

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEES

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat
EN MICROBIOLOGIE
Option: Microbiologie Appliquée

THEME

**Identification et profil de résistance de *Serratia marcescens*
aux antibiotiques**

Présentée par **BATAH Rima**

Devant le JURY

Directrice de thèse:	Pr. BOUTEFNOUCHET Nafissa	Université d'Annaba
Présidente de jury:	Pr. CHETTIBI Houria	Université d'Annaba
Examineur:	Pr. DJAHOUDI Abdelghani	Université d'Annaba
Examineur:	Pr. BENOURETH Djamel Eddine	Université de Guelma
Examinatrice:	MC_A. GARARA Nadjoud	Université de Guelma

Année universitaire: 2015-2016

Remerciements

Remerciant tout d'abord le bon dieu tout puissant de m'avoir donné la force de réaliser ce travail.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse **Professeur BOUTEFNOUCHET Nafissa** de m'avoir confié ce sujet et accepté de diriger cette thèse, ainsi pour le temps qu'elle m'a accordé. Veuillez recevoir mes sincères remerciements et toute ma reconnaissance.

Un merci tout particulier au **Professeur Jean Marc ROLAIN** de m'avoir recueilli dans son laboratoire de microbiologie à la faculté de médecine et de pharmacie de l'université d'Aix Marseille–France et m'avoir immédiatement accordé sa confiance. Je vous remercie pour vos conseils avisés, vous avez toujours été disponible et à l'écoute, je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris avec toute votre équipe de recherche.

Je tiens à remercier également:

Mme. Houria CHETTIBI, Professeur à l'université d'Annaba qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury d'examen de cette thèse. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

Mr. BENOUARETH Djamel Eddine, Professeur à l'université de Guelma qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre de jury de cette thèse. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

Mr. DJAHOUDI Abdelghani, Professeur à l'université d'Annaba qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre de jury de cette thèse. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

Mlle. GARARA Nedjoud, Maitre de conférences de classe A à l'université de Guelma qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre le jury d'examen de cette thèse. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner:

ALLAG Hammoudi, Maître assistant de microbiologie à la faculté de médecine de Constantine qui m'a ouvert les portes de son laboratoire de microbiologie à l'établissement hospitalisé spécialisé DAKSI de Constantine.

Le **Docteur LOUCIF Lotfi**, Maître de conférences de classe B à l'université de BATNA pour les nombreuses et toujours fructueuses discussions. Travailler avec vous a été un réel plaisir! Merci de m'avoir fait partager votre expérience acquise et votre collaboration.

Merci à toute l'équipe du laboratoire 49 au département de biochimie à l'université Badji Mokhtar ANNABA en particulier les techniciens Saida et Lazher pour leur gentillesse ainsi qu'à toute l'équipe de l'URMITE de la faculté de médecine et de pharmacie d'AIX Marseille–France pour l'ambiance de travail. Je remercie également toute personne ayant participé, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je salue en particulier, les doctorantes et amies; MERADJI Sameh, MELLOUK Fatma Zohra, NEGhra Nedjet et ALIOUA Souad avec lesquelles j'ai partagé les mêmes joies et les mêmes angoisses inhérentes à la vie de thésard, mais également d'excellents moments de détente.

A ma famille et à mes amies qui, de près comme de loin, m'ont encouragée aux moments opportuns.

À mes parents, pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez données, m'avoir encouragés et accompagnés dans mes études, avoir toujours cru en mes choix, pour votre soutien tout au long de l'élaboration de cette thèse, ainsi que pour vos encouragements durant tout mon parcours vers un avenir meilleur. Je vous remercie du fond du cœur.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes chers frères Mohamed lamine et Rami et à la lumière de ma vie ma chère sœur Rania pour leur complicité et leurs encouragements.

Enfin, mes plus grands remerciements vont à mon merveilleux époux pour son soutien quotidien, ses encouragements, sa collaboration dans ce travail et son assistance morale qui m'a permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, Je ne te remercierais jamais assez...

Merci à tous.....

Dans la vie, il y a trois facteurs: le talent, la chance, le travail. Avec deux de ces facteurs, on peut réussir. Mais l'idéal est de disposer des trois.

BERNARD WERBER

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Partie I: Etude bibliographique

1. Historique de la taxonomie de l'espèce <i>Serratia marcescens</i>	4
2. Habitat.....	6
3. Caractères bactériologiques.....	6
4. Facteurs de pathogénicité.....	9
4.1. Produits extracellulaire.....	10
4.2. Adhérence et hydrophobicité	10
4.3. Lipopolysaccharide	11
5. Epidémiologie.....	11
6. Infections nosocomiales liées à <i>S. marcescens</i>	14
7. Résistance de <i>Serratia marcescens</i> aux antibiotiques.....	15
7.1. Résistance naturelle.....	15
7.2. Résistance acquise.....	16
8. Mode d'action des antibiotiques.....	17
8.1. Mode d'action des β -lactamines.....	18
8.2. Mode d'action des aminosides	18
8.3. Mode d'action des quinolones.....	18
9. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	19
9.1. Mécanisme de résistance enzymatique inactivant les antibiotiques.....	19
9.2. Altération de la perméabilité de la membrane externe.....	26
9.3. Modification de la cible.....	27
10. Support génétiques et éléments mobiles de la résistance aux antibiotiques.....	29
11. Méthode de typage des <i>S. marcescens</i>	30

Partie II: Matériel et méthodes

1.	Isolement des souches bactériennes.....	33
2.	Identification des souches étudiées.....	33
2.1.	Système API20E.....	33
2.2.	Spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex).....	34
3.	Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	36
3.1.	Technique de diffusion sur milieu gélosé.....	36
3.2.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par E-test.....	37
4.	Recherche phénotypique de la production des BLSE.....	38
4.1.	Milieu chromogène ESBL (Biomerieux).....	38
4.2.	Test de synergie.....	39
5.	Recherche moléculaire des gènes de résistance.....	39
5.1.	Extraction de l'ADN bactérien	39
5.2.	Polymerase Chain Reaction (PCR) standard.....	40
6.	Analyse des produits de l'amplification.....	43
6.1.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	43
7.	Séquençage.....	44
8.	Analyse des séquences d'ADN.....	46
9.	Expérience de la conjugaison et le transfert de la résistance.....	47
10.	Extraction et analyse du plasmide.....	49
10.1.	Détermination du groupe d'incompatibilité des plasmides.....	51
11.	Arbre phylogénétique.....	53

Partie III: Résultats et discussion

Résultats

1. Isolement des souches bactériennes.....	55
1.2. Répartition des souches selon la pigmentation.....	55
2. Identification des souches isolées.....	56
2.1. Identification par API20E.....	56
2.2. Identification par MALDI-TOF MS.....	56
2.3. Répartition des souches selon le sexe.....	59
2.4. Répartition des patients selon l'âge.....	60
2.5. Répartition selon la nature de prélèvement.....	61
2.6. Répartition selon le service.....	61
3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	62
3.1. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion sur gélose.....	62
3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	65
4. Phénotype de résistance de aux antibiotiques de <i>S. marcescens</i>	66
4.1. Recherche phénotypique des BLSE.....	66
4.2. Phénotype de résistance aux aminosides.....	69
4.3. Phénotype de résistance aux quinolones.....	70
4.4. Phénotype de la co-résistance des <i>S. marcescens</i> aux antibiotiques.....	70
5. Recherche moléculaire de la résistance aux β -lactamines.....	72
5.1. Profil moléculaire des gènes codant pour les β -lactamases,.....	72
6. Recherche moléculaire de la résistance aux aminosides.....	77
6.1. Enzymes modificatrices des aminosides.....	77
6.2. 16S ARNr méthyltransphérases.....	77
7. Recherche moléculaire de la résistance aux quinolones.....	81
8. Recherche moléculaire de la co-résistance aux antibiotiques.....	81
9. Conjugaison bactérienne des souches de <i>S. marcescens</i>	85
10. Analyse du plasmide.....	89
11. Détermination des groupes d'incompatibilité des plasmides.....	89
12. Génotypage.....	90
Discussion.....	94
Partie IV: Conclusion et perspectives.....	108
Références bibliographiques.....	111
Résumé.....	139
Annexes.....	142

Liste des abréviations

- 16S:** Svedberg (vitesse de sédimentation)
- 30S:** Ribosome bactérien
- A:** Adénine (base azotée)
- AAC:** Aminoglycoside acetyltransferases
- AAD:** Aminoglycoside adenytransferase
- AARN:** Réseau National de Surveillance de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques
- ACT:** Gène codant pour une céphalosporinase
- ADH:** Arginine dihydrolase
- ADN:** Acide desoxyribonucléique.
- AHL:** Acyl homosérine lactone
- AME:** Aminoglycosides modifying enzymes
- AmpC:** Bêta-lactamase chromosomique
- ANT:** Nucléotidyltransférase
- APH:** Phosphotransférase
- API 20E:** Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)
- ArmA:** Aminoglycoside resistance methylase
- ARN:** Acide ribonucléique
- ARNr:** Acide ribonucléique ribosomique
- ATP:** Adénosine Triphosphate
- ATCC:** American Type Culture Collection
- Azide R:** Résistant à l'azide
- BES:** Brazilian Extended Spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu)
- BET:** Bromure d'éthidium
- BGN:** Bacilles à Gram négatif
- BLAST N:** Basic Local Alignment tool Nucléotide
- BLAST:** Basic Local Alignment tool
- BLSE:** β -lactamase à spectre étendu
- BMR:** Bactérie multi-résistante
- C:** Cytosine (base azotée)

