens classiques est assez simple : il s'agit en pratique d'effectuer un examen microscopique, un examen macroscopique et une galerie biochimique. Il convient ensuite de comparer les différents caractères morphologiques et biochimiques de l'espèce inconnue avec une espèce déjà décrite (une souche type) et l'antibiogramme de cette souche qui permet d'étudier le profil de résistance et de sensibilité de cette souche inconnue et aussi de bien l'identifier.

Actuellement, il existe plusieurs types d'automates tels que les automates d'identification, les automates d'antibiogramme et les automates d'identification et d'antibiogramme à la fois. Il existe aussi des automates capables d'identifier plus de 300 souches en un temps très court c'est-à-dire l'automate capable d'identifier plusieurs souches inconnues ensemble.

Pour les cas de mammites, il existe aussi des kits d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques rapides qui nous donne un résultat d'identification et d'antibiogramme dans les 48h.

Le traitement des mammites se fait par l'utilisation des antibiotiques, malgré leurs efficacités remarquables, mais leur utilisation massive et répétée amènent à d'éventuels problèmes de présence de résidus dans le lait et d'antibiorésistance. Alors c'est

important aussi de réaliser un antibiogramme pour étudier la résistance des souches afin de trouver le traitement efficace de la mammite.

Aussi pour l'étude de la résistance aux antimicrobiens qui se fait par la méthode d'antibiogramme classique il existe actuellement d'autres nouvelles méthodes comme les kits rapides.

Notre travail est basé sur une étude comparative entre les moyens classiques d'identification et d'antibiogramme et le kit Speed Mam Color d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques rapide spécial pour mammite.

Partie
Bibliographique

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité sur les germes responsables de mammites

La mammite est une préoccupation majeure en termes de bien-être animal et économique dans les élevages laitiers (**Aghamohammadi et al., 2018**). Les mammites sont presque exclusivement d'origine bactérienne. Exceptionnellement, elles peuvent être causées par des champignons, des parasites, des agents chimiques, un traumatisme (comme un choc violent ou une agression de la peau du quartier ou du trayon), ou une sténose (engendrée par un dysfonctionnement de la machine à traire ou un papillome) (**Remy, 2010**).

Les germes responsables des mammites sont très nombreux : on compte environ 200 espèces de microorganismes pouvant être impliquées. Parmi ces 200 espèces, une dizaine est à l'origine d'environ 90% des mammites, et 3 catégories de germes sont responsables de 75% des cas. Ces trois catégories de germes sont des germes pathogènes majeurs : streptocoques et staphylocoques (9 cas de mammite subclinique sur 10), entérobactéries (80% des mammites cliniques) (**Bouaziz, 2020**).

Dans 90% des cas de mammites, on ne trouve dans la mamelle qu'un seul germe : la mammite est mono-microbienne. Dans certains cas, il y a des mammites bi-microbiennes (**Bouaziz, 2020**).

La mammite est une inflammation d'un ou plusieurs quartiers due à la présence et à la multiplication dans le parenchyme mammaire d'une (ou plusieurs) espèce bactérienne pathogène. Elle est suivie par une réaction inflammatoire à l'origine de lésions du tissu mammaire et une augmentation de la perméabilité entre le compartiment sanguin et le lait qui a pour conséquence des modifications physico-chimiques de la composition du lait et une augmentation du nombre de cellules (**Hassouni, 2022**).

Les agents pathogènes causant la mammite peuvent être identifiés dans le lait généralement en utilisant des cultures microbiologiques conventionnelles (différents milieux sélectifs et méthodes biochimiques), et aussi des méthodes moléculaires basées sur l'ADN (par exemple, PCR, séquençage de l'ARNr 16S, WGS), des méthodes protéomiques (par exemple, spectrométrie de masse par

désorption/ionisation laser assistée par matrice ; MALDI-TOF) ou d'autres méthodes (**Bergonier, 2017**).

Les bactéries responsables de mammite bovine peuvent être classées en deux catégories principales : les bactéries contagieuses et les bactéries environnementales.

I.1. Les bactéries contagieuses

Les bactéries contagieuses de la mammite bovine se trouvent généralement sur la peau de la vache et se multiplient à l'intérieur des trayons et des quartiers infectés. Elles sont excrétées avec le lait pendant la traite, ce qui contribue à la transmission de l'infection d'une vache à l'autre (**Rattez, 2017**).

Les principales voies de transmission des bactéries contagieuses sont l'équipement de traite contaminé, les serviettes ou lingettes de lavage utilisées lors de la traite, ainsi que les mains des préposés à la traite.

Ces bactéries contagieuses sont bien adaptées pour coloniser rapidement l'intérieur du trayon et du pis grâce à leur capacité d'adhérer aux tissus mammaires. Elles se multiplient à l'intérieur du trayon, ce qui peut entraîner une inflammation et une augmentation du comptage des cellules somatiques (CCS) dans le lait.

La mammite causée par ces bactéries est souvent de nature subclinique, ce qui signifie qu'il n'y a pas nécessairement de signes visibles d'infection, mais le CCS dans le lait peut être élevé. Cependant, dans certains cas, ces bactéries peuvent également provoquer des cas de mammite clinique, caractérisés par des signes visibles d'inflammation du pis.

Les principales bactéries contagieuses impliquées dans la mammite bovine sont *Staphylococcus aureus*, les staphylocoques à coagulase négative, *Streptococcus agalactiae* et les *Mycoplasmes*.

Il est important de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle appropriées, telles que l'hygiène des trayons, le bon usage des produits de désinfection et la formation du personnel de traite, afin de réduire la transmission de ces bactéries et de prévenir l'incidence de la mammite dans les troupeaux laitiers (**Sehad, 2022**).

I.2. Les bactéries environnementales

Les bactéries environnementales se trouvent dans l'environnement de la vache, notamment dans le fumier, le sol, la litière, les plantes, l'eau et même sur la peau de la vache elle-même. Leur présence dans l'environnement rend difficile leur élimination complète.

Les bactéries environnementales sont souvent considérées comme des "opportunistes", ce qui signifie qu'elles profitent d'une situation qui rend la glande mammaire vulnérable à l'infection. Elles tirent parti d'une contamination environnementale pour infecter les quartiers mammaires. Une grande proportion des infections survient dans les deux semaines qui suivent le tarissement, lorsque le système de défense naturelle de la vache est affaibli, ainsi que dans les deux semaines précédant le vêlage.

La mauvaise désinfection des trayons ou l'utilisation d'une canule intra mammaire sale lors d'une infusion peut être à l'origine de l'infection par les bactéries environnementales. De plus, l'absence du bouchon de kératine à l'extrémité du traxon augmente le risque d'infection.

Pendant la lactation, le risque d'infection par les bactéries environnementales est plus élevé juste après le vêlage. Ces bactéries contaminent l'extrémité des trayons entre les traites et infectent les quartiers mammaires par le reflux de lait provoqué par la traite (en raison d'un mauvais ajustement ou d'un sifflement). On parle alors d'un mode de contamination par propulsion.

Les infections causées par les bactéries environnementales se manifestent généralement par des cas de mammite clinique. Les signes visibles incluent un lait anormal, une enflure, une rougeur et une chaleur dans le quartier mammaire infecté, tandis que la fièvre peut être absente ou légère.

Les principales bactéries environnementales impliquées sont les coliformes tels qu'*Escherichia Coli* et *Klebsiella spp.*, ainsi que les streptocoques en général, tels que *Streptococcus uberis* et *Streptococcus dysgalactiae* (Rattez, 2017).

II. Les types de mammites

Les mammites peuvent être classées en différentes formes cliniques (Zoetis, 2020)

II.1. Mammite subclinique

- Le micro-organisme le plus fréquemment associé est le Staphylocoque aureus
- Le lait a une apparence normale et il n'y a aucun signe visible d'inflammation de la glande mammaire.
- Le diagnostic peut être établi en se basant sur une concentration élevée de cellules somatiques dans le lait après comptage ou après des analyses bactériologiques.

II.2. Mammite clinique

- Selon le type d'agent pathogène impliqué, il peut y avoir de la fièvre et une détérioration de l'état général de la vache, avec ou sans signes visibles d'inflammation de la glande mammaire tels que rougeur, chaleur, gonflement et douleur.
- L'apparence du lait est visiblement altérée (modifications chimiques, physiques et généralement bactériologiques). On peut observer des caillots simples ou des amas de fibrine dans un lait très aqueux.

II.3. Mammite aiguë

- Les micro-organismes les plus fréquemment associés sont l'Escherichia Coli, le Streptocoque uberis et le Streptocoque dysgalactiae.
- Les signes cliniques (fièvre, léthargie, perte d'appétit) sont graves, et la glande mammaire est gonflée, douloureuse, œdématiée ou très dure.
- Les sécrétions du quartier atteint peuvent parfois contenir des caillots ou des flocons et peuvent être aqueuses, séreuses ou purulentes.

II.4. Mammite aiguë et gangréneuse

- Les micro-organismes les plus fréquemment associés sont le Staphylocoque doré (*S. aureus*) et le *Clostridium perfringens*.
- Les symptômes comprennent anorexie, déshydratation, léthargie, fièvre et signes de toxémie, pouvant parfois entraîner la mort de l'animal.
- Au début de la maladie, la glande mammaire est rouge, gonflée et chaude. En quelques heures, le trayon devient froid et les sécrétions contiennent de l'eau et du sang, conduisant à une nécrose.

II.5. Mammites chroniques ou récidivantes

- Les micro-organismes les plus fréquemment associés sont le Staphylocoque doré (*S. aureus*) et le Streptocoque *uberis*.
- Les signes cliniques de mammite apparaissent de manière épisodique, avec des périodes prolongées sans symptômes cliniques.
- Les sécrétions contiennent régulièrement des caillots, des flocons ou des amas de fibrine.

Le traitement des mammites chez les vaches laitières repose généralement sur l'administration d'antibiotiques adaptés au type de bactérie responsable de l'infection. Il est important de suivre les recommandations du vétérinaire en termes de dosage et de durée du traitement. Dans certains cas, une élimination précoce de la vache du troupeau peut être nécessaire pour éviter la propagation de l'infection à d'autres animaux.

Il est essentiel de mettre en place des mesures de prévention appropriées, telles que l'hygiène des trayons, la désinfection adéquate des installations de traite et la gestion de la litière, le maintien de conditions de logement propres et sèches, ainsi que la gestion appropriée de la lactation et de la reproduction. Afin de réduire la contamination environnementale et de prévenir les infections causées par ces bactéries chez les vaches laitières.

III. Diagnostic bactériologique des mammites

L'optimisation du diagnostic bactériologique des mammites bovines vise principalement trois aspects d'amélioration (**Issa Ibrahim., 2015**) :

- **Efficacité thérapeutique**

Il s'agit du premier objectif recherché pour obtenir une guérison clinique et bactériologique optimale. Cependant, ce point est parfois remis en cause par les retours d'expérience des éleveurs et des vétérinaires, ainsi que par des publications scientifiques.

Dans le contexte économique actuel de l'industrie laitière, le rapport coût-bénéfice du traitement est également pris en compte.

De plus, des contraintes liées à l'utilisation des antibiotiques, l'efficacité préventive est devenue un enjeu majeur pour préserver la sensibilité des antibiotiques.

Dans ce contexte, il est nécessaire de mieux caractériser les cas d'infections mammaires afin de mettre en place des traitements ciblés et efficaces. Les analyses bactériologiques sont indispensables pour atteindre cet objectif.