CG%: Pourcentage en guanine et cytosine du génome (coefficient de Chagraff)

C3G: Céphalosporine de troisième génération

CA-SFM: Comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie

CHU: Centre hospitalier universitaire

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CMY: Céphamycinase (gène codant pour une céphalosporinase plasmidique)

CTX-M: Céfotaxime Munich

DHA: Gène codant pour une céphalosporinase

Dnase: Désoxyribonucléase

EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique

ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- Polymerase chain reaction

ESBL: Extended spectrum beta-lactamase

F: Forward

FOX: Gène codant pour une céphalosporinase

G: Guanine (base azotée)

GES: Guyana extended spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu)

gyrA: Gene encoding the enzyme; DNA gyrase

gyrB: Gene encoding the enzyme; DNA gyrase

H: Heures

H2O UP: Eau Ultra-Pure

H2S: Hydrogen Sulfide

HasA: Protéine sécrétée par *Serratia marcescens*

HCCA: Acide-a-cyano-4-hydroxycinnamique

HPLC: Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

IM: Imipéménase (carbapénémase)

In: Intégrons

Inc L/M: Groupe d'incompatibilité du plasmide

IR: Séquences répétées inversées

IS: Séquences d'insertion

K: antigène capsulaire

Kb: Kilobases

kDA: Kilodalton

KPC: *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

LB: Lauria Bertani

LDC: Lysine décarboxylase

LPS: Lipopolysaccharide

Lux: Promoteur du Quorum sensing

M: Marqueur

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry

MBL: Métallo- β -lactamase

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MEV: MultiExperiment Viewer

MH: Mueller Hinton

MLST: Multi-locus sequence type

MLSA: Multi-locus sequence analysis

MS: Microflex

MSP: Mean spectra projection

NCBI: Genome database of the National Center for Biotechnology Information

NDM: New Delhi metallo- β -lactamase

O: Antigène somatique

ODC: Ornithine Decarboxylase

ONPG: L'orthonitrophényl- β -galactoside

OXA-48: Oxacillinase (carbapénémase)

parC: Gene encoding the enzyme; topoisomerase IV

parE: Gene encoding the enzyme; topoisomerase IV

Pb: Paires de bases

PCR: Polymerase chain reaction

PER: *Pseudomonas* extended resistance (une bêtalactamase à spectre étendu)

PFGE: Pulsed Field Electrophoresis Gel

pH: Potentiel hydrogène

PLP: Protéines de liaison aux pénicillines

PSM: Poste de Sécurité Microbiologique

qnr: Quinolone resistance gene

QS: Quorum sensing

R: Reverse (inverse)

RADP: Random Amplification of Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

Rmt: ARNr 16S méthyltransférase

RNA: Ribonucleic acid

RPM: Rotation par minute

SHV: Sulfhydryl variable

SME: *Serratia marcescens* enzyme (β -lactamase)

spp: Species (espèces)

subsp: Sous-espèce

TBE: Tris-Borat-EDTA

TDA: Tryptophan Deaminase

TEM: Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée

TFA: Acide TriFluorocétique

TSAR: La surveillance de la résistance aux antibiotiques Taïwanaise

TSB: Trypto-caséine soja

UFC: Unité Formant Colonie

UV: Ultra-violet

V: Volt

VEB: Vietnam Extended Spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu)

VIM: Verona Imipéménase (carbapénémase)

VP: Réaction de Voges-Proskauer

Liste des tableaux

Tableau1	Caractères biochimiques et cultureux d'identification des espèces du genre <i>Serratia</i>	8
Tableau2	Epidémiologie moléculaire des BLSE chez <i>S. marcescens</i> (non exhaustive)	20
Tableau3	Epidémiologie des carbapénèmases chez <i>S. marcescens</i> (non exhaustive)	23
Tableau4	Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standard	41
Tableau5	Amorces utilisées pour les PCR standard et séquençage utilisées pour les souches de <i>S. marcescens</i>	42
Tableau6	Composition du mélange réactionnel pour la PCR BigDye	45
Tableau7	Programme de l'amplification de la PCR Big Dye	45
Tableau8	Les amorces utilisées dans l'analyse du plasmide	52
Tableau9	Les amorces utilisées pour le multilocus sequencing analysis de <i>S. marcescens</i>	54
Tableau10	Provenance des 54 souches de <i>S. marcescens</i> isolées et leurs scores MALDI-TOF-MS	58
Tableau11	Pourcentage de la résistance de <i>S. marcescens</i> en fonction de leur distribution	64
Tableau12	Phénotype de résistance des souches de <i>S. marcescens</i> aux β -lactamines	68
Tableau13	Phénotype de résistance aux aminosides	70
Tableau14	Profil moléculaire des 35 souches de <i>S. marcescens</i> productrices de BLSE	76
Tableau15	Profil moléculaire des 35 souches de <i>S. marcescens</i> productrices d'enzymes modificateuses des aminosides et 16S ARNr méthyltransphérasés	80
Tableau16	Profil moléculaire des 35 souches de <i>S. marcescens</i> résistantes aux fluoroquinolones	83

Liste des figures

Figure1	Site d'action des différents types d'antibiotiques	17
Figure2	Les enzymes modificatrices des aminosides	25
Figure3	Schéma des mécanismes de résistance aux quinolones et fluoroquinolones	28
Figure4	Schéma explicatif de la disposition des souches sur le milieu sélectif	49
Figure5	Souche N° 50 de <i>S. marcescens</i> productrice de prodigiosine sur gélose MacConkey à température ambiante	55
Figure6	Répartition de <i>S. marcescens</i> selon la pigmentation (Prodigiosine)	56
Figure7	Exemple des scores d'identification bactérienne des souches de <i>S. marcescens</i> obtenue par le MALDI-TOF	57
Figure8	Répartition de <i>S. marcescens</i> selon le sexe	60
Figure9	Répartition de <i>S. marcescens</i> selon l'âge	60
Figure10	Distribution des souches de <i>S. marcescens</i> dans les différents produits pathologiques	61
Figure11	Distribution des souches de <i>S. marcescens</i> dans les différents services	62
Figure12	Sensibilité aux antibiotiques des 54 souches de <i>S. marcescens</i> aux antibiotiques testés	63
Figure13	Antibiogramme d'une souche de <i>S. marcescens</i> multirésistante	65
Figure14	Détermination des CMI des souches de <i>S. marcescens</i> par E.Test	66
Figure15	Détection de la production de β -lactamase à spectre étendu sur milieux ESBL Biomérieux	67
Figure16	Images de synergie entre les C3G et l'AMC de la souche <i>S. marcescens</i> (bouchon de champagne)	67
Figure17	Souche de <i>S. marcescens</i> pigmentée productrice d'ampC (Effet antagonisme CTX et IMP)	69
Figure18	Exemple de souche de <i>S. marcescens</i> N°2186 et N° 21 résistante aux C3G, aminosides et fluoroquinolones	71
Figure19	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène blaCTX-M	73
Figure20	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène blaTEM	74
Figure21	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène blaPER	75
Figure22	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène blaSHV	76
Figure23	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène aac(6)-Ib	78
Figure24	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène aadA	79
Figure25	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène armA	80
Figure26	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène qnrB	82
Figure27	Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène qnrA	82
Figure28	Clustering des phénotypes et des génotypes de la résistance de <i>S. marcescens</i> par le MultiExperiment Viewer (MeV).	84
Figure29	Exemple de résultat positif de la souche n°60 de transconjugant sur le milieu sélectif de Lauria Bertani additionné de 20 μ g/ml céftriaxone et 100 μ g/ml azide sans agitation après incubation de 48h	86
Figure30	Transconjugants <i>d'E. coli</i> confirmés par le MALDI-TOF MS	86
Figure31	Transfert des déterminants de la résistance par le plasmide transconjugant	87
Figure32	PCR standard des transconjugants <i>d'Escherichia coli</i>	88
Figure33	L'extraction du plasmide des cinq transconjugants using Lamda DNA Hind III digest 1% TBE agarose gel	89
Figure34	Le groupe d'incompatibilité L/M des transconjugants	90
Figure35	Arbre phylogénétique des souches des 35 souches de <i>S. marcescens</i>	92
Figure36	Arbres phylogénétiques et le MALDI-TOF MS clustering des 54 souches de <i>S. marcescens</i>	93

INTRODUCTION

Introduction

Alexander Fleming, qui découvrit la pénicilline, émit l'hypothèse que la résistance bactérienne aux antibiotiques risquait d'apparaître et que l'efficacité des antibiotiques à long terme dépendrait de l'usage qui en serait fait. En effet, seulement quelques années après les premières utilisations de la pénicilline, des souches bactérienne résistantes à cet antibiotique furent isolées (**Plough, 1945**).

Au cours des années, plusieurs familles d'antibiotiques regroupant une centaine de molécules ont été développées et sont toujours utilisées aujourd'hui pour le traitement des maladies infectieuses, leur utilisation massive et non contrôlée en santé humaine génère au fil du temps une augmentation de la résistance bactérienne. Cependant, des études de la métagénomique microbienne environnementale, humaines et animales ont montré que la résistance aux antibiotiques pouvait émerger à partir de sources anciennes, bien avant la découverte des antibiotiques (**D'Costa et al., 2011; Rolain et al., 2012**).

Les bactéries pathogènes pour l'homme sont à l'origine de multiples maladies infectieuses globalement responsables d'un tiers des décès dans le monde. Au cours des années, l'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, particulièrement les entérobactéries représentent un problème majeur de santé publique au niveau mondial (**Bagattini et al., 2004; Carbonell et al., 2000; Chiang et al., 2013; da Silva et al., 2015; de Vries et al., 2006; Gupta et al., 2014a**).