- **Indications de la vaccination**

Il est important d'établir avec certitude les indications de la vaccination contre les infections mammaires. Actuellement, la vaccination ne cible que deux pathogènes parmi tous ceux impliqués dans ces infections. Cette question revêt donc une grande importance pour améliorer les stratégies de prévention (**Dahyot et al.2017**).

- **Diagnostic épidémiologique**

La bactériologie complète le diagnostic épidémiologique basé sur l'analyse des données de l'élevage (comme les numérations cellulaires et les événements liés aux mammites). Ces données sont ensuite confrontées à l'analyse des facteurs de risque en élevage (**Bouaziz., 2005**). Ainsi, la bactériologie joue un rôle essentiel dans la caractérisation de ces modèles épidémiologiques.

Dans l'ensemble, les objectifs recherchés pour l'amélioration des méthodes de diagnostic bactériologique incluent la réduction du délai de rendu des résultats et du coût unitaire de l'analyse.

Il est également nécessaire d'améliorer la sensibilité du diagnostic (réduction des faux négatifs et des cas de mammites cliniques associés à des pathogènes mineurs). L'augmentation du spectre de détection (identification des agents pathogènes moins fréquents) et la fiabilité de l'identification des espèces bactériennes sont également des points d'amélioration importants. Dans un proche avenir, la caractérisation bactérienne pour l'identification des gènes d'antibiorésistance et le typage des bactéries joueront un rôle crucial dans ce domaine (**Lemée et al., 2022**).

III.1. Bactériologie culturelle au laboratoire

Selon **Burucoa**, La phase d'isolement consiste à ensemercer un milieu solide et non sélectif, ce qui permet de juger de la qualité du prélèvement. Le milieu de référence est une gélose au sang de mouton coulée dans une boîte de pétri, car elle permet la croissance de la quasi-totalité des germes responsables de mammites (**Burucoa, 2007**).

Cependant, la croissance des entérobactéries est inhibée par certains constituants du lait, et il est parfois intéressant d'ensemencer également un bouillon nutritif simple au 1/200e, qui pourra alors permettre d'isoler ces bactéries.

Les milieux additionnels (EMB, Mac Conkey) ciblent les bactéries Gram-. Pour les cultures pauci-bactériennes ou négatives, des milieux d'enrichissement sont nécessaires.

Après 24 à 48 h d'incubation à 37°C en étuve, on observe le développement de bactéries, et il est alors nécessaire d'observer s'il s'agit d'un seul type bactérien ou de plusieurs, selon l'aspect des colonies.

La présence d'un type bactérien conclut à un résultat valide, et à l'identification d'espèce. Seules 4 à 5% des infections mammaires sont bi-bactériennes, donc lors de la présence de 2 types bactériens, on doit exclure la possibilité d'une contamination

du prélèvement avant la validation du résultat. Avec 3 ou plus types bactériens ça veut dire que le prélèvement est contaminé (**Pagé, 2021**).

Le processus d'identification des bactéries impliquées dans les mammites bovines comprend généralement quatre étapes successives :

1. **Observation de la morphologie** : Cette étape consiste à examiner la forme, la couleur, l'hémolyse (capacité de destruction des globules rouges) et l'odeur des bactéries prélevées. Ces caractéristiques morphologiques peuvent fournir des indices préliminaires sur l'identité des bactéries.
2. **Tests d'orientation biochimiques** : Les tests biochimiques sont utilisés pour évaluer les propriétés métaboliques des bactéries, telles que leur capacité à fermenter certains sucres, à produire certaines enzymes ou à métaboliser certains substrats. Ces tests permettent de différencier les bactéries en fonction de leurs caractéristiques biochimiques distinctives.
3. **Coloration de Gram** : La coloration de Gram est une méthode de coloration des bactéries qui permet de les classer en deux grandes catégories : les bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives. Cette distinction est basée sur les différences de structure de la paroi cellulaire des bactéries. La coloration de Gram est une étape importante pour orienter l'identification des bactéries.
4. **Identification d'espèce ou de genre** : Cette étape vise à identifier précisément l'espèce ou le genre de la bactérie isolée. Elle peut être réalisée à l'aide de diverses techniques, telles que des tests biochimiques plus spécifiques, des tests immunologiques ou des méthodes moléculaires comme la PCR (réaction de polymérisation en chaîne). Ces méthodes permettent d'obtenir une identification plus précise des bactéries.

Il est important de noter que malgré ces étapes d'identification, le diagnostic reste souvent présomptif, ce qui signifie que d'autres tests, tels que la culture bactérienne et la sensibilité aux antibiotiques, peuvent être nécessaires pour confirmer l'identité de la bactérie et guider le traitement approprié.

Traditionnellement, l'identification des bactéries dans le cadre des mammites bovines est réalisée à l'aide de galeries API® ou ID®. Ces galeries contiennent des

tests biochimiques spécifiques qui permettent de déterminer l'espèce ou le genre de la bactérie en se basant sur ses caractéristiques métaboliques.

Cependant, l'utilisation de la spectrométrie de masse offre une méthode d'identification plus avancée. Elle repose sur l'analyse du profil moléculaire de l'agent pathogène et permet une identification avec une spécificité d'espèce plus élevée. Cette technique utilise des banques de données contenant des profils moléculaires de référence pour comparer et identifier les bactéries.

La spectrométrie de masse présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes traditionnelles. Elle est plus rapide, permettant une identification plus rapide des bactéries, et elle offre une meilleure spécificité d'espèce. De plus, le coût de la spectrométrie de masse est généralement inférieur à celui des techniques d'identification classiques.

Avec l'augmentation des banques de données d'identification et la diminution des coûts associés, on peut s'attendre à ce que la spectrométrie de masse se développe davantage à l'avenir en tant que méthode privilégiée pour l'identification des bactéries impliquées dans les mammites bovines (**Bergonier, 2017**).

III.1.1. Atouts et limites de la bactériologie au laboratoire

En ce qui concerne le délai d'obtention des résultats, il faut généralement compter un minimum de 2½ à 3 jours (plus si un antibiogramme est demandé) pour obtenir le résultat de l'identification bactériologique des mammites bovines. Ce délai peut varier en fonction des laboratoires et des conditions spécifiques.

En ce qui concerne la sensibilité de la méthode d'identification bactériologique, il est rapporté dans la littérature que 10 à 30% des cas de mammites peuvent donner un résultat négatif en bactériologie. Cela signifie que malgré l'infection de la mamelle, les bactéries responsables ne sont pas détectées par la méthode d'analyse utilisée. Il convient de prendre en compte cette limitation lors de l'interprétation des résultats.

En ce qui concerne le spectre d'identification des germes spécifiques, il est généralement satisfaisant. Cependant, il est possible d'augmenter le spectre de

détection en demandant des analyses spécifiques sur des milieux particuliers ou en utilisant des techniques telles que la PCR (réaction de polymérase en chaîne).

Il est important de noter que ces données sont générales et peuvent varier en fonction des laboratoires, des techniques utilisées et des spécificités régionales. Il est recommandé de se référer aux informations fournies par le laboratoire d'analyse spécifique pour obtenir des détails précis sur les délais, les coûts et les performances de l'identification bactériologique des mammites bovines.

Effectivement, la culture bactériologique peut présenter des limitations en termes de sensibilité et de spécificité, ce qui peut entraîner des faux négatifs.

Les faux négatifs peuvent avoir deux principales origines :

1. Certains types de bactéries, tels que les staphylocoques et les mycoplasmes, sont potentiellement intracellulaires ou intracellulaires facultatifs, ce qui signifie qu'ils ne se développeront pas sur les milieux de culture utilisés en laboratoire. Par conséquent, leur présence peut ne pas être détectée par la culture bactériologique, entraînant ainsi un faux négatif.
2. Dans le cas de mammite subclinique (sans symptômes visibles), les titres bactériens excrétés dans le lait peuvent présenter des fluctuations sinusoïdales importantes. Il peut donc y avoir des moments où l'inoculum bactérien dans l'échantillon de lait est insuffisant pour permettre une croissance bactérienne détectable sur les milieux de culture, ce qui conduit à un faux négatif.

Les vrais négatifs, quant à eux, peuvent être observés lorsque la guérison bactériologique se produit de manière spontanée, sans intervention thérapeutique. Par exemple, dans le cas des infections causées par des coliformes, il a été rapporté que la guérison bactériologique spontanée peut atteindre un taux de 50 à 70%.

Il est important de prendre en compte ces limitations lors de l'interprétation des résultats de la culture bactériologique et de considérer d'autres facteurs tels que les signes cliniques, l'historique de la maladie et les résultats d'autres tests

complémentaires pour parvenir à un diagnostic complet et précis des mammites bovines.

III.1.2. Marges de progrès

Pour augmenter la sensibilité de la méthode culturale dans le diagnostic des mammites bovines, certaines améliorations peuvent être mises en place :

1. Prélèvement de haute qualité : Il est crucial de prélever l'échantillon en tout début d'infection et avant tout traitement. De plus, le choix des fractions de traite prélevées peut également jouer un rôle. La duplication des prélèvements sur une période de 1 à 4 jours permet de limiter l'impact des fluctuations sinusoïdales d'excrétion bactérienne. Il est également possible de réaliser un réensemencement à partir de l'échantillon congelé/décongelé.
2. Identification d'espèce : Bien que l'identification d'espèce ne soit pas systématiquement nécessaire pour les staphylocoques, les corynéformes (hors pyogènes) et les levures en première intention, elle doit être réalisée pour les streptocoques et les bactéries gram-négatives.

En ce qui concerne l'amélioration de la sensibilité, le recours à la PCR multiplex avec des kits tels que Pathoproof® peut être une avancée significative. Ces kits offrent un large spectre de détection avec 12 à 15 cibles, y compris le gène de la β -lactamase. La PCR multiplex présente une sensibilité et une spécificité élevées, ainsi qu'une rapidité d'analyse d'environ 4 heures. Cependant, il est important de noter que cette technique ne permet pas de réaliser un antibiogramme, et il faut également prendre en compte le risque de contamination de l'échantillon. La PCR multiplex est particulièrement intéressante lorsque les résultats bactériologiques négatifs atteignent une proportion élevée de 20 à 30% lors d'une campagne de prélèvement (**Bergonier, 2017**).

En combinant ces améliorations techniques et en prenant en compte les limitations et les spécificités de chaque méthode, il est possible d'améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic bactériologique des mammites bovines. Cela permettra une meilleure gestion des traitements, de la prévention et de la prise en charge des mammites dans les élevages bovins.

III.2. Autres méthodes

III.2. 1. Le Speed® mam color

Cette technique correspond à une mise en culture spécifique et directe du prélèvement de lait de mammites sur une galerie portée à 35°C. En 24h, la lecture visuelle par virage de couleur des puits concernés, permet une lecture rapide de l'antibiogramme adapté aux molécules antibiotiques vétérinaires et au germe pathogène présent dans le prélèvement. En 48h, la seconde lecture visuelle se fait pour l'identification des bactéries, détectables à des concentrations bactériennes > 10³ (Manner, 2001).

Manipulation : 7 minutes

Lecture : Antibiogramme : 18 à 24h, Identification : 48h

Performances : En comparaison avec la méthode de culture sur gélose sensibilité :92%

Spécificité : 96%

Speed Mam Color permet d'isoler et d'identifier les germes responsables d'une flambée de cas cliniques.

Lors d'un échec thérapeutique ou d'une récurrence, Speed Mam Color permet de réaliser un diagnostic étiologique précis et de déterminer le profil de résistance aux antibiotiques

Au sein d'un même troupeau, l'utilisation de Speed Mam Color sur plusieurs échantillons permet un suivi épidémiologique et une évaluation périodique de l'efficacité du plan de traitement.