Parmi ces entérobactéries *Serratia marcescens*, un pathogène opportuniste fréquemment impliqué dans plusieurs types d'infections telles que les infections urinaires, les infections des voies respiratoires et les bactériémies (**Mahlen, 2011**).

De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites à travers le monde où la propagation est rapide entre les patients hospitalisés surtout dans les unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques (**Ulu-Kilic et al., 2013**). Ces infections nosocomiales sont beaucoup plus causées par des *S. marcescens* multirésistantes qui ont non seulement conduit à une augmentation de la mortalité, de la morbidité, et du coût de traitement, mais aussi continuent de mettre en danger la vie des

patients surtout les immunodéprimés en milieu hospitalier (**Casolari et al., 2013; Chiang et al., 2013; Haifei Yang, 2012**).

S. marcescens présente souvent une multirésistance importante aux différentes familles d'antibiotiques notamment les β -lactamines, les aminosides et les quinolones (**Mahlen, 2011; Sleigh, 1983**).

Les β -lactamines sont généralement utilisés pour traiter les infections en association avec d'autres familles d'antibiotiques (**Yang et al., 2013**). Récemment, l'augmentation de la fréquence de la résistance des entérobactéries aux aminoglycosides par la production d'enzymes qui les modifient par adénylation, phosphorylation ou acétylation, a été décrite dans le monde (**Belbel et al., 2014; Davis et al., 2010; Park et al., 2006**).

La méthylation des ARN ribosomal 16S (ARNr) a émergé comme un mécanisme de résistance aux aminosides chez les entérobactéries, y compris *S. marcescens* (**Doi et al., 2004; Park et al., 2006; Park et al., 2009; Yang et al., 2013**). Les gènes codant pour ces méthyltransférases sont généralement situés sur des plasmides transférables codant pour la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, ils peuvent donc coexister avec des BLSE, qnr ou AmpC contribuant à un phénotype multirésistant aux antibiotiques (**Belbel et al., 2014; Doi et al., 2004; Hidalgo et al., 2013; Park et al., 2006; Park et al., 2009; Yang et al., 2013**).

En outre, les multiples mécanismes de résistance ont conduit à l'apparition des *S. marcescens* résistantes aux carbapénèmes et les gènes codant pour les carbapénémases de cette bactérie ont été décrit; les carbapénémases de la classe A (KPC et SME) (**da Silva et al., 2015; Mataseje et al., 2014**), la classe B (IMP et VIM) (**da Silva et al., 2015; Haifei Yang, 2012; Nastro et al., 2013**) et récemment la métallo- β -lactamase (NDM-1 et NDM-7) a été également décrite pour les souches de *S. marcescens* (**Gruber et al., 2015; Rubin et al., 2014; Chen L et al., 2015**).

Face à cette émergence de bactéries multirésistantes, leur capacité de disséminer par échange du matériel génétique dans des conditions de pression de sélection antibiotique et la mobilisation des gènes de résistance, la priorité est évidemment de lutter contre la diffusion de ces microorganismes. Pour maîtriser cette problématique,

différentes approches ont été suggérées: un meilleur usage des antibiotiques, un meilleur respect des mesures d'hygiène, une meilleure compréhension des mécanismes d'acquisition des résistances aux antibiotiques afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, mener des études d'épidémiologie moléculaire, et développer des nouveaux outils de surveillance en temps réel.

Les objectifs de cette étude sont la caractérisation des souches de *S. marcescens* multirésistantes, l'identification du support génétique de cette résistance, l'étude des possibilités de transfert des gènes de la résistance et la détermination de la relation clonale entre les souches.

La première partie de ce document portera principalement sur la revue de la littérature concernant l'étude bactériologique de l'espèce *Serratia marcescens*, les différents mécanismes et les données épidémiologiques de sa résistance aux antibiotiques. La deuxième partie présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisées. La troisième partie portera sur l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent. Nous terminerons ce travail par une quatrième partie qui sera consacrée à la conclusion et les perspectives de recherche à venir.

PARTIE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Historique de la taxonomie de l'espèce *Serratia marcescens*

L'espèce *Serratia marcescens* appartient actuellement au genre *Serratia*, à la tribu des *Klebsielleae*, à la famille des *Enterobacteriaceae*, à l'ordre *Enterobacteriales*, à la classe *Gamma Proteobacteria*, au phylum *Proteobacteria*, et au domaine des *Bacteria* (**Brenner, 2005**).

Cette espèce a l'une des taxonomies les plus confuses dans le monde bactérien, une partie de cette confusion consiste dans l'incertitude de savoir si les premières descriptions de ce microorganisme faites par les chercheurs étaient correctes.

En 1819, un phénomène survenait dans la province de Padoue, en Italie, qui consistait dans le changement de la coloration en rouge de la polenta (Semoule de maïs bouillie) (**Mahlen, 2011**). A cet effet le pharmacien Bartolomeo Bizio menait des expériences et cultivait avec succès le microorganisme sur la polenta fraîche, il constatait que la décoloration rougeâtre de la polenta pourrait se produire en moins de 24 heures. Il déterminait que la cause de la polenta rouge était un microorganisme qu'il croyait être un champignon qu'il nommait *Serratia marcescens* (**Bizio, 1823; Breed and Breed, 1924; Merlino, 1924**).

Dans la même période, Vincenzo Sette arrivait à la même conclusion de celle de Bizio et nommait le microorganisme *Zaogalactina imetrofa* (**Breed and Breed, 1924**).

En 1848, Christian Gottfried Ehrenberg enquêtait les taches rouges qui figuraient sur une pomme de terre cuite en Allemagne, cette décoloration était similaire à celle observée dans la polenta rouge en Italie. Par l'utilisation d'un microscope, il visualisait des cellules ovales et mobiles qu'il les nommait *Monas prodigiosa* (**Breed and Breed, 1924; Gaughran, 1969**).

Au cours de nombreuses années, ce microorganisme était décrit par beaucoup de noms différents: En 1920, **Winslow et al., (1920)** publiait le «*Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Type*» où ils nommaient le microorganisme *Bacillus prodigiosus*.

En 1923, Après la première publication du Manuel de «*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*» (**Bergey's, 1923**), trois autres noms étaient attribués: *Salmonella marcescens*, *Salmonella prodigiosum*, et *Chromobacter prodigiosum*

(**Gaughran, 1969**). Ce dernier, en particulier, était utilisé couramment jusqu'aux années 1950 (**Mahlen, 2011**).

En 1958, le «*International Code of Nomenclature of Bacteria and Viruses, Bacteriological Code*» publiait *Serratia marcescens* comme le nom officiel à ce microorganisme (**Gaughran, 1969**).

En 1969, le chercheur Gaughran concluait que la description des colonies faite par Bizio en 1823 ressemblait à des bactéries plutôt qu'à des levures et il attribuait le nom *Serratia marcescens* à ce microorganisme (**Gaughran, 1969**).

En 1980, le nom accepté était celui de *Serratia marcescens*, il était officiellement adopté lorsque le premier «*Approved Lists of Bacterial Names*» était publié (**Skerman, 1980**).

Chaque édition du Manuel de «*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*» utilisait le nom de *Serratia marcescens* tout au long des années 1900 (**Mahlen, 2011**).

Entre 1998 et 2003, de nombreuses études étaient menées pour déterminer l'identité d'un isolat pigmenté possédant de l'endospore récupéré à partir d'un réservoir de traitement des eaux usées à Saku au Japon (**Doi, 1998**). L'utilisation des techniques de biologie moléculaire permettaient d'identifier cet isolat; l'ADN contenait un GC% qui correspondait à *Serratia marcescens* et la séquence du gène de l'ARNr 16S était de 99,6% similaire également à celle de *Serratia marcescens*. La microscopie électronique à transmission montrait que l'isolat est un Gram négatif qui possédait de l'endospore. La présence de cette dernière chez *S. marcescens* était expliquée par un transfert du gène codant pour la formation de l'endospore trouvé chez *Bacillus sp.* au même endroit ce qui a permis à *S. marcescens* de l'acquérir et cela permettait de différencier *S. marcescens* en deux sous-espèces *S. marcescens subsp. sakuensis* (référant au nom Saku au Japon où l'isolat a été trouvé possédant de l'endospore) tandis que l'espèce type *S. marcescens* était appelée *S. marcescens subsp. marcescens* (**Ajithkumar et al., 2003**).

2. Habitat

S. marcescens est une espèce ubiquitaire qui se trouve dans la nature (eau, sol, plantes, insectes, animaux et aliments), dans l'environnement hospitalier (sols, air, eau ou siphons des éviers) et le matériel médical (matériel d'aérosols, appareillage d'endoscopie, matériel et solutés de perfusion) (**Avril, 1992; Mahlen, 2011; Tanaka et al., 2004**).

Cette bactérie est considérée comme pathogène opportuniste, elle touche le personnel hospitalier ou les patients au niveau de certaines muqueuses telles que le nez, la gorge et le tube digestif (**Byrne et al., 2001; Christensen et al., 1982**).

Cette espèce fait partie des entérobactéries qui présente une résistance aux agents physicochimiques, elle peut survivre des mois dans l'eau distillée et se multiplier dans des solutions antiseptiques: ammoniums quaternaires et chlorhexidine. Elle se multiplie bien à +4°C, elle est inactivée par la chaleur humide à 121 °C pendant au moins 20 min et la chaleur sèche à 165-170 °C pendant 2 heures (**Avril, 1992; Mahlen, 2011**).

3. Caractères bactériologiques

S. marcescens est un bacille à Gram négatif qui mesure 0.5-0.8 µm de diamètre et de 0.9-2 µm de longueur (**John G Holt, 1994**), mobile par ciliature péritriche, asporulée (**Jean-Jacques Lefrere, 2000**) et acapsulée mais certaines études ont montré que la capsule peut être formée quand les souches sont cultivées en aérobiose sur un milieu de culture qui contient de faibles quantité de nitrogène et de phosphate (**Martha Embrey, 2004**). Certaines souches de *S. marcescens* produisent un pigment non diffusible d'une couleur rose à rouge vif appelé la prodigiosine: C'est un métabolite secondaire alcaloïde appartenant à la famille de pigments rouges naturels qui partagent une caractéristique commune des trois cycles pyrrole dans leur structure chimique (**Anuradha V Giri, 2004**). La production de cette pigmentation dépend de plusieurs facteurs y compris, la composition du milieu, la température et le pH (**Lapenda et al., 2015**), l'intensité de la couleur dépend de l'âge des colonies (**Hejazi and Falkiner, 1997**).

Ce pathogène se développe en aéro-anaérobie facultative, cultivant sur les milieux ordinaires d'isolement pour les entérobactéries (Trypticase Soja, MacConkey, Hektoen, Luria Bertani.....). Les colonies sont d'un diamètre de 1 à 3 mm, opaques, circulaires et

convexes sur la gélose nutritive, elles peuvent pousser facilement pendant 24 heures à 30-40°C, elles n'ont pas besoin des facteurs de croissance (**Avril, 1992**).

C'est une bactérie oxydase négative, catalase positive, elle est positive pour la réaction de Voges-Proskauer VP (+) et L'orthonitrophényl-β-galactoside ONPG (+), elle ne possède pas d'Arginine dihydrolase (ADH), ni de Tryptophan Deaminase (TDA), ni d'uréase, elle ne produit pas d'hydrogène sulfuré (H₂S). Elle produit trois enzymes hydrolytiques: la lipase, la gélatinase et la Dnase (**Washington C.Winn et al., 2005**).

L'identification phénotypique de *S. marcescens* repose essentiellement sur quelques caractères biochimiques et cultureux différentiels des autres espèces du genre *Serratia* illustrés dans le tableau 1.

Tableau 1: Caractères biochimiques et cultureux d'identification des espèces du genre *Serratia* (Mahlen, 2011).

Caractéristiques	<i>S. marcescens</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. ficaria</i>	<i>S. odorifera</i>	<i>S. fonticola</i>
DNase	+	+	+	+	-
Gélatinase	+	+	+	+	-
Lipase (Hydrolyse de tween80)	+	+	+	-	+
Production de la prodigiosine	V	-	-	-	-
L'odeur de la pomme de terre	-	-	+	+	-
Indole	-	-	-	V	-
Urease	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase (ADH)	-	-	-	-	-
Lysine décarboxylase (LDH)	+	+	-	+	+
Ornithine décarboxylase (ODC)	+	+	-	V ^b	+
Fermentation de l-Arabinose	-	+	+	+	+
Fermentation de Lactose	-	V	V	+	+
Fermentation de d-Sorbitol	+	+	+	+	+
Fermentation de sucrose	+	+	+	V ^b	V

V: variable *b*: *S. odorifera* biotype 1 est Ornithine décarboxylase positive et fermente le sucrose, par contre biotype 2 est Ornithine décarboxylase négative et ne fermente pas le sucrose.

4. Facteurs de pathogénicité

Serratia marcescens est capable de produire plusieurs facteurs de pathogénicité (Mahlen et al.; 2011):

- **Quorum Sensing**

Le quorum Sensing (QS) est un mécanisme de signalisation de cellule à cellule utilisé par *S. marcescens* (Liu et al., 2011; Van et al., 2007), il permet de contrôler certaines fonctions biologiques, telles que la formation de biofilm et la production d'antibiotiques (Van et al., 2007). Lorsque les cellules de populations atteignent une masse critique, les molécules de signalisation sont libérées ce qui permettent à *S. marcescens* de répondre à son environnement, elle utilise N-acylhomosérine lactone (AHL) comme une molécule de signalisation dans le quorum sensing. Les protéines de type LuxI catalysent la formation de l'acylhomosérine lactone (AHL) en tant que signal, les protéines de type LuxR lient leurs signaux d'AHL apparentées et contrôlent la transcription des gènes cibles (Wei et al., 2006).

Divers systèmes de QS de type LuxIR ont été décrits pour les souches de *S. marcescens*: Selon une étude rapportée par Eberl et al., (1996), le système SwrI / SwrR de la souche *S. marcescens* régule la motilité par essaimage, la formation de biofilms, la protéase, la production de la serrawettin qui est un agent tensioactif qui contribue à la colonisation des surfaces.

Dans une autre étude, le système Smal/Smr de la souche *S. marcescens* régule la motilité par essaimage, l'activité hémolytique, la formation de biofilm, la production de chitinase et la caséinase (Coulthurst et al., 2006). Ce système régule également la production de la prodigiosine et la biosynthèse des carbapénèmes (Thomson et al., 2000).

Selon Horng et al., (2002), la production de la prodigiosine et la mobilité par les flagelles sont régulées par le système de détection du quorum SPNI /SPNR.

Le quorum sensing semble jouer un rôle dans la pathogenèse et la régulation de la production de biofilm pour *S. marcescens*. En outre, Shanks et al., (2007) ont rapporté que le facteur de transcription de la réponse au stress oxydatif joue un rôle dans la formation de biofilm chez *S. marcescens* (Pinna et al., 2011),

4.1. Produits extracellulaires

Mis à part, la production de la marcescine qui est une bactériocine (Nasu, 1981), *S. marcescens* sécrète la chitinase extracellulaire, une nucléase et une lipase (Hines et al., 1988), elle produit également beaucoup d'autres enzymes, telles que les métalloprotéases, la gélatinase et la protéase alcaline (Matsumoto, 2004; Pinna et al., 2011), la chloroperoxydase, une protéine extracellulaire appelée, HasA (Hejazi and Falkiner, 1997) et de l'hémolysine (Shimuta et al., 2009).

S. marcescens produit un agent tensioactif ou mouillant appelé ' Serrawettin ' qui contribue à la colonisation des surfaces (Hejazi and Falkiner, 1997). Conformément à son habitat varié, cette bactérie produit des formes alternatives de cellules flagellées d'une manière différentielle; celles-ci présentent différents types de motilité selon la nature du milieu de culture liquide ou solide (Alberti and Harshey, 1990).

4.2. Adhérence et hydrophobicité

L'adhésion bactérienne est généralement reconnue comme étant la première étape de la formation d'un biofilm, la capacité d'une bactérie d'adhérer est un facteur certain de virulence.

Les pili ont montré d'être un facteur déterminant de l'adhérence microbienne aux surfaces épithéliales (Reid and Sobel, 1987), *S. marcescens* possède des pili et adhère aux cellules uroépithéliales (Yamamoto et al., 1985). Deux classes d'adhésines ont été suggérées à *S. marcescens*; pili dites «sensibles au mannose» (MS), car elles sont inhibées par l'addition du mannose, et pili dites «résistants au mannose» (MR) qui agglutinent les érythrocytes en présence de mannose.

Mizunoe et al., (1995) ont évalué l'effet des pili bactériens de *S. marcescens* sur l'interaction avec les polymorphonucléaires (PMNLs) humains et ont constaté que la souche de *S. marcescens*, un isolat d'origine urinaire, semblait posséder à la fois les pili sensibles et résistants au mannose (Hejazi and Falkiner, 1997).

Palomar et al., (1995) ont comparé l'efficacité d'adhérence de type mutant et déficit d'antigène O de *S. marcescens* au plastique, le verre, les cathéters de Foley, et aussi à des cellules uroépithéliales humaines. Les résultats ont montré que l'antigène O a une forte influence sur l'adhérence de *S. marcescens* aux surfaces inerte et biologique (Hejazi and Falkiner, 1997).

S. marcescens possède des propriétés d'hydrophobicité de surface qui ont été étudiées par **Mudd and Mudd, (1924)** depuis lors, l'hydrophobicité de *S. marcescens* a été liée; à l'air, l'eau, l'huile, les interfaces de l'eau, ainsi que l'adhésion à des surfaces solides, y compris les cathéters et d'autres plastiques (**Ashkenazi et al., 1986**).

4.3. Lipopolysaccharide

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des composants essentiels de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif y compris de *S. marcescens*. Sur le plan immunologique, les lipopolysaccharides sont des lipides complexes auxquels sont attachés des polysaccharides qui sont responsables de la spécificité antigénique de l'antigène O. Sur le plan physiopathologique, ils sont extrêmement toxiques, ils représentent l'endotoxine des bactéries à Gram négatif y compris *S. marcescens* (**Hejazi and Falkiner, 1997, Oxley and Wilkinson, 1989**)).

5. Epidémiologie

Un nombre considérable d'épidémies hospitalières et infections communautaires attribuées à *S. marcescens* ont été décrites dans le monde entier (**Ivady et al., 2014; Ivanova et al., 2008; Knowles et al., 2000; Merkier et al., 2013; Montagnani et al., 2015; Yoon et al., 2005**).

En 1994, à l'hôpital de la Californie en un mois, 7 patients développaient une infection à *S. marcescens* après une chirurgie cardiovasculaire (**Passaro et al., 1997**).