III.2. 2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Cette technique permet d'identifier les espèces bactériennes dans le lait par analyse de l'ADN bactérien (Ogier, 2006).

Les avantages de la PCR sont : les bactéries peuvent être vivantes ou non, les échantillons peuvent contenir des antibiotiques et les résultats sont disponibles en 24 heures. Par contre, ce test est coûteux. De plus, actuellement, la PCR n'est utilisée que pour la détection de certains organismes dans le lait (*S.aureus*, *Strep. Agalactie* et *Mycoplasma spp*) (Wallace, 2007).

III.2.3. Test immuno-enzymatique (Identification des anticorps et des antigènes spécifiques)

Ce sont des techniques très rapides (environ 2 heures), possèdent une bonne sensibilité et sont très spécifiques à condition d'utiliser des antigènes purifiés et des anticorps monoclonaux (**Manner, 2001**).

Elles sont basées sur un test ELISA recherchant les anticorps dirigés contre une bactérie en particulier. Leur intérêt par rapport à la bactériologie est la rapidité d'obtention des résultats (2h) et son faible coût lorsque la technique est automatisée.

Néanmoins, il existe des réactions croisées ayant pour conséquence des résultats faussement positifs (**Alexandre, 2005**).

IV. Techniques d'antibiogramme

L'antibiogramme vise à trouver l'antibiotique le plus efficace sur les bactéries prélevées sur le patient. Un antibiogramme permet donc de savoir si une bactérie est résistante ou non à un antibiotique.

Les techniques de détection de résistance phénotypique d'une bactérie sont diverses, les deux principales sont la détermination de la CMI et l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.

IV.1. Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les méthodes de dilution en bouillon et en gélose sont utilisées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antibiotique vis-à-vis d'une bactérie testée. La CMI représente la plus basse concentration d'antibiotique qui empêche la croissance de la bactérie.

La méthode de dilution en bouillon est l'une des premières méthodes de test de sensibilité aux antimicrobiens (**Ericsson et Sherris.,1971**), elle consiste à tester une suspension bactérienne dans un milieu de croissance liquide contenant différentes concentrations d'antibiotiques.

Les concentrations d'antibiotiques utilisées sont généralement des dilutions doublantes, telles que 1, 2, 4, 8 et 16 µg/ml. Après incubation pendant une nuit à une température de 35°C, la turbidité des suspensions bactériennes est examinée pour évaluer la croissance bactérienne visible (**Jorgensen et Ferraro., 2009**).

La plus faible concentration d'antibiotique qui empêche la croissance bactérienne représente la CMI. Cette méthode peut être réalisée en utilisant des tubes de culture contenant un volume minimal de 2 ml (macro-dilution) ou des plaques de micro-titration avec de petits volumes (micro-dilution). Les plaques de micro-titration permettent d'analyser plusieurs antibiotiques dans une gamme de dilutions et sont couramment utilisées pour leur praticité et leur popularité (**Jorgensen et Fehlberg.,2009**).

Des plaques de micro-titration préremplies avec des antibiotiques prédilués dans les puits sont également disponibles sur le marché (**Van Belkum et Dune.,2018**).

La méthode de dilution en milieu gélosé implique l'incorporation d'antibiotiques à des concentrations variables dans un milieu gélosé. Ensuite, un inoculum bactérien est ensemencé à la surface de la gélose (**Wiegand et al., 2008**). Cette méthode de dilution en gélose est souvent recommandée pour les organismes à croissance lente, tels que *Campylobacter* (**OIE, 2008**).

Ces deux méthodes de dilution sont largement utilisées dans les tests d'antibiogramme pour évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Elles fournissent des informations précieuses pour guider le choix des antibiotiques appropriés dans le traitement des infections bactériennes.

IV.2. Antibiogramme par diffusion en milieux gélosé

La réalisation d'un antibiogramme par diffusion en milieux gélosé est plutôt simple : il suffit de prendre une souche bactérienne, qu'on introduit dans un milieu nutritif (qui contient des nutriments nécessaires à sa survie, par exemple de la gélose). Pour les bacilles Gram négatif, Staphylococcus et Enterococcus, une gélose simple de Müller-Hinton est utilisée. Pour les Streptococcus, Haemophylus, Moraxella, Pasteurella, Listeria et Corynebacterium la gélose de Müller-Hinton additionnée de 5 % de sang de mouton est recommandée (**CASFM 2013**).

Puis, on dépose différents antibiotiques (sous forme de petites pastilles) de façon équitable - la distance entre les différentes pastilles doit être la même -.

Enfin, on met les boîtes de Petri (boîtes rondes contenant les bactéries et les antibiotiques) dans l'étuve à 37° C pendant 24 heures.

Au bout des 24 heures vient l'étape de la **lecture** de l'antibiogramme. C'est cette étape qui permet de déterminer si une bactérie est résistante à un antibiotique.

(<http://www.antibiotique.eu/expeacuterience-antibiogramme.html#ixzz7fbyri4oV>).

Interprétation des résultats d'antibiogrammes

Après incubation, on mesure ensuite le diamètre des zones d'inhibition, c'est-à-dire les zones où l'antibiotique a été efficace : plus la zone est grande, plus l'antibiotique a été efficace et donc il a tué de bactéries et inversement.

Selon le diamètre, la bactérie est soit :

- Sensible (si le diamètre est supérieur à 13mm) : l'antibiotique est efficace. Il suffit d'une faible concentration de l'antibiotique en question pour tuer les bactéries.

- Intermédiaire (si le diamètre est compris entre 12mm et 13mm) : l'antibiotique est efficace que dans certaines conditions

- Résistante (si diamètre est inférieur à 10mm) : l'antibiotique est inefficace. En effet, la dose nécessaire pour tuer les bactéries est beaucoup trop élevée pour être supportée chez l'homme sans effets secondaires

IV.3. Autres méthodes d'identification des résistances

La méthode d'antibiogramme par gradient ou E-test est une autre approche pour évaluer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques vis-à-vis des bactéries (**Brown et al.,1991**). Cette technique utilise des bandelettes de plastique minces imprégnées d'un gradient de concentration d'antibiotique sur la face inférieure et marquées avec une échelle de concentration sur la face supérieure (**Citron et al.,1991**).

Ces bandelettes sont placées de manière radiale à la surface d'une plaque d'agar appropriée, préalablement inoculée avec une suspension bactérienne normalisée. Après une nuit d'incubation, la CMI est déterminée en identifiant l'intersection entre la bande de test et la partie inférieure de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne en forme d'ellipse sur la gélose (**Huang et al.,1992**). Les fabricants des bandelettes fournissent des critères d'interprétation pour guider l'analyse des résultats (**Schwarz et al.,2010**).

Les approches génotypiques ont également été développées pour la détection des gènes de résistance, afin d'améliorer la rapidité et la précision des antibiogrammes

(Cai et al.,2011). Ces techniques consistent à identifier et caractériser les gènes de résistance, permettant ainsi de prédire les phénotypes de résistance. La génomique comparative, les sondes, l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage sont utilisés pour améliorer la sensibilité, la spécificité et la rapidité de détection des gènes de résistance (Harisberger et al.,2008).

Ces approches sont souvent combinées aux méthodes classiques de détection de la résistance.

Au cours de la dernière décennie, plusieurs autres méthodes ont été proposées comme alternatives potentielles aux techniques classiques d'antibiogramme. Parmi celles-ci, on peut citer les microcalorimètres (détection de la chaleur produite par des bactéries stressées) (Von et al.,2009), l'amplification par bactériophage (détection des phages se reproduisant dans les bactéries vivantes) et le FACS (fluorescence-activated cell sorting, mesure de la différence de fluorescence entre les cellules mortes et vivantes) (Wilson et al.,1997). Bien que des essais de faisabilité aient été publiés pour certaines de ces nouvelles méthodes, elles nécessitent encore une documentation et une standardisation plus poussées avant de pouvoir être utilisées en routine (Van Balkum et Dune.,2018)

IV.4. Comparaison des différentes techniques de l'antibiogramme

Les méthodes de détection de sensibilité des agents pathogènes aux antibiotiques sont nombreuses. Le choix de la méthode dépend d'un panel de facteurs comme la praticité, la flexibilité, le coût, l'automatisation, la reproductibilité et l'exactitude.

Le Tableau 1 dresse les avantages et inconvénients des techniques classiques d'antibiogramme.

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des principales méthodes de détection de la sensibilité bactérienne (Fehlberget al.,2016)

Méthode	Avantages	Inconvénients
Diffusion par disque	Facile à mettre en œuvre, reproductible, coût faible (2-5 € par test), facilité de modification du panel de	Manque de mécanisation ou d'automatisation, chronophage si mesure manuelle, contrainte liée au

	disques d'antibiotiques testés, images de synergie ou d'antagonisme qui orientent sur les mécanismes moléculaires impliqués, résultat en catégorie facilement interprétable par le clinicien	respect de l'espacement entre les disques d'antibiotiques, les bactéries à croissance fastidieuse ne sont pas toutes testables de manière précise, ne fonctionne pas pour certaines combinaisons bactérie-antibiotique
Dilution en bouillon	Résultats de CMI très fiables, méthode quantitative, automatisable, reproductible, pratique si automate	Méthode très laborieuse et chronophage si manuelle car nécessite du matériel et beaucoup de réactifs, coût de l'équipement et des plaques (9-18 €) si automate, peu de flexibilité sur le choix des antibiotiques
Dilution en gélose	Résultats de CMI très fiables, méthode quantitative, reproductible, possibilité de tester plusieurs bactéries sur la même gélose, semi-automatisable	Méthode très laborieuse et chronophage si manuelle, conservation limitée des géloses avec antibiotiques
E-test	Flexibilité, méthode quantitative, appropriée pour tester la résistance à un nombre limité d'antibiotiques chez des organismes à croissance particulière (milieu enrichi ou atmosphère spéciale)	Coût (1,7 à 2,6 € la bande pour un seul antibiotique), possibles anomalies pour certaines combinaisons bactérie / antibiotique

V. Impact de l'antibiorésistance

L'antibiorésistance est devenue ces dernières années un enjeu mondial majeur en santé publique. En effet, l'émergence et la diffusion croissante de bactéries résistantes aux antibiotiques remettent en question l'efficacité des traitements tant chez l'homme que chez l'animal.

Ce phénomène est fortement corrélé au mauvais usage ainsi qu'à la surconsommation des antibiotiques, il est aggravé par l'absence d'innovation dans le domaine depuis deux décennies, ce qui a conduit à une réduction de l'arsenal thérapeutique (**Acar et Rostel., 2001**).

VI.1. En santé humaine

On estime que l'antibiorésistance est responsable de plus de 700 000 morts chaque année dans le monde (**Cassini et al., 2019**).

En 2015, une étude du Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies (ECDC) estime que la résistance bactérienne aux antibiotiques est responsable en Europe d'environ 670 000 infections et de 33 000 décès au cours de l'année 2015 (**Colomb-Cotinat et al., 2016**).

Ces estimations permettent d'ouvrir les yeux sur l'impact important de l'antibiorésistance sur la santé publique et la nécessité urgente d'agir dans la lutte contre l'antibiorésistance (**Acar et Rostel., 2001**).

VI.2. En santé animale

Les antibiotiques sont la catégorie de molécules la plus utilisée par les vétérinaires. C'est pourquoi la lutte contre l'antibiorésistance doit aussi être considérée comme globale dans le concept d'une santé unique « One Health ».

Tout comme en santé humaine, les échecs thérapeutiques secondaires à des bactéries résistantes aux antibiotiques augmentent de façon considérable au cours des dernières décennies. De nouvelles souches bactériennes résistantes sont même une préoccupation quasi exclusive de la santé vétérinaire, comme c'est le cas de *Staphylococcus* résistants à la méticilline (**Acar et Rostel., 2001**).