Entre 1998 et 2002, 138 souches de *S. marcescens* provenaient d'urine collectées pendant une période de deux ans au centre médical située dans le nord de Taiwan étaient responsables d'infection nosocomiale du tractus urinaire (**Su et al., 2003**).

La publication des médecins du département d'infectiologie de l'université de Virginie (Etats-Unis) rapporte une épidémie de bactériémies à *S. marcescens* observées dans une unité chirurgicale de soins intensifs d'un hôpital de 455 lits. Sur une période de neuf mois (juillet 1998 à mars 1999) 26 bactériémies à *S. marcescens* ont été observées dont 17 patients ont été décédés (**B.E.Ostrowsky, 2002**).

S. marcescens est une bactérie responsable de mortalité et plusieurs cas ont été rapportés dans le monde entier, une étude rétrospective à l'hôpital Chang Gung du Taiwan allant de Janvier 2000 à Juillet 2011 a montré que les 33 patients atteints d'une méningite due à *S. marcescens* présentaient des ratios plus élevés de tumeurs cérébrales (54,5%) avec un taux de 15.2% de mortalité (**Wu et al., 2013**).

En 2002, en France une épidémie au service de réanimation pédiatrique au CHU d'Amiens due à *S. marcescens* a été déclarée (**Adjide et al., 2004**).

En pédiatrie, les septicémies ou les bactériémies nosocomiales ont pour conséquence une augmentation de la morbidité et de la mortalité. A New York en 2004 *S. marcescens* était responsable d'un taux de mortalité de 60% suite aux bactériémies à deux services d'unités des soins intensifs néonatale (**Vladana Milisavljevic, 2004**).

En 2005 (Du Janvier à Décembre) à L'hôpital de Gaza en Palestine au service des soins intensifs néonatal, *S. marcescens* provoquait une septicémie à 159 nouveau-nés dont 70 (44%) ont été décédés (**Al Jarousha et al., 2008**).

En 2007, une étude effectuée dans la région sanitaire de Calgary (Canada) a montré que 92 % des isolats de *S. marcescens* présentent un taux de 65 % d'infections d'origine communautaire. Selon cette étude, 10,8 pour 100 000 habitants sont porteurs du pathogène et 0,9 pour 100 000 personnes par année développent une bactériémie. Le taux d'isolement est plus élevé chez les personnes de plus de 60 ans. Dans la population de moins de 60 ans, le taux d'isolement chez les hommes et les femmes diffère légèrement (65,9 pour 100 000 chez les hommes et 36,5 pour 100 000 chez les femmes). La différence dans le taux d'isolement est surtout observable dans le cas des infections hospitalières. L'incidence ne varie pas selon la saison ou l'année. La bactériémie était habituellement due à *S. marcescens* avec un taux de (88 %) (**Laupland et al., 2008**).

Pendant la période allant de Novembre 2008 à Janvier 2009 à l'Hôpital universitaire King Abdulaziz en Arabie Saoudite, 14 nouveau-nés dans l'unité des soins intensifs néonataux ont été infectés par *S. marcescens*: septicémie (cinq cas), conjonctivite purulente (trois cas), infection du tractus urinaire (deux cas), méningite (deux cas) et cellulite (deux cas), un nouveau-né décède. Toutes les infections ont été attribuées à un

Shampoing admis à l'unité cinq jours avant l'apparition des premiers cas (**Madani et al., 2011**).

En 2009 en Australie, l'incidence annuelle de bactériémie à *S. marcescens* est de 1,03 pour 100.000 habitants, avec 47% d'épisodes ayant leur apparition dans la communauté. Un taux de 68% du sexe masculin a été touché par la bactériémie (**Engel et al., 2009**).

Selon une étude faite par **Dessi et al., (2009)**, les infections à *S. marcescens* chez le nouveau-né sont fréquentes (11-15 % dans l'unité de soins intensifs néonataux) avec un pourcentage de (42 %) bactériémie, (26 %) conjonctivite, (13 %) pneumonie, (7 %) méningite et (8 %) pour les infections des plaies opératoires et infection urinaire.

S. marcescens est la septième cause la plus fréquente de pneumonie avec une incidence de 4,1% aux États-Unis, de 3,2% en Europe et de 2,4% en Amérique latine et la dixième cause la plus fréquente de septicémie avec une incidence de 2,0% parmi les patients hospitalisés (**Jones, 2010**).

En 2010, en Tunisie **Ktari et al., (2010)** déclarent trois épidémies consécutives dues à trois clones différents de *S. marcescens* à l'unité des soins intensif au CHU Habib Bourguiba à Sfax.

En 2012, en Algérie **Nedjai et al., (2012)** rapportent des souches de *S. marcescens* à partir de prélèvements urinaire isolés du service d'urologie à Annaba.

Une étude rétrospective d'infections nosocomiales à *S. marcescens* de Septembre à Octobre 2013 au service de néonatalogie de l'hôpital d'enfant de Casablanca au Maroc a été effectuée, neuf cas de bactériémies et deux cas de méningites ont été rapportés. Toutes les souches ont présenté le même antibiotype. La durée moyenne d'hospitalisation était de 20 jours. Le taux de mortalité était de 54% et aucune source de contamination n'a été retrouvée (**S.Houari, 2014**).

En 2014, selon le programme (TSAR) de surveillance de la résistance aux antibiotiques au Taiwan, un total de 403 *S. marcescens* isolées, 39.0% proviennent de prélèvements respiratoires et 22.3% proviennent des prélèvements du tractus urinaire (**Liou et al., 2014**).

Les résultats récents du programme de la surveillance en Europe et US indiquent que *S. marcescens* représente une moyenne de 6,5% de toutes les infections à Gram négatif dans les unités de soins intensifs et une moyenne de 3,5% chez les patients de la non-réanimation. *S. marcescens* sont responsables de 1.4% de bactériémies nosocomiales (Sader et al., 2014).

Selon une étude faite par Labid A, (2015) portée sur l'identification de 42 souches d'entérobactéries isolées des enfants septicémiques au sein d'hôpital pédiatrique Sainte-Thérèse d'Annaba-Algérie, *S. marcescens* était responsable de 4.76% de mortalité.

6. Infections nosocomiales liées à *S. marcescens*

Une infection nosocomiale désigne une infection contractée au cours d'une hospitalisation, infection qui n'existait pas auparavant ni, d'ailleurs, durant les 48 premières heures à l'hôpital.

S. marcescens est peu pathogène pour les sujets sains, elle est responsable d'infections hospitalières parfois épidémiques. La localisation de l'infection dépend de la nature de l'activité du service hospitalier; aux soins, ou surinfections des plaies par des antiseptiques contaminés. Certains patients sont plus fragiles surtout quand ils présentent des troubles d'immunité.

S. marcescens est fréquemment impliquée dans plusieurs types d'infections notamment les infections urinaires après manœuvres instrumentales (LANCASTER, 1962; Nedjai et al., 2012), les bactériémies compliquant les infections précédentes ou consécutives à l'usage de cathéters y compris l'endocardite (HAWE and HUGHES, 1954; Rodrigues et al., 2006), la pneumonie et d'autres maladies respiratoires dues à l'emploi d'appareils de ventilation artificielle ou par aérosols (BERNARD and SUTTON, 1960; Mahlen, 2011), les infections cutanées (Seo et al., 2015), les infections liées aux cathéters intraveineux, l'ostéomyélite et rarement l'endophtalmie endogène et exogène (Marinella and Warwar, 1998; Van et al., 2007). Elle provoque également les maladies du système nerveux central telle que la méningite (Aronson and Alderman, 1943; Ersoz et al., 2014; Wu et al., 2013).

Plusieurs services ont été touchés par les épidémies à *S. marcescens* notamment les services des soins intensifs (**Kraus-Haas et al., 2015; Montagnani et al., 2015; Schulz-Stubner et al., 2015**), la chirurgie cardiaque, l'urologie, la neurochirurgie (**de Boer et al., 2008; de Vries et al., 2006; Dorsey et al., 2000; Ehrenkranz et al., 1980; Esel et al., 2002; Yoon et al., 2005**), les unités de dialyse (**Krishnan et al., 1991**), les services d'obstétrique (**Stephen and Lalitha, 1993**), les unités de transplantation de moelle osseuse et d'oncologie (**Knowles et al., 2000**), les services de pédiatrie (**Ivady et al., 2014**) et beaucoup d'autres services (**Mahlen, 2011**).

7. Résistance de *Serratia marcescens* aux antibiotiques

Les antibiotiques ont permis de faire considérablement reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses au cours du 20^{ème} siècle. Cependant, leur utilisation massive et répétée a conduit à l'apparition de bactéries résistantes. On parle de la résistance bactérienne lorsque cette dernière est capable de continuer à se développer en présence de l'antibiotique en question. Chez *S. marcescens* on distingue deux types de résistance:

7.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle est un phénomène connu, constant et transmissible à la descendance. *S. marcescens* présente une résistance naturelle ou intrinsèque à plusieurs antibiotiques, dans ce cas, la résistance à un antibiotique donné concerne toutes les souches de cette espèce. Les informations qui codent pour ce comportement habituel font parties du patrimoine génétique de l'espèce et programmées sur le génome bactérien (**GAZENDEL Jean-Marie, 2013**).

Comme toutes les entérobactéries, *S. marcescens* présente une résistance naturelle à: La pénicilline G, aux macrolides, à la clindamycine, aux glycopeptides (**Livermore et al., 2001; Stock et al., 2003a; Stock et al., 2003b**). Elle est également résistante aux polymyxines, aux aminopénicillines et aux céphalosporines de première et de deuxième génération par production d'une céphalosporinase d'origine chromosomique inductible AmpC (**Stock et al., 2003a; Stock et al., 2003b**).