VI.3. La lutte contre l'antibiorésistance

Touchant aussi bien l'Homme que l'animal, l'antibiorésistance est considérée par l'OMS comme une des plus sérieuses menace pour la santé publique, imposant ainsi une approche globale de la Santé.

Cette menace repose sur une diminution, voire une disparition de la sensibilité de certaines bactéries pathogènes vis-à-vis de molécules antibiotiques, limitant grandement leur efficacité et leur utilité dans la lutte contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, et conduisant ainsi souvent à des complications du fait de la réduction des options thérapeutiques possibles.

En 2017, l'OMS définit une liste d'agents pathogènes prioritaires dans la lutte contre l'antibiorésistance. Ces bactéries sont divisées en trois catégories selon l'urgence de développer de nouveaux antibiotiques et sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Liste de l'OMS des agents pathogènes prioritaires pour la recherche-développement de nouveaux antibiotiques

Priorité 1 : Critique	Priorité 2 : Élevée	Priorité 3 : Moyenne
Acinetobacter baumannii Résistance aux carbapénèmes	Enterococcus faecium Résistance à la vancomycine	Streptococcus pneumoniae insensible à la pénicilline
Pseudomonas aeruginosa Résistance aux carbapénèmes	Helicobacter pylori Résistance à la clarithromycine	Haemophilus influenzae Résistance à l'ampicilline
Enterobacteriaceae Resistance aux carbapénèmes, Production de BLSE	Staphylococcus aureus Resistance à la méticilline, vancomycine	Shigella spp. Résistance aux fluoroquinolones
	Campylobacter spp.	

	Résistance aux fluoroquinolones	
	Salmonella Resistance aux fluoroquinolones	
	Neisseria gonorrhoeae Résistance aux céphalosporines et fluoroquinolones	

En effet, « la résistance aux antibiotiques augmente et nous épuisons rapidement nos options thérapeutiques. Si on laisse faire le marché, les nouveaux antibiotiques dont nous avons le besoin le plus urgent ne seront pas mis au point à temps » (**Tacconelli, 2017**).

Partie

Expérimentale

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Objectif

Notre travail est basé sur une étude comparative entre les moyens classiques et les moyens rapide « **Speed Mam Color** » d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Ces moyens serviront à l'identification et à l'antibiogramme des germes responsables de mammite chez la vache laitière.

1. Lieu de travail

Nous avons réalisé notre travail au niveau des laboratoires de Microbiologie clinique de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire (ENSV-Alger).

2. Durée de l'étude

Ce travail a été effectué dans une période allant de Mars jusqu'au mai 2023.

3. Prélèvements

Les prélèvements de lait ont été réalisés après avoir diagnostiquer les mammites cliniques par le vétérinaire dans les élevages de vaches laitières.

Afin d'éviter une éventuelle contamination, le prélèvement de lait a été réalisé comme suit :

- Un nettoyage du quartier avec de l'eau tiède et du savon.
- Séchage du quartier au moyen de papier à usage unique.
- Désinfection des mains avec de l'alcool et port de gants stérile.
- Prélèvement de lait se fait dans des pots stériles, prélèvement du quartier : ouverture de pot en tenant le bouchon dans la même main, élimination des premiers jets, prélèvement de 60 millilitres de lait et en fin fermeture du pot.

- Les échantillons identifiés et placés sous froid dans une glacière, sont congelés en attendant leur analyse au niveau du laboratoire de microbiologie de l'école national vétérinaire d'Alger.

NB : avant la prise de prélèvements, nous avons bien confirmé que les vaches n'ont pas subi d'antibiothérapie.



Figure 1 : Prise de prélèvement da lait (Cas de mammites cliniques).

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

Nous avons travaillé sur 20 prélèvements de lait de mammite de vaches laitières appartenant à plusieurs élevages situés dans les régions de Tizi Ouzou, Bouira et Boumerdes.

I.2. Appareillage et petit matériel

- Microscope optique.
- Etuve réglée à 37°C.
- Tubes d'écouvillons (écouvillons livrés sous tube plastique avec étiquette de marquage disponibles avec tige en bois, en plastique, en aluminium ou papier avec embout pointe synthétique ou naturelle et stérile).
- Un densimètre qui vérifie la densité de l'inoculum.
- Kit speed bio gramme.
- Carte d'identification : c'est une carte pour faire l'identification, elle est spécifique Au kit speed biogramme.
- Un portoir pour les tubes
- Disques d'antibiogramme.

- Système API 20 E, API Staph et API 20 Strep.

I.3. Milieux de culture

- Boîtes de Pétri prêtes à l'emploi à triple usage
- Géloses de MacConkey
- Gélose Chapman et au chocolat.
- Gélose nutritive.
- Milieu de Mueller Hinton.
- Milieu Chapman et Milieu Baird Parker
- Bouillon nutritif.
- Eau physiologique stérile
- Eau distillée

Le matériel utilisé pour l'identification bactérienne par les deux techniques est présenté dans la figure ci-dessous.

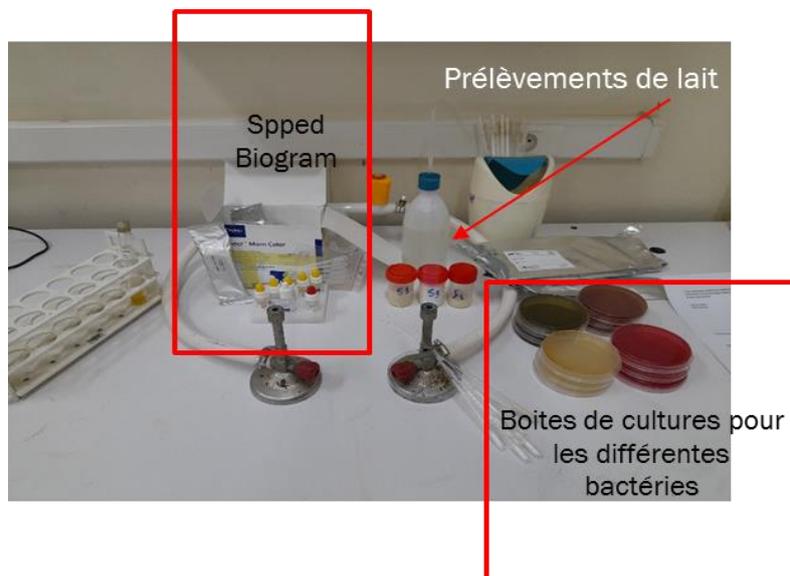


Figure 2 : Le matériel utilisé pour l'application des deux techniques d'identification bactérienne

II. Méthodes

II.1. Au niveau des moyens classiques

II.1.1. Identification bactérienne

1. Examen microscopique

Cet examen consiste en une coloration de GRAM qui a pour but de déterminer la morphologie et l'aspect pariétal des bactéries

Les bactéries à Gram négatif tâcheront le rose et les bactéries à Gram positif tâcheront le violet

- ⇒ L'aspect des staphylocoques lors de la coloration de Gram : des coques à Gram positifs arrondis, en amas réguliers dits en grappes de raisin ou par deux, de 0,7 à 1 μm de diamètre, asporulés et immobiles
- ⇒ L'aspect des entérobactéries lors de la coloration de Gram : des bacilles à Gram négatifs, mobiles ou immobiles, quelque fois capsulés
- ⇒ L'aspect d'Escherichia Coli lors de coloration de Gram : des bacilles à Gram négatifs, en forme de bâtonnet, asporulés qui peut se déplacer au moyen de flagelles péritriches ou être non mobile
- ⇒ L'aspect des pseudomonas lors de coloration de Gram : des bacilles à Gram négatifs fins droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire, ciliature monotriche, dépourvus de spores ou de capsules
- ⇒ L'aspect des streptocoques lors de coloration de Gram : des coques à Gram positifs de 0,5 à 1 μm , présentant un groupement typique en diplocoques ou en chaînettes de longueur variable, immobiles, dépourvus de spores et rarement capsulés

2. Examen macroscopique

Après culture Cet examen permet de déterminer la forme, le relief, la consistance et l'aspect des colonies sur boîte de Pétri à l'œil nu.

Dans cet examen le milieu de culture GN (gélose nutritive) a été utilisé pour les bactéries non exigeantes, et l'ensemencement est fait à l'aide de l'anse calibrée de 10 μl par stries serrées sur la gélose nutritive, ensuite les boîtes ensemencées sont

incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. → La lecture se fait par l'observation des boîtes à l'œil nu.

En cas d'observation de deux types de germes (Bacilles et Cocci), les milieux utilisés pour l'isolement de ces germes sont les géloses de MacConkey, de Chapman et au chocolat.

- ❖ Le milieu de MacConkey contient deux inhibiteurs de la flore Gram positive, les sels biliaires et le cristal violet qui permettent, en plus des bactéries à Gram positives, l'inhibition du développement en nappe des *Proteus*.
- ❖ Le milieu de Chapman est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus* ; il inhibe la grande majorité des autres bactéries ;
- ❖ Le milieu au chocolat permet la culture des bactéries exigeantes et des bactéries non exigeantes.
- ❖ L'isolement est effectué sur les boîtes de Pétri par la méthode des stries serrées.
- ❖ Celles-ci sont incubées 18 à 24 heures à 37 °C

3. Identification par galerie Api

La galerie API (API 20 E, API Staph et API 20 Strep) est un système standardisé pour l'identification des bactéries selon les caractères biochimiques.

La galerie Api 20E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests.

La galerie API® Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API® Staph Medium qui reconstitue les tests.

La galerie API® 20 Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue en consultant la liste de profils à l'aide du logiciel d'identification.

- **Préparation de l'inoculum**

Une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé est prélevée à l'aide d'une pipette, les cellules jeunes (18 à 24 heures) sont préférentiellement utilisées.

La suspension bactérienne est soigneusement homogénéisée dans le milieu. Elle doit être utilisée extemporanément.

- **Inoculation de la galerie**

A l'aide d'une pipette, 1 à 4 colonies morphologiquement identiques sont prélevées et mises en suspension dans de l'eau physiologique. Les tubes des tests (et non les cupules) sont remplis avec la suspension précédente pour éviter la formation de bulles d'air au fond des tubes.

La pointe de la pipette est posée sur le côté de la cupule en inclinant légèrement la boîte chargée de la suspension bactérienne vers l'avant.

Les tubes et cupules des tests qui portent un cadre tels que GLU ont été remplis avec la suspension et les cupules des tests soulignés tels que ADH et URE ont été remplis aussi avec la suspension sur laquelle a été ajoutée une couche d'huile de paraffine (anaérobiose).

Il faut remplir la boîte d'incubation des tubes des tests avec un peu d'eau pour éviter la dessiccation lors de l'incubation à 35°C pendant 24 heures.

Après incubation, la galerie sera lue et les résultats comparés au tableau de lecture.

Sur la fiche de résultats sont notées toutes les réactions spontanées ou révélées par l'addition des réactifs.

II.1.2. Antibiogramme Classique

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci.



Figure 3 : Matériel utilisé pour la réalisation d'antibiogramme (photo personnelle)

Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

- La gélose de Mueller Hinton est un milieu de base qui permet la réalisation de l'antibiogramme standard.
- Elle est coulée en boîtes de Pétri. La surface de la gélose est séchée pendant 15 minutes à 37°C. L'inoculum est préparé à l'aide de 3 à 5 colonies isolées et prélevées puis mises dans un tube qui contient du bouillon nutritif.
- Ce dernier est étuvé pendant 30 min puis une goutte d'inoculum est homogénéisée dans un tube contenant de l'eau physiologique.
- L'ensemencement se fait :

Par inondation : l'inondation se fait avec 5 ml de la suspension sur la gélose de Mueller Hinton, laissée en contact 30 secondes puis mise à sécher 15 minutes à 37°C.

Par écouvillonnage (méthode de Kirby) : le milieu estensemencé par stries très serrées en 3 passages en faisant pivoter de 60°.

- Les disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose avec une pince métallique stérile.



Figure 4 : Dépôt de disques d'antibiotiques sur Gélose Muller-Hinton

- Les boîtes sont incubées 24 h à 37°C.
- La lecture doit se faire dans les délais recommandés : 18 à 24 heures pour la méthode par diffusion pour les bactéries de croissance rapide et 2 à 3 jours pour les espèces de croissance difficile.
- La zone d'inhibition circulaire est mesurée par le diamètre en millimètres selon divers moyens (règle, compas ou pied à coulisse).

II.2. Speed Mam Color

Speed Mam Color est un test de diagnostic rapide permettant l'identification des bactéries pathogènes responsables de mammites bovines et l'obtention rapide d'un antibiogramme.

Ce test, réalisable dans une structure vétérinaire à partir d'un simple prélèvement de lait suspect, détermine pour les germes présents, un profil d'antibio-sensibilité spécifique en 24h et une identification en 48h.

Speed Mam Color est une réponse individuelle adaptée aux nécessités du terrain : il propose le traitement bactériologique efficace parmi l'arsenal thérapeutique vétérinaire disponible. Ce test prend en compte les effets synergiques ou antagonistes des différents agents pathogènes, pour des concentrations bactériennes supérieures ou égales à 10³ UFC/ml, directement sur le prélèvement de lait infecté.

Le test est constitué d'une galerie de culture avec :

- 14 puits antibiotiques permettant de déterminer le profil de sensibilité des germes présents dans le prélèvement pour 14 molécules (ou associations de molécules) antibiotiques.

- 8 puits pour l'identification des germes présents.
- 2 puits témoins :
 - le puits positif, témoin de croissance bactérienne : le changement de couleur de ce puits correspond à la présence de germes dans le prélèvement à des concentrations supérieures ou égales à 10³ UFC/ml.
 - le puits négatif, témoin négatif : le virage de ce puits pendant le temps de lecture invalide le test.

Analyse : 8 bactéries :

Staphylocoque	Entérocoque
Streptocoque	Entérobactérie
Streptocoque ubéris	Pseudomonas
E. Coli	Mycoplasma

14 antibiotiques et associations :

Amoxicilline + AC.	Marbofloxacine
Clavulanique	Pénicilline +
Ampicilline + colistine	streptomycine
Céfalexine	Spiramycine
Céfoperazone	Sulphadimidine +
Cefquinome	triméthoprime
Cloxaciline	Tétracycline +
Ceftiofur	néomycine + Bacitracine
Gentamicine	Tylosine



Figure 5 : le Speed Mam Color (photo personnelle)

II.2.1. Technique

a. Préparation de la galerie

- Ouvrir le sachet d'une galerie (**Etape 01**), inscrire le nom de l'animal et la date sur l'étiquette adhésive. Retirer l'étiquette autocollante recouvrant la galerie. Coller le bord supérieur long de l'étiquette sur le bord long de la galerie, de manière à accéder à l'ensemble des puits en conservant parallèlement leur identification.

b. Préparation de l'échantillon

-Après homogénéisation du lait dans son flacon, transférer 3 gouttes de lait avec la pipette dans le flacon de Milieu de culture. Homogénéiser le flacon par quelques agitations (**Etape 02**).

c. Ensemencement de la galerie (**Etape 03**)

- Avant l'ensemencement de la galerie, sortir le prélèvement de lait du froid et le laisser pendant 30 minutes à température ambiante (ou dans une étuve à +37°C).

- Ensemencement des puits de la galerie : A l'aide du bouchon compte-goutte inclus, déposer 3 gouttes de ce Milieu de culture ensemencé dans chaque puits.

- Ajouter dans le puits identification STAPH, 2 gouttes du flacon Suppl. Staph.

- Ajouter 2 gouttes d'Huile de paraffine dans chaque puits à l'exception des puits E. COLI, PSEUDO et STAPH.

- Repositionner l'étiquette adhésive sur la galerie, en prenant soin au préalable d'avoir retiré la pellicule transparente au dos de celle-ci, pour une meilleure adhérence.

- Installer la galerie sur le support en carton pour un meilleur contraste de lecture et une température homogène dans tous les puits pendant l'incubation.

d. Mise en culture

- Après ensemencement, mettre immédiatement à incuber la galerie à +37°C en étuve (**Etape 04**).

Les différentes étapes d'application du kit rapide sont présentées sur la figure suivante :

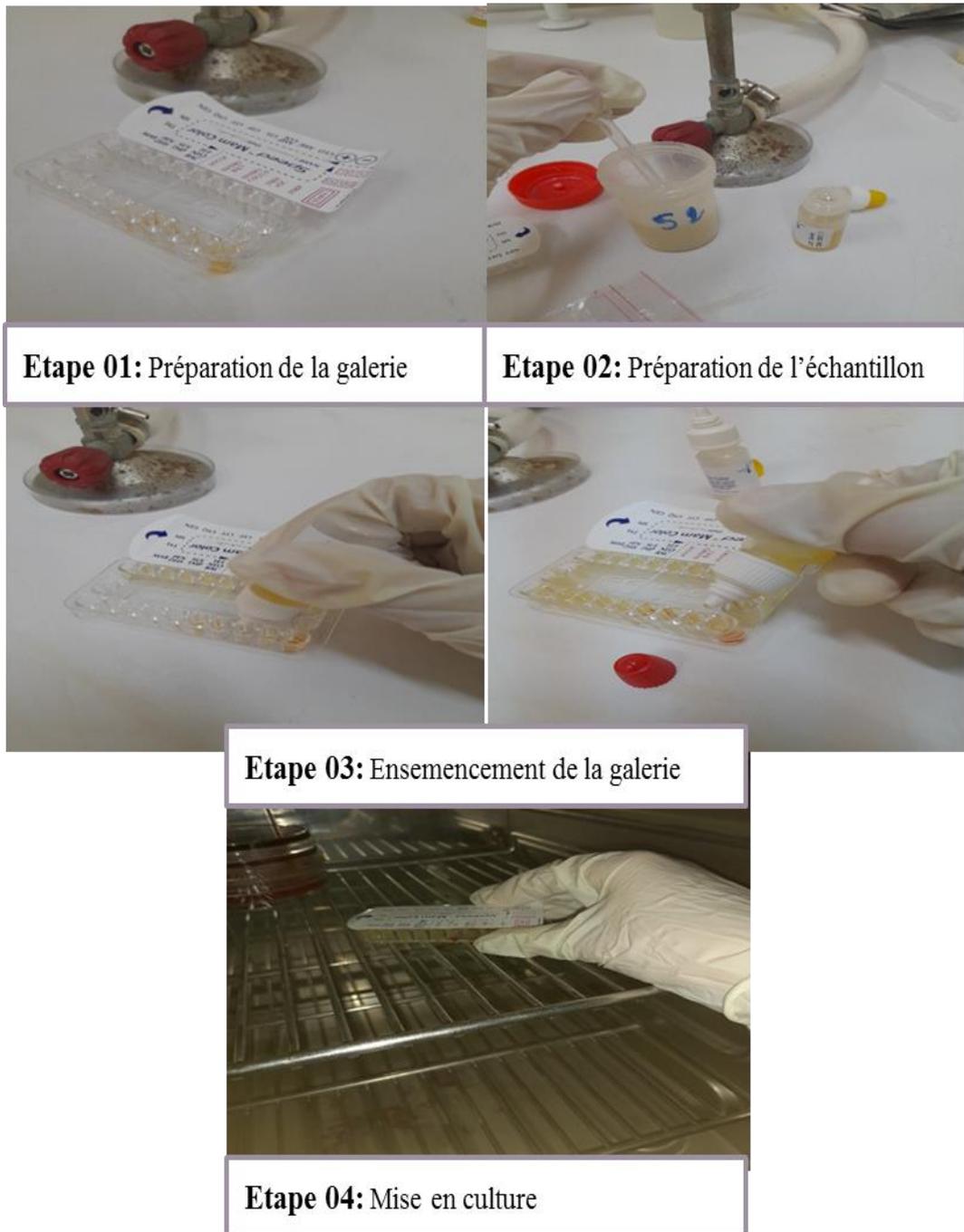


Figure 6 : Technique d'application du kit Mam Speed (photos personnelles)

II.2.2. Lecture

1 - Lecture des puits témoins

Lire les puits témoins après 24 heures d'incubation à +37°C (plus ou moins 2 heures),

- Le puits témoin négatif doit rester incolore

- Si le puits témoin positif + de pousse vire de l'incolore au rouge ou contient des flammèches rouges, ce virage est caractéristique d'une concentration de bactéries supérieure à 103 UFC/ml

- Le prélèvement peut être considéré comme non contaminé par une bactérie pathogène (excepté Mycoplasme) si le puits positif n'a pas viré après 48h d'incubation.

➔ Cas particulier des infections à mycoplasme

Le puits positif+ et les puits antibiotiques de Speed Mam Color ne permettent pas une croissance de *Mycoplasma spp.* La pousse de *Mycoplasma spp.*

Requiert 7 jours de culture à +37°C avec Speed Mam Color et ne peut se réaliser que dans le puits MYCOP.

Pour ces raisons, les puits positifs+ n'est pas un indicateur de la présence ou de l'absence de *Mycoplasma spp.* Dans l'échantillon. De plus, *Mycoplasma spp.* Ne montre aucun profil antibiotique sur la galerie.

2 - Lecture des puits antibiotiques

Lire les puits d'antibiotiques immédiatement après l'interprétation des puits témoins. Ces derniers ne peuvent être interprétés que si le puits contrôle négatif reste incolore et le puits contrôle positif présente une couleur rouge.

- S'il y a aucun changement de couleur : Pas de croissance bactérienne. Bactérie SENSIBLE à l'antibiotique.
- S'il y a un virage au rouge ou présence de flammèches rouges : Croissance bactérienne. Bactérie RESISTANTE à l'antibiotique.

3 - Lecture de l'identification bactérienne

Lire les puits d'identification après 48H d'incubation à +37°C, Seul le puits Mycoplasme ne peut se lire qu'au bout de 7 jours d'incubation à +37°C. Les associations de différents germes sont possibles.

Lors de la lecture de la galerie, une feuille de résultats permet de noter la/les bactérie(s) identifiée(s) et le profil d'antibiorésistance.

• STABILITÉ / CONSERVATION

- Le kit est stable entre $+2^{\circ}\text{C}$ et $+8^{\circ}\text{C}$ pendant 16 mois à partir de la date de fabrication (voir date de péremption sur l'étiquette du kit).

→ Ne pas exposer le kit à des températures inférieures à 0°C .