7.2. Résistance acquise

Certaines souches de la même espèce de *S. marcescens* naturellement sensible aux antibiotiques deviennent résistantes, ce phénomène de résistance acquise est imprévisible et évolutif. L'apparition de la résistance est liée aux conditions d'utilisation des antibiotiques en exerçant une pression de sélection, ce caractère d'acquisition de la résistance est du soit aux mutations chromosomique, soit par acquisition des gènes étrangers portés sur des éléments mobiles transférables (GAZENDEL Jean-Marie, 2013).

S. marcescens présente une multirésistance importante aux antibiotiques dans le monde entier à savoir les β -lactamines, les aminosides et les quinolones. Il est bien établi que les souches de *S. marcescens* peuvent rapidement développer de la résistance à de multiples β -lactamines. *S. marcescens* héberge un gène, ampC chromosomique qui peut prolonger la résistance à d'autres β -lactamines. En outre, certaines souches portent le chromosome qui code pour les carbapénémases et les enzymes à médiation plasmidique qui peuvent provoquer la résistance à d'autres β -lactamines. *S. marcescens* a montré également une résistance acquise aux aminosides et aux quinolones surtout par la production d'enzymes (Bagattini et al., 2004; Carrer et al., 2008; da Silva et al., 2015; Doi et al., 2004).

Les β -lactamines sont généralement utilisés pour traiter les infections sévères en association avec d'autres familles d'antibiotiques (Yang et al., 2013). Récemment, l'augmentation de la fréquence de la résistance des entérobactéries y compris *S. marcescens* aux aminoglycosides par la production d'enzymes modificateurs d'antibiotiques par adénylation, phosphorylation ou acétylation, a été décrite dans le monde (Belbel et al., 2014; Davis et al., 2010; Park et al., 2006). La méthylation des ARN ribosomal 16S (ARNr) a émergé comme un mécanisme de résistance aux aminosides dans les entérobactéries, y compris *S. marcescens* (Doi et al., 2004; Park et al., 2006; Park et al., 2009; Yang et al., 2013).

Les gènes codant pour ces méthyltransférases sont généralement situés sur des plasmides transférables codant pour la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, ils peuvent donc coexister avec des BLSE, qnr ou AmpC contribuant à un phénotype

multirésistant aux antibiotiques (Belbel et al., 2014; Doi et al., 2004; Hidalgo et al., 2013; Park et al., 2006; Park et al., 2009; Yang et al., 2013).

8. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques naturels utilisés en thérapeutique sont produits par des bactéries ou des mycètes et les antibiotiques synthétiques sont habituellement des analogues ou des dérivés d'antibiotiques naturels. Ils sont bactéricides ou bactériostatiques (Clive P Page, 1999). Les mécanismes d'action des antibiotiques sont très variables et on distingue:

- Les antibiotiques agissant sur la paroi.
- Les antibiotiques agissant sur la membrane plasmique.
- Les antibiotiques qui effectuent une inhibition de la synthèse protéique.
- Les antibiotiques qui inhibent la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques.

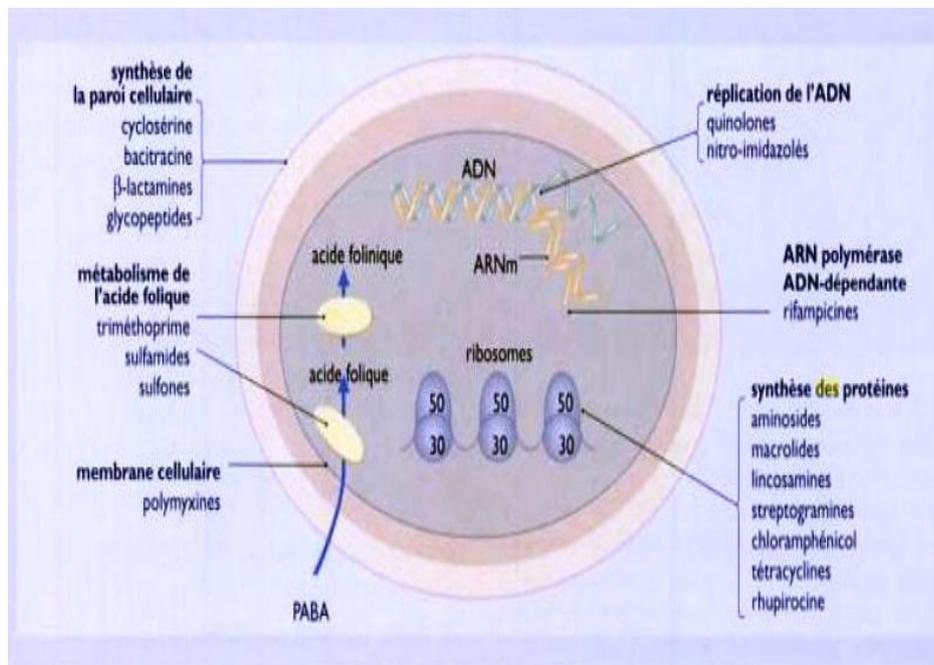


Figure 1: Site d'action des différents types d'antibiotiques (Clive P Page, 1999).

8.1. Mode d'action des β -lactamines

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, elle regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. Elle est caractérisée par la présence constante du cycle β -lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables (**Livermore and Woodford, 2006**). Les β -lactamines bloquent la synthèse du peptidoglycane en inhibant ses enzymes de synthèse (les transpeptidases et les carboxypeptidases), également appelées «protéine de liaison à la pénicilline» ou «PLP» qui sont présentes dans la paroi (**Xavier Anglaret and Emmanuel Mortier, 2002**).

8.2. Mode d'action des aminosides

Les aminosides agissent par inhibition des synthèses protéiques au niveau du ribosome bactérien et perturbent la synthèse protéique.

La pénétration des aminosides à l'intérieur de la bactérie se réalise par un passage passif permettant la traversée de la membrane externe via les porines, puis la traversée du peptidoglycane. Ils se concentrent alors au niveau de la membrane cytoplasmique (**Changeur N., 2009**) puis ils se fixent sur des sites des sous-unités 30S et/ou 50S des ribosomes bactériens entraînant une déformation du ribosome et perturbant ainsi la synthèse des protéines. Les aminosides induisent également des erreurs de lecture de l'ARNm messager ce qui conduit à la synthèse des protéines anormales (**Bryskier A, 1999**).

8.3. Mode d'action des quinolones

Le mécanisme d'action consiste en une inhibition de l'ADN gyrase (topoisomérase II bactérienne) responsable du surenroulement négatif de l'ADN lors de la réplication. L'ADN gyrase est constituée de deux sous-unités A et B; la sous-unité A est une protéine codée par le gène *gyrA* et la sous-unité B est une protéine codée par le gène *gyrB* (**Drlica et al., 2009**). L'ADN topoisomérase IV est la seconde cible intracellulaire des quinolones constituée de deux sous-unités *parC* et *parE* codées par les gènes *parC* et *parE* respectivement, responsable de désenchevêtrement des ADN-fils en fin de réplication donc ces enzymes sont essentielles à la réplication et à la transcription de l'ADN bactérien.

L'inhibition par les quinolones du complexe ADN bactérien-enzymes empêche le surenroulement de l'ADN, provoque le relâchement de l'ADN surenroulé et entraîne la séparation de la double chaîne hélicoïdale de l'ADN (**Drlica et al., 2009; Soussy, 2006**). Les quinolones sont spécifiques à l'ADN bactérien et exercent une activité bactéricide (**Larouche G., 2001**).

9. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

S. marcescens se défend contre l'action des antibiotiques :

- En produisant des enzymes capables de les inactiver.
- En se rendant imperméables à leur pénétration.
- En modifiant la structure de leurs cibles.

9.1. Mécanismes de résistance enzymatique inactivant les antibiotiques

- **Mécanismes de résistance enzymatique inactivant les β -lactamines** (Les β -lactamases)

Les β -lactamases sont les enzymes d'inactivation les plus fréquemment rencontrées et constituent le principal mécanisme de la résistance acquise aux β -lactamines (**Muller M.P., 2004**). Ils catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame des antibiotiques de la famille des β -lactamines. Les gènes qui codent pour ces enzymes sont d'origine chromosomique ou plasmidique, ces gènes ont été également trouvés sur des transposons ou des intégrons facilitant ainsi le transfert horizontal entre les espèces phylogénétiquement éloignées (**Livermore DM, 1995**).

Dans *S. marcescens*, tous les mécanismes possibles de la détermination de la résistance aux β -lactamines peuvent exister simultanément ou en diverses combinaisons d'antibiotiques. Comme d'autres entérobactéries, la production de β -lactamases qui inactivent certaines β -lactamines est le mécanisme le plus commun de la résistance chez *S. marcescens*, ces β -lactamases comprennent **les β -lactamases à spectre étendu (BLSE), les céphalosporinases type AmpC et les carbapénèmases.**

✓ **BLSE**

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) chez *S. marcescens* ont été décrites dans le monde entier (Casolari et al., 2013; Kiratisin and Henprasert, 2011; Markovska et al., 2014; Muro et al., 2012).

En Algérie, la production de BLSE a été observée chez 14 souches de *S. marcescens* (Nedjai et al., 2012). Kiratisin and Henprasert, (2011) ont rapporté également six souches de *S. marcescens* productrices de BLSE. Il existe plusieurs variétés de BLSE rapportées dans les isolats cliniques de *S. marcescens*; les types CTX-M tels que les CTX-M-1 et les CTX-M-15, les types TEM tels que les TEM-1, TEM-12 et 47 qui sont bien connus chez *S. marcescens* et d'autres types de BLSE ont également été décrits comme le montre le tableau N°2.