- Il est conseillé de laisser l'ensemble des réactifs et la galerie au moins 15 min à température ambiante avant utilisation

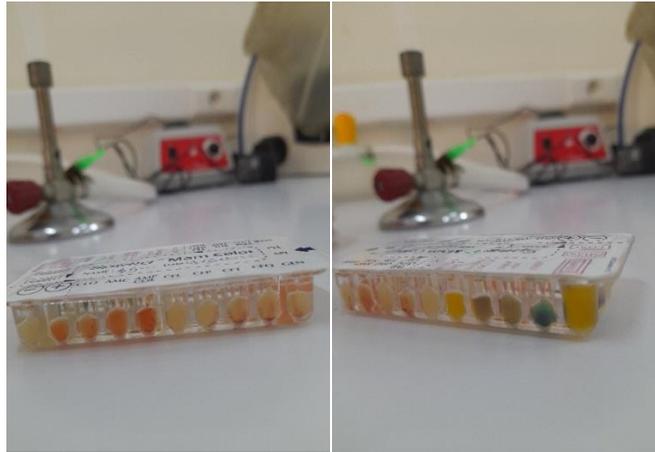


Figure 7 : Changement de couleur des puits de kit signe d'une positivité (photos personnelles)

III. Résultats et Discussion

III.1. Au moyen de la technique classique

III.1.1. Nature et prévalence des germes

A partir de **20** prélèvements de lait positifs, nous avons obtenus **33** isolats, se répartissant comme suit :

⇒ **18** isolats (54,54%) isolats à Gram-

⇒ **15** isolats (45,45%) isolats à Gram+.

La figure 8 représente répartition des germes isolés en fonction de l'examen microscopique.

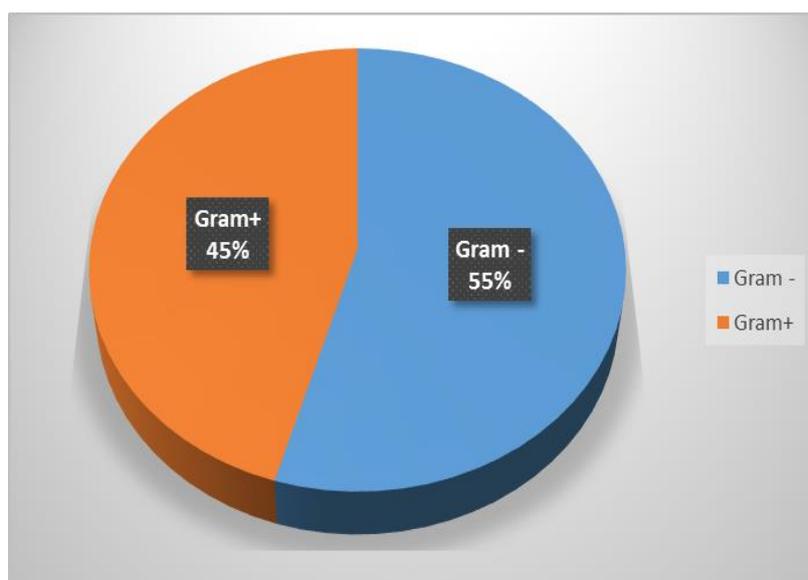


Figure 8 : Répartition des germes isolés en fonction du Gram

Parmi les **18** isolats à Gram-, **3** seulement ont été identifiés comme *E. Coli* ce qui représente un taux d'isolement de 9,09% et **3** isolats *Pseudomonas* avec une fréquence de 9,09% aussi, et **12** autres entérobactéries avec un taux d'isolement de 36,36%

Alors que, pour les Gram+, **2** isolats de *Streptocoque ubéris* seulement ont été identifiés avec une fréquence de 6,06% et **13** isolats de *Staphylococcus aureus* avec une fréquence d'isolement de 39,39%.

Les résultats du tableau 3 présentent les taux d'isollements des différents germes isolés lors de notre recherche.

Tableau 3 : Fréquence d'isolement des différentes espèces bactériennes

Famille	Genre	Nombre d'isolats	Fréquence d'isolement
Enterobacteriaceae	<i>E. coli</i>	3	9,09%
	<i>Pseudomonas</i>	3	9,09%
	<i>Autres entérobactéries</i>	12	36,36%
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	13	39,39%
Streptococcaceae	<i>Streptococcus ubéris</i>	2	6,06%
	Total	33	100%

La figure ci-dessous présente la fréquence des germes en fonction des germes responsables de mammites

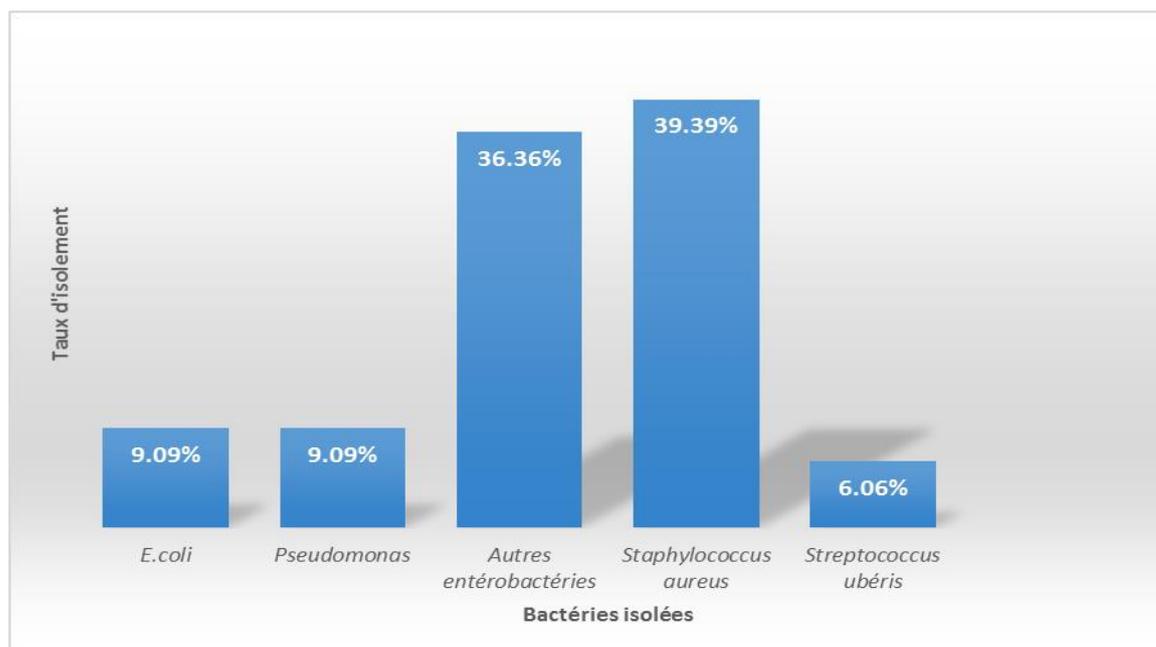


Figure 9 : Fréquence d'isolement des différentes espèces bactériennes

III.1.2. Sensibilité aux antibiotiques

-Par manque de moyen de Culture et de conservation **22** souches sur les **33** isolées seulement ont fait objet d'une étude de la sensibilité aux antibiotiques.

-Et par défaut de disques d'antibiotiques, nous avons testés que la liste suivante :

- **CIP** : ciprofloxacine (fluoroquinolones),
- **TET** : tétracycline (cyclines),
- **GEN** : gentamycine(aminosides)
- **CS** : colistine sulfate(polymixines)
- **OX** : oxacilline(bêtalactamines),
- **E** : érythromycine(macrolides)
- **KF** : cephalothin (céphalosporine 1ère génération)
- **NA** : acide naldixique(quinolones)
- **S10** : streptomycine(aminosides)
- **CZ** : cèfazoline (céphalosporine 1ère génération)
- **C** : chloramphénicol

Les résultats de l'antibiogramme ont montré que :

Le plus haut de résistance a été noté au chloramphénicol (54.55%) et à l'oxacilline (54.55%) avec **12** isolats qui ont présenté une résistance à ses antibiotiques.

Alors que les plus faibles taux de résistance ont été noté à la Gentamicine (4.55%).

Aucune souche n'a présenté une résistance au ciprofloxacine.

L'ensemble des résultats de taux de résistance aux différents antibiotiques testés est présenté sur la figure 10 et le tableau 4.

Tableau 4 : Taux de résistance aux différents antibiotiques

Antibiotiques du kit	CIP	NA	GEN	CS	OX	KF	CZ	TET	S10	E	C
Nombres d'isolats résistants	0	4	1	4	12	9	7	4	3	5	12
Taux de résistance	0%	18.18%	4.5%	18.2%	54.5%	40.9%	31.8%	18.2%	13.6%	22.7%	54.55%

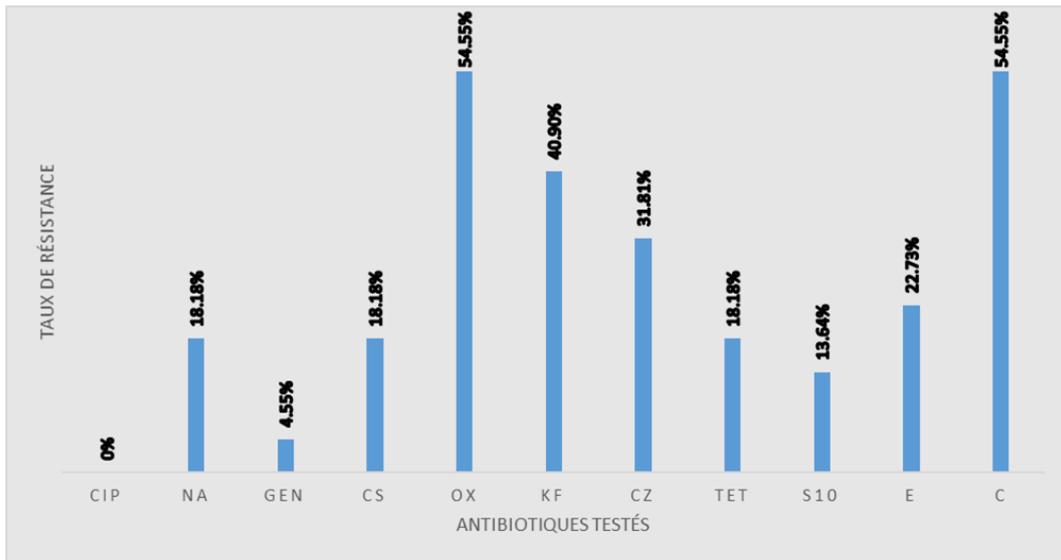


Figure 10 : Taux de résistance aux différents antibiotiques

III.2. Au moyen de kit rapide Speed Mam Color

Contrairement à la technique classique où nous sommes obligés de passer par l'isolement et l'identification des germes avant l'antibiogramme, le kit Speed Mam Color nous permet d'avoir des résultats sur la sensibilité aux antibiotiques 24hs avant l'identification bactérienne.

III.2.1. Nature et prévalence des germes

Les résultats suivants montrent des taux d'identification (Détection) différents pour les principaux germes recherchés lors de notre étude par le kit

Nous avons noté que :

- ⇒ Le plus fort têt de détection de germe a été noté aux Staphylocoques avec un taux d'identification de 30%
- ⇒ Suivie des entérobactéries (autre que *E.coli* et *Pseudomonas*) avec un taux de d'identification 17%
- ⇒ Les Streptocoques, les *Enterococcus*, les *E. coli*, les *Mycoplasme* et *Pseudomonas* ont présenté des fréquences de détection de 16% ,14% ,9% ,7% et 7% respectivement

Les résultats du tableau 5 et la figure 11 présentent les taux de détection des différents germes par l'application de Kit rapide.

Tableau 5 : Fréquence de détection des différentes espèces bactériennes par le Kit

Famille	Genre	Nombre d'isolats	Fréquence d'isolement
Enterobacteriaceae	<i>E. Coli</i>	5	8.77%
	<i>Pseudomonas</i>	4	7.02%
	Autres <i>Entérobactéries</i>	10	17.54%
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	17	29.82%
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	9	15.79%
Enterococcus	<i>Enterococcus</i>	8	14.04%
Mycoplasma	<i>Mycoplasma</i>	4	7.02%
Total		57	100.00%

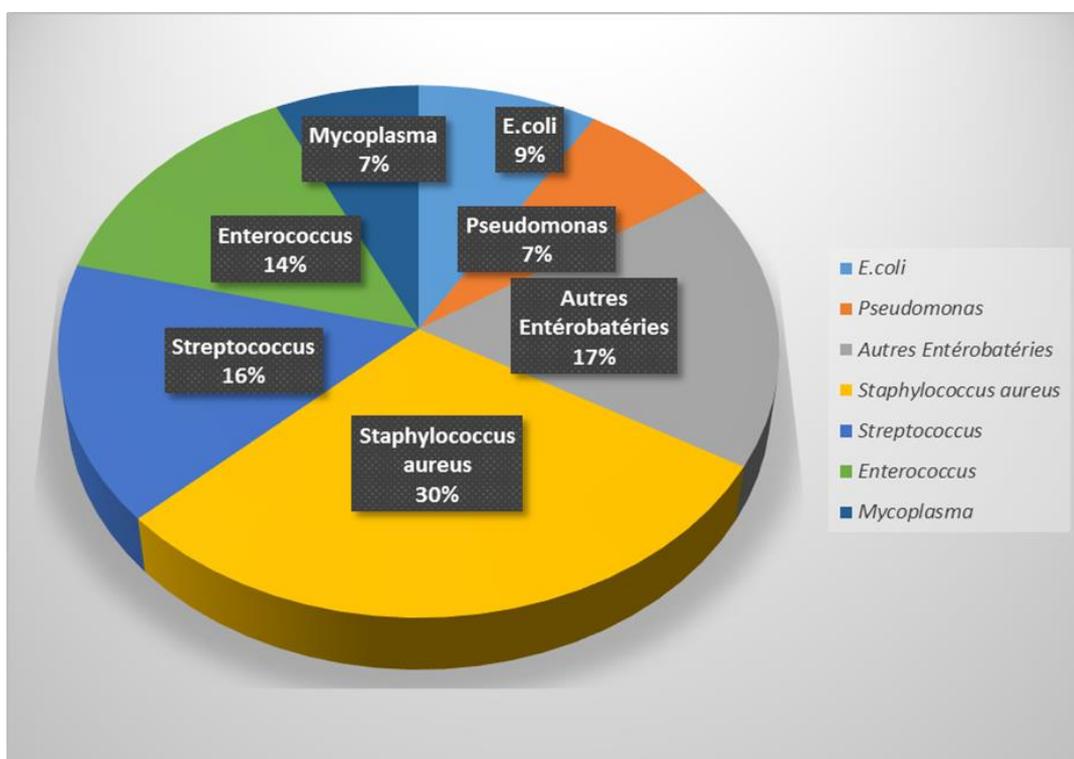


Figure 11 : Fréquence de détection des différentes espèces bactériennes par le Kit

Tableau 6 : Identification des germes responsables de mammite par le Speed Mam Color

Les Prélèvements	My coplasme	Entero bacterie	Ent ero coccus	Streptoc oque	Streptoc oque	Staphyloc oque	Pseudom onas	Es cher ichi a coli
				+ESC				
P1	+	+	+	+	+	+	+	-
P2	+	+	+	+	+	+	-	-
P3	-	+	+	+	+	+	+	-
P4	-	+	-	-	-	+	-	-
P5	-	+	-	-	-	+	-	-
P6	-	+	-	-	-	+	-	-
P7	-	+	-	-	-	+	-	-
P8	-	+	+	+	+	+	-	-
P9	-	+	-	-	-	-	-	-
P10	-	+	-	-	-	+	-	-
P11	-	+	-	-	+	+	-	+
P12	-	+	-	-	-	+	-	-
P13	-	+	-	-	-	+	-	-
P14	-	+	-	-	-	+	-	-
P15	-	+	+	+	+	+	+	-
P16	+	-	+	+	+	+	-	-
P17	+	+	+	+	+	+	-	+
P18	-	+	+	+	+	+	+	+
P19	-	+	-	-	-	-	-	+
P20	-	+	-	-	-	-	-	+

III.2.2. Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme observé par application de kit rapide ont révélé des niveaux de résistance variables aux différents antibiotiques.

Le plus haut taux de résistance a été noté aux cloxacilline et à la spiramycine (40%), suivi d'une résistance au tylosine avec un niveau de résistance de 35%.

La résistance aux différentes associations (ampicilline + colistine), (pénicilline + streptomycine) et (tétracycline + néomycine + bacitracine) est de 25%, la résistance aux céfoperazone, ceftiofur, cefquinome, l'association (amoxicilline + acide clavulanique) et (sulfonamide + triméthoprime) est de 20% et en dernier la résistance aux céfalexine et marbofloxacin est de 15%.

Tableau 7 : Taux de résistance aux différents antibiotiques

Antibiotiques testés	CLO	AMC	AMP/ COL	CFL	CFP	CFT	CFQ
Nombre d'isolats Résistantes	8	4	5	3	4	4	4
Taux de résistance	40.00%	20.00%	25.00%	15.00%	20.00%	20.00%	20.00%

Antibiotiques testés	GE N	SPI	TYL	MA R	PEN/DH S	SUL/TM P	TET/NEO/ BAC
Nombre d'isolats Résistantes	6	8	7	3	5	4	5
Taux de résistance	30.0 0%	40.0 0%	35.0 0%	15.0 0%	25.00%	20.00%	25.00%

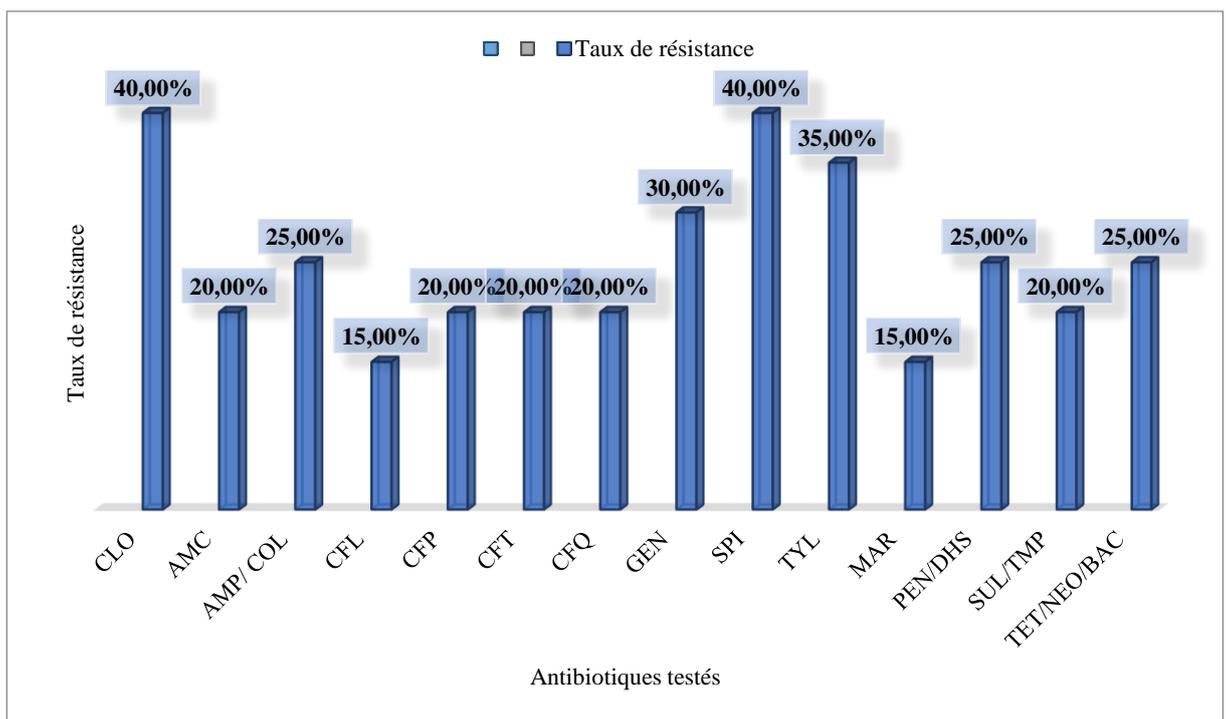


Figure 12 : Taux de résistance aux différents antibiotiques

CLO : cloxacilline (bêtalactamines) ; **AMC** : amoxicilline+ acide clavulanique (bêtalactamines) ; **AMP COL** : ampicilline + colistine (bêtalactamines +polymixines) ; **CFL** : céfalexine (céphalosporine 1ere génération) ; **CFP** : céfoperazone (céphalosporine 3eme génération) ; **CFT** : ceftiofur (céphalosporine 3eme génération) ; **CFQ** : cefquinome (céphalosporine 4eme génération) ;**GEN** : gentamicine (aminosides) ; **SPI** : spiramycine (macrolides) ; **TYL** : tylosine (macrolides) ; **MAR** : marbofloxacin (fluoroquinolones) ; **PEN DHS** : pénicilline + streptomycine (bêtalactamines + aminosides) ; **SUL TMP** : sulfonamides + triméthoprime (sulfamides + Diamino pyrimidines) ; **TET NEO BAC** : tétracycline + néomycine + bacitracine (cyclines +aminosides +polypeptides)

III.2. Comparaison des deux techniques

Nous avons constaté que les taux d'identifications des différents germes varient selon la technique utilisée. Selon l'OIE, les résultats d'analyse bactériologique d'une maladie animale dépendent essentiellement de la nature et de l'adéquation des échantillons collectés pour l'analyse et de la technique utilisée (OIE, 2018).

Dans notre étude, le taux d'identification et de détection des *E. Coli*, *Pseudomonas* et des *Staphylocoques* est presque le même par les deux techniques (le kit et la technique classique).

Par contre le taux de détection de Streptocoque est meilleur par le kit (15,79%) que par la technique classique (6,06%), aussi pour le taux de détection d'*Enterococcus* qui est de 14,04% par le kit alors qu'elles ne sont pas détectées par la technique d'identification classique et même pour les mycoplasmes qu'ils sont détectés que par le kit avec un pourcentage de 7,02%.

Les résultats du tableau 8 présentent la comparaison des résultats d'identification bactérienne.

Tableau 8 : Comparaison des résultats d'identification bactérienne

Genre	Kit Speed Mam Color	Classique
<i>E. coli</i>	8.77%	9.09%
<i>Pseudomonas</i>	7.02%	9.09%
<i>Autres Entérobactéries</i>	17.54%	36.36%
<i>Staphylococcus aureus</i>	29.82%	39.39%
<i>Streptococcus</i>	15.79%	6.06%
Enterococcus	14.04%	0
Mycoplasma	7.02%	0

Donc on constate que l'identification des bactéries par les moyens classiques permet au biologiste ou au technicien de laboratoire de déterminer les différents caractères morphologiques, cultureux et biochimiques des bactéries inconnues et aussi de faire toutes les statistiques des résultats obtenus c'est-à-dire les calculs des

résultats positifs, négatifs et contaminants la répartition des souches isolées selon l'espèce.

Malheureusement, nos vétérinaires praticiens sont très mal formés en bactériologie pratique, l'application des différentes étapes de diagnostic bactériologique reste difficile pour eux. Par contre, le kit de détection rapide est très facile à appliquer.

Par rapport aux résultats de la sensibilité aux antibiotiques, les disques d'antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme classique sont utilisés selon les recommandations de CASFM et EUCAST.