Tableau 2: Epidémiologie moléculaire des BLSE chez *S. marcescens* (non exhaustive).

Type d'enzyme	Région	Année	Autre région	Références
CTX-M-1	Japon	2000		(Yamasaki et al., 2003)
CTX-M-2	Argentine	2000		(Quinteros et al., 2003)
CTX-M-3	Japon	1998-2000	Corée, Taiwan, Bulgarie, Pologne	(Yamasaki et al., 2003), (Yu et al., 2003), (Naumiuk et al., 2004), (Wu et al., 2004), (Kim and Lim, 2005), (Peng et al., 2007), (Ivanova et al., 2008), (Sabtcheva et al., 2008)
CTX-M-15	Pologne	2000		(Baraniak et al., 2002)
CTX-M-14	Chine	2005-2011		(Yang et al., 2012)
TEM-1	Chine	2005-2011		(Yang et al., 2012)
TEM-AQ	Italie	1993		(Perilli et al., 1997)
TEM-12	Italie	2002		(Sanguinetti et al., 2003)
TEM-47	Pologne	1996-2000		(Naumiuk et al., 2004)
TEM-52	Corée	2003		(Kim and Lim, 2005)
TEM-149	Italie	1999-2003		(Perilli et al., 2008)
SHV-2	Hongrie	1998		(Nagy et al., 1998)
SHV-5	Grèce	1994	Mexique, Pologne, Taiwan, Chine	(Gianneli et al., 1994), (Wu et al., 2004), (Naumiuk et al., 2004), (Espinosa de los Monteros LE et al., 2008), (Yang et al., 2012).
SHV-12	Japon	1998-2000	Corée	(Yamasaki et al., 2003), (Kim and Lim, 2005)
BES-1	Bresil	1996-1997		(Bonnet et al., 2000)

✓ **AmpC β -lactamases**

S. marcescens possède un gène chromosomique qui code pour une β -lactamase AmpC inductible appartenant à la classe C d'Ambler et le premier groupe fonctionnel selon Bush ce qui peut rendre *S. marcescens* résistante aux céphalosporines de troisième génération (**Bush et al., 1995**), la β -lactamase AmpC est codée par le gène ampC (**Lodge et al., 1993, Mahlen et al., 2003**).

Bagattini et al., (2004) ont signalé une épidémie nosocomiale de *S. marcescens* productrices d'AmpC, les souches ont présenté une multirésistance importante aux antibiotiques et porteuses du gène d'adényltransférase dans la classe I d'intégrons.

Suh et al., (2010) ont rapporté que les isolats de *S. marcescens* étaient résistants au meropénème et cela est dû à la combinaison de la surproduction d'AmpC chromosomique et la perte de la protéine OmpF de la membrane externe.

Mata et al., (2010) ont rapporté une souche clinique de *S. marcescens* porteuse des gènes DHA-1 et qnrB sur le même plasmide du groupe L/M d'une taille d'environ 70 kb. Cela a été le premier rapport d'une souche clinique de *S. marcescens* productrice d'AmpC β -lactamase à médiation plasmidique conférant ainsi une résistance à l'ensemble des β -lactamines.

Des souches de *S. marcescens* porteuses d'AmpC à médiation plasmidique; DHA-1 et ACT-1 ont été également identifiées en Chine (**Yang et al., 2012**).

✓ **Carbapénèmases**

Les carbapénèmases décrites chez *S. marcescens* appartiennent aux quatre classes connues de bêta-lactamases (classe A, B, C, D de la classification d'Ambler), les plus importantes cliniquement, sont actuellement les bêta-lactamases de type KPC, IMP/VIM et OXA-48. Les carbapénèmases de classe A ont une activité qui est totalement ou partiellement inhibée *in vitro* par l'acide clavulanique et le tazobactam alors que les autres types de carbapénèmases ne sont pas inhibés par ces inhibiteurs classiques de bêta-lactamases (**Queenan and Bush, 2007**).

➤ **Carbapénèmases de classe A (Sérine protéase)**

Les carbapénèmases de classe A ont tout d'abord été rapportées dans des espèces d'entérobactéries nosocomiales comme *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* ou *Klebsiella spp* produisant des bêta-lactamases dont l'activité était inhibée par l'acide clavulanique (Poirel et al., 2007; Queenan and Bush, 2007). Elles hydrolysaient, à divers degrés, toutes les bêta-lactamines, leurs gènes sont chromosomiques ou plasmidiques (Poirel et al., 2007; Queenan and Bush, 2007). Pour *S. marcescens*, il s'agissait des bêta-lactamases chromosomique de types: SME-1, SME-2/SME-3. SME-1 a été identifié pour la première fois chez une souche de *S. marcescens* résistante aux carbapénème isolée en 1982 à Londres (Naas et al., 1994). Les enzymes de type GES sont initialement des BLSE dont seuls quelques variants touchent les carbapénèmes, les carbapénèmases de type GES ont été également identifiées chez *S. marcescens* tels que le type GES-1 et GES-5 (Boyd et al., 2015, de Vries et al., 2006). Les carbapénèmases de la classe A, les plus fréquentes et les plus menaçantes, sont les carbapénèmases de type KPC (KPC-2 à KPC-8) (Nordmann et al., 2009), des études réalisées sur *S. marcescens* ont rapporté des carbapénèmases de type KPC-2 à KPC-4 (Bryant et al., 2013; Deshpande et al., 2006; Silva et al., 2015). Le plus souvent les souches qui produisent KPC expriment également d'autres bêta-lactamases dont de nombreux types de BLSE (TEM, SHV, CTX-M) et possèdent un certain degré de résistance par imperméabilité (Queenan and Bush, 2007; Walsh, 2008). Les souches KPC apparaissent donc le plus souvent multirésistantes aux bêta-lactamines (Nordmann et al., 2009).

➤ **Carbapénèmases de classe B (Métallo enzyme)**

Les premières carbapénèmases de classe B (ou métallo bêta-lactamases, MBL) avaient été identifiées chez les entérobactéries typiquement hospitalières au Japon (Queenan and Bush, 2007; Walsh, 2008), chez *S. marcescens* les MBL ont été identifiées dans le monde entier; il s'agit des nombreuses variétés de bêta-lactamases de type IMP (IMP-1, IMP-6 et IMP-10), VIM (VIM-16 et VIM-2), GIM-1 (Rieber et al., 2012; Wendel et al., 2013) et NDM (NDM-1 et NDM-7) (Gruber et al., 2015; Rubin et al., 2014; Chen L et al., 2015). Ce sont des métallo enzymes qui contiennent des ions zinc dans leur site actif (Yong et al., 2009). Ces enzymes hydrolysent fortement toutes les bêta-lactamines

à l'exception de l'aztreonam. Dans de nombreux cas, les souches productrices de MBL produisent aussi des BLSEs (Walsh, 2008). Les gènes de ces MBLs sont, le plus souvent, localisés sur des plasmides ou associés au sein d'intégrons et de transposons, la mobilité de ces gènes confère la résistance et la multirésistance aux antibiotiques de ces souches (Queenan and Bush, 2007; Walsh, 2008).

➤ **Carbapénèmases de classe D (Oxacillinase)**

Les oxacillinases sont des pénicillinases dont le spectre s'est étendu dans certains cas aux C3G et dans d'autres aux carbapénèmes; l'OXA-48, décrite tout d'abord chez *K. pneumoniae* (Poirel et al., 2004), Ces enzymes hydrolysent les aminopénicillines, les carboxypénicillines, et seulement partiellement l'imipénème malgré une grande affinité de l'enzyme pour ce substrat, son activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique (Poirel et al., 2004). OXA-48 est souvent associée à d'autres β-lactamases, en particulier des BLSEs, ce qui contribue à la multirésistance des souches (Carrer et al., 2010; Gulmez et al., 2008). En l'absence d'autres mécanismes de résistance (autres β-lactamases de type BLSE ou AmpC plasmidique, perte de porines, ou pompes à efflux), elles n'entraînent qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes (Aktas et al., 2008). Le gène d'OXA-48 est localisé au sein d'un transposon comportant deux séquences d'insertion identiques assurant la mobilité et l'expression (Poirel et al., 2004). Chez *S. marcescens* le gène OXA-48 était rapporté dans le monde entier y compris la Roumanie et le Liban (Szekely et al., 2013), Hammoudi et al., 2014).

Tableau 3: Epidémiologie des carbapénèmases chez *S. marcescens* (non exhaustive).