On remarque que l'antibiogramme par la méthode de diffusion en gélose utilisant des disques chargés d'antibiotiques est une excellente méthode, mais nécessite une bonne standardisation. Il faut faire très attention aux principaux pièges de cette méthode qui sont la densité de l'inoculum et la bonne conservation des disques, en particulier pour les bêtalactamines.

En plus de la rapidité d'application de l'antibiogramme par le kit (24H au max), les antibiotiques choisis sont les plus utilisés par les vétérinaires sur le terrain ; Ce qui facilite la tâche des vétérinaires pour le choix de traitement au cas d'une sensibilité

- ⇒ Ce kit est Conçu spécifiquement pour le vétérinaire, il fournit un antibiogramme directement à partir de l'échantillon prélevé.
- ⇒ Il fournit les résultats d'antibiogramme avant l'identification bactérienne dans le but d'établir une prescription raisonnée et de traiter rapidement.
- ⇒ Lors d'un **échec thérapeutique ou d'une récurrence**, Speed Mam Color permet de réaliser un diagnostic étiologique précis et de déterminer le profil de **résistance aux antibiotiques**.

Conclusion et recommandations

Conclusion générale

L'identification et l'antibiogramme des souches sont des étapes manuelles au niveau des moyens classiques par contre, au niveau des moyens rapide ce sont des nouvelles techniques faciles à pratiquer et rapides, par l'utilisation des kits comme le Speed Mam Color.

Les moyens classiques restent très importants au laboratoire d'analyse pour l'identification et l'antibiogramme malgré les nouvelles techniques qui peuvent les remplacer essentiellement à cause de leurs rapidités.

Au cours de notre étude, l'identification et l'antibiogramme par les moyens classiques et par le kit rapide à montrer que malgré qu'il y ait une différence entre les deux techniques mais les deux restent fiables

Le vétérinaire doit garder la maîtrise de l'identification bactérienne avec deux étapes fondamentales : un bon isolement et un suivi rigoureux de la technique d'identification employée.

L'utilisation de kit rapide d'antibiogramme et d'identification bactérienne est très utile et permet au vétérinaire de réaliser une prescription raisonnée et traiter rapidement avant même l'identification bactérienne.

Références bibliographiques:

- **Aghamohammadi, M.; Haine, D.; Kelton, D.F.; Barkema, H.W.; Hogeveen, H.; Keefe, G.P.; Dufour, S., 2018.** Herd-Level Mastitis-Associated Costs on Canadian Dairy Farms. *Front. Vet. Sci.* 2018, 5, 100. [CrossRef] [PubMed]
- **Alexandre A, 2005:** "Utilisation des comptages cellulaires dans La comparaison de deux préparations hors lactation". Thèse pour obtention de grade de Docteur Vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire de Lyon, (2005).
- **Banaiee N, Bobadilla-Del-Valle M, Bardarov S, Riska PF, Small PM, Ponce-De-Leon A, et al.,2001:** Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2001 ;39: 3883–3888. doi :10.1128/JCM.39.11.3883-3888.2001
- **Barnum, D.A.; Newbould, F.H.** The Use of the California Mastitis Test for the Detection Of Bovine Mastitis. *Can. Vet. J.* 1961, 2, 83–90.
- **Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M.,1996:** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966 ;45: 493–496. 46. Haenni M, Jouy E, Morignat E, Madec J-Y. Amélioration du référentiel vétérinaire français (CA-SFM vétérinaire) pour la validation des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé. *Cah Réf.* 2011; 10–12.
- **Burucoa, 2007:** chapitre5, identification bactérienne. Livre de microbiologie ,édition paris.
- **Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV.,2015:** Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015 ;13: 42–51.
- **Brown DF, Brown L.,1991:** Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother.* 1991 ;27 : 185–190.
- **Bouaziz.O ,2005 :** Contribution à l'étude des infections intramammaires de la vache laitière dans l'Est Algérien. Thèse Doctorat, Univ, mentouri de constantine.

- **Bouaziz.O , 2020** : étude générale des mammites des vaches laitières, Cours Pathologie de la Reproduction A4 2020-2021
- **Brognier Dominique** : PathoBetOnline
- **CASFM. Recommandations ,2013** : du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2013 p. 60.
- **Cai HY, Archambault M, Gyles CL, Prescott JF.** : Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. *Anim Health Res Rev.* 2003 ;4: 73–93. 39.
- **Harisberger M, Gobeli S, Hoop R, Dewulf J, Perreten V, Regula G.** Antimicrobial resistance in Swiss laying hens, prevalence and risk factors. *Zoonoses Public Health.* 2011 ;58: 377–387. doi :10.1111/j.1863-2378.2010.01376.x
- **Cassini et al.,2019:** « Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis », *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 19, no 1, p. 56-66, doi: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
- **Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ.,1991:** Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1991 ;29: 2197–2203.
- **Cochetti I, Tili E, Mingoia M, Varaldo PE, Montanari MP.** erm(B)-carrying elements in tetracycline-resistant pneumococci and correspondence between Tn1545 and Tn6003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 ;52: 1285–1290. doi :10.1128/AAC.01457-07
- **Dahyot et al., 2017:** Description et place des techniques bactériologiques dans la prise en charge des infections pulmonaires, published online 5 Jul 2017. French. DOI.
- **Dingwell, R.T.; Leslie, K.E.; Schukken, Y.H.; Sargeant, J.M.; Timms, L.L.,2003:** Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *Can. Vet. J.* 2003, 44, 413–415.
- **Demoré B, Grare M, Duval R.,2012** : Pharmacie clinique et thérapeutique 4ème édition. Chapitre 40 : Généralités sur les antibiotiques par voie systémique et principes d'utilisation. Elsevier Masson ; 2012
- **Dossier de presse-antibiorésistance, site sante publique France. Fr**

- **Ericsson HM, Sherris JC.,1971:** Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol. 1971 ;217: Suppl 217 :1+.
- **E. Tacconelli,2017:** « Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. »
- **Fehlberg LCC, Nicoletti AG, Ramos AC, Rodrigues-Costa F, de Matos AP, Girardello R, et al.,2000 :** In vitro susceptibility of Burkholderia cepacia complex isolates : comparison of disk diffusion, Etest®, agar dilution, and broth microdilution methods. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016 ;86 : 422–427. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.015
- **Flandrois JP,2000 :** Bactériologie Médicale. Coll Azay. Puf. 2000.
- **Ge B, Bodeis S, Walker RD, White DG, Zhao S, McDermott PF, et al.,2002:** Comparison of the E test and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of Campylobacter. J Antimicrob Chemother. 2002 ;50 : 487–494.
- **Heart T. Shears P.,2006 :** Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences-Flammarion. 2006
- <http://www.antibiotique.eu/expeacuterience-antibiogramme.html#ixzz7fbyri4oV>
- **Howell M, Wirz D, Daniels AU, Braissant O.,2012:** Application of a microcalorimetric method for determining drug susceptibility in mycobacterium species. J Clin Microbiol. 2012 ;50: 16–20. doi :10.1128/JCM.05556-11
- **Huang MB, Baker CN, Banerjee S, Tenover FC.** Accuracy of the E test for determining antimicrobial susceptibilities of staphylococci, enterococci, Campylobacter jejuni, and gramnegative bacteria resistant to antimicrobial agents. J Clin Microbiol. 1992 ;30: 3243–3248.
- **Harisberger.,2008:** Immuno-analyse & Biologie Spécialisée. 2008 Oct.; 23(5): 260–279. Published online 2008 sept. 23. French. DOI: [10.1016/j.immbio.2008.07.016](https://doi.org/10.1016/j.immbio.2008.07.016).
- **J. Acar et B. Röstel.,2001,** « Antimicrobial resistance: an overview », Rev Sci Tech, vol. 20, no 3, p. 797-810, doi: 10.20506/rst.20.3.1309.
- **Jorgensen JH, Ferraro MJ.,2009:** Antimicrobial susceptibility testing: à review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 ;49: 1749– 1755. doi :10.1086/647952

- **Lucie Mangin,2016** : Antibiotiques et résistances : enquête sur les connaissances et les comportements du grand public. Sciences pharmaceutiques. 2016. fahal-01734015f
- **Lemée *et al.*, 2022**: Principe et limites des nouveaux outils de biologie moléculaire dans le diagnostic microbiologique. Revue francophone des laboratoires, Avril 2022, pages 28-42.
- **Martel, J.R.F. Tardy, P. SANDERS and W.D. BLACK.,1991**: J Am vet med assoc 198(5) 816-9.
- **Manner Y., 2001** : "Méthodes de bactériologie des mammites cliniques, Bibliographie, étude expérimentale d'un test bactériologique rapide : le sensitivet mam color". Thèse pour le diplôme d'état de docteur vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire de Nantes, (2001).
- **Merle, R.; Schroder, A.; Hamann, J., 2007**: Cell function in the bovine mammary gland: A preliminary study on interdependence of healthy and infected udder quarters. J. Dairy Res. 2007, 74, 174–179. [CrossRef] [PubMed]
- **M. Colomb-Cotin, J. Lacoste, C. Brun-Buisson, V. Jarlier, B. Coignard, et S. Vaux., 2016**: « Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012 », Antimicrob Resist Infect Control, vol. 5, p. 56, doi: 10.1186/s13756-016-0154-z
- **Montanari MP, Cochetti I, Mingoia M, Varaldo PE., 2003**: Phenotypic and molecular characterization of tetracycline- and erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2003 ;47: 2236–2241.
- **Norberg, E.,2005**: Electrical conductivity of milk as a phenotypic and genetic indicator of bovine mastitis: A review. Livest. Prod. Sci. 2005, 96, 129–139. [CrossRef]
- **OIE,2008** : Méthodes de laboratoire utilisées pour les essais d'antibiorésistance. Manuel terrestre de l'OIE 2008. 2008. pp. 61–71.
- **Pagé, 2021** : Influence de la production laitière sur l'évolution pondérale des vaches et des veaux. Mémoire de diplôme d'étude approfondie de production animal, université cheik Anta Diop de DAKAR.13-14P.
- **Rattez, 2017, :** Les bactéries de la mammité Un mariage complexe I septembre 2010 (PDF).

- **Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ.** Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009 ;49: 1749– 1755. doi :10.1086/647952
- **Ruegg, P.L. A 100-Year Review.,2017:** Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* 2017, 100, 10381–10397. [CrossRef]
- **Sehad.K., 2022 :** Pertes économiques causées par les mammites aux élevages de bovins laitiers. Projet de master, université de Tizi Ouzou.
- **Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, et al.,2016:** Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet Microbiol.* 2010 ;141: 1–4. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.013 163
- **Van Belkum A, Dunne WM., 2013:** Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2013 ;51 : 2018–2024. doi :10.1128/JCM.00313-13
- **Von Ah U, Wirz D, Daniels AU.,2009 :** Isothermal microcalorimetry, a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC Microbiol.* 2009 ;9 : 106. doi :10.1186/1471-2180-9-106
- **Wallace J ,2007 :** "Diagnostiquer la mammite". *Le producteur de lait québécois* septembre, (2007), 47-49 p.Ogier J.C., "Une nouvelle méthode pour identifier les bactéries dans le lait" « <http://www.inra.fr> », (2006).
- **Wethal, K.B.; Svendsen, M.; Heringstad, B. A.;2020:** genetic study of new udder health indicator traits with data from automatic milking systems. *J. Dairy Sci.* 2020, 103, 7188–7198. [CrossRef] [PubMed]
- **Wiegand I, Hilpert K.,2008:** Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008 ;3: 163–175. doi :10.1038/nprot.2007.521
- **Wilson SM, al-Suwaidi Z, McNerney R, Porter J, Drobniewski F.,1997:** Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med.* 1997 ;3: 465–468.
- **Zoetis,2020 :** actualités le 13 novembre 2020