Enzyme	Distribution géographique	Localisation du gène	Références
SME type			
SME-1	Royaume-Uni, États-Unis	Chromosome	(Bush et al., 2013)
SME-2	États-Unis, Canada, Suisse	Chromosome	(Bush et al., 2013; Carrer et al., 2008)
SME-3	États-Unis	Chromosome	(Haifei Yang, 2012)
SMB-1	Japon	Chromosome	(Haifei Yang, 2012)
KPC type			
KPC-2	Chine, Grèce, États-Unis, Brésil	Plasmide	(Silva et al., 2015)
KPC-3	États-Unis	Plasmide	(Deshpande et al., 2006)
KPC-4	États-Unis	Plasmide	(Bryant et al., 2013)
IMP type			
IMP-1	Japon	Plasmide	(Haifei Yang, 2012)

IMP-6	Japon	Plasmide	(Haifei Yang, 2012)
IMP-10	Japon, Brésil	Plasmide	(Silva et al., 2015)
VIM-type			
VIM-16	Argentine	Class I intégron	(Nastro et al., 2013)
VIM-2	Corée, Argentine	Class I intégron	(Haifei Yang, 2012; Vilacoba et al., 2014)
GIM-type			
GIM-1	Allemagne	Plasmide	(Rieber et al., 2012; Wendel et al., 2013)
NDM-type			
NDM-1	Afrique du Sud, Allemagne	Chromosome Plasmide	(Gruber et al., 2015; Rubin et al., 2014)
NDM-7	Canada	Plasmide	(Chen L et al., 2015)
GES-type			
GES-5	Canada	Plasmide	(Boyd et al., 2015)
GES-1	Hollande	Plasmide	(de Vries et al., 2006)
OXA-type			
OXA-48	Roumanie, Liban	Plasmide	(Szekely et al., 2013) (Hammoudi et al., 2014)

▪ **Mécanismes de résistance enzymatique inactivant les aminosides**

L'inactivation enzymatique des aminosides est le mécanisme qui est le plus fréquent et qui implique trois types d'enzymes: l'aminoglycoside phosphotransférase (APH) et l'adényltransférase (ANT), ces deux enzymes catalysent respectivement la phosphorylation et la nucléotidilation des groupements hydroxyles des aminoglycosides, ce qui empêche leur fixation sur le site A du ribosome. La troisième enzyme, l'acétyltransférase (AAC) catalyse l'acétylation des groupements aminés (Figure 2). Les gènes qui codent pour ces enzymes sont localisés sur des plasmides, des transposons ou contenus dans des intégrons (Mingeot-Leclercq et al., 1999).

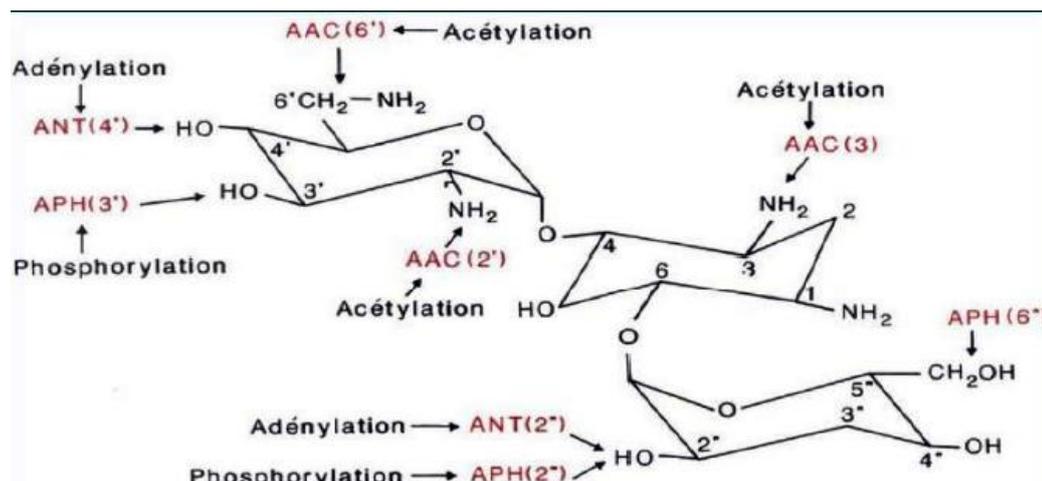


Figure 2: Les enzymes modificateurs des aminosides (Courvalin, 2006).

Un autre type d'enzyme; une méthylase ARNr 16S a été décrite chez *S. marcescens*; les *armA* et les variants de *rmt*. Ces enzymes sont à médiation plasmidique qui présentent une résistance de haut niveau à plusieurs aminoglycosides, y compris la kanamycine, la tobramycine, l'amikacine et la gentamicine (Doi et al., 2004). Ces ARNr 16S méthylases à médiation plasmidique telles que l'*armA*, *rmtA*, et *rmtC* ont été identifiées chez *S. marcescens* (Kang et al., 2008).

S. marcescens héberge également des enzymes modificateurs d'aminoglycosides chromosomique de la famille AAC (6') et AAC (6')-Ic (Champion et al., 1988).

Les enzymes de la classe AAC (6') sont des 6'-N-acetyltransferases qui peuvent engendrer une résistance à plusieurs aminoglycosides comme l'amikacine, tobramycine, cette enzyme est exprimée faiblement ou à des niveaux faibles (Livermore et al., 2001; Shaw et al., 1992).

Récemment un nouveau 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase, AAC(6')-Ial, isolé d'une souche clinique de *S. marcescens* contenant 146 acide aminé, de 91.8% d'identité avec la séquence de AAC(6')-Ic a été identifié (Tada et al., 2015).

Certaines études ont également rapporté l'identification des enzymes bifonctionnelles chez les souches de *S. marcescens* tel que le gène codant pour l'enzyme bifonctionnelle ANT (3'')-Ii/AAC (6')-IId (Centron and Roy, 2002; Kim et al., 2006).

▪ **Mécanismes de résistance enzymatique inactivant les quinolones**

L'antibiotique pénètre dans la bactérie et atteint une concentration intracellulaire normale, mais il est partiellement dégradé par une enzyme, ce qui diminue son activité sur la cible. Ce mécanisme de découverte récente pour les quinolones n'est décrit pour l'instant que chez les entérobactéries y compris *S. marcescens*.

Récemment, l'inactivation enzymatique par la production d'acétyltransférase aac(6')-Ib-cr, un variant de aac(6')-Ib modifie la ciprofloxacine par acétylation (**Robicsek et al., 2006**). Le gène aac(6')-Ib-cr à médiation plasmidique peut exister avec qnrA pour la détermination de la résistance au ciprofloxacine. Il a été également trouvé chez *S. marcescens* qui contiennent les gènes qnrA1 et qnrB1 (**Kim et al., 2009**).

9.2. Altération de la perméabilité de la membrane externe

L'altération des protéines de la membrane externe a été rapportée comme la cause de la résistance aux quinolones, aux aminoglycosides et aux β -lactamines chez *S. marcescens* (**Sanders and Watanakunakorn, 1986**).

Sanchez et al., (1997) ont décrit 3 porines différentes chez *S. marcescens*, elles ont été nommées Omp1, Omp2, et Omp3 et leurs poids moléculaires étaient 42, 40 et 39 kDa respectivement. Omp2 et Omp3 montrent une osmoregulation et une thermorégulation similaire à celles observées chez l'OmpF et l'OmpC d'*Escherichia coli*. (**Sanchez et al., 1997**).

Plusieurs études ont montré que la disparition des porines de *S. marcescens*, associée à la production d'enzymes détruisant le cycle β -lactame (β -lactamases, céphalosporinases), est un élément clé de la résistance aux β -lactamines. **Weindorf et al., (1998)** ont rapporté que la résistance réduite des *S. marcescens* a été seulement causée par une surproduction de β -lactamase. Par contre, le haut niveau de résistance est du à la surproduction de β -lactamases et l'altération des porines OmpF ou OmpF et OmpC. **Suh et al., (2010)** ont rapporté une épidémie à *S. marcescens* résistante à la méropénème par la surproduction d'AmpC chromosomique et la perte des protéines de la membrane externe. Ces isolats ont montré un manque de 42 kDa de la protéine de la membrane externe OmpF. La perte d'OmpF peut jouer un rôle dans l'acquisition de la résistance à la méropénème. **Moya-Torres et al., (2014)** ont montré que l'altération de

la porine ompF contribue à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques de *S. marcescens*.

Ruiz et al., (2003) rapportent que l'Omp1 semble être la porine primaire qui permet l'entrée de la ciprofloxacine dans *S. marcescens*

Trois pompes à efflux différentes à médiation chromosomique de type RND (Resistance, Nodulation and Cell Division) ont été identifiées chez *S. marcescens*: SdeAB, SdeCDE et SdeXY (**Begic and Worobec, 2008**). Une autre pompe à efflux a été caractérisée chez *S. marcescens*, SmdAB appartenant au type ABC (ATP-binding cassette) (**Matsuo et al., 2008**).

Le gène *qepA*, codant une pompe d'efflux (QepA1 ou QepA2), confère une diminution de la sensibilité aux quinolones hydrophiles (norfloxacine, ciprofloxacine, principalement). A ce jour, les études épidémiologiques concernant QepA sont encore rares, mais sa prévalence est faible (< 1 %). Il est fréquemment associé à la ARNr 16S *rmtB* (**Muylaert and Mainil, 2013**).

9.3. Modification de la cible

Il s'agit des modifications de la cible suite à des mutations des gènes de structure, diminuant l'affinité de l'antibiotique pour sa cible, c'est le mécanisme principal chez toutes les espèces bactériennes. Le mécanisme le plus rare est la modification de la cible de site de PLPs, un moyen efficace qui permet aux souches de *S. marcescens* de devenir résistantes aux β -lactamines (**Gunkel et al., 1991**).

La résistance aux aminosides a montré d'être le résultat de mutations dans l'ARNr 16S des ribosomes, ces mutations surviennent également dans les gènes de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV, selon la cible préférentielle de la molécule et selon l'espèce bactérienne. Chez *S. marcescens*, le premier site de mutations est l'ADN gyrase car elle est la cible principale (Figure 3). La résistance aux fluoroquinolones a montré d'être le résultat de mutations dans l'ADN gyrase et la surexpression des pompes à efflux. ADN gyrase a été isolé à partir des souches résistantes aux quinolones de *S. marcescens* au Japon, les altérations trouvées dans *gyrA* ont montrées d'être impliquées dans la résistance aux quinolones (**Fujimaki et al., 1989**).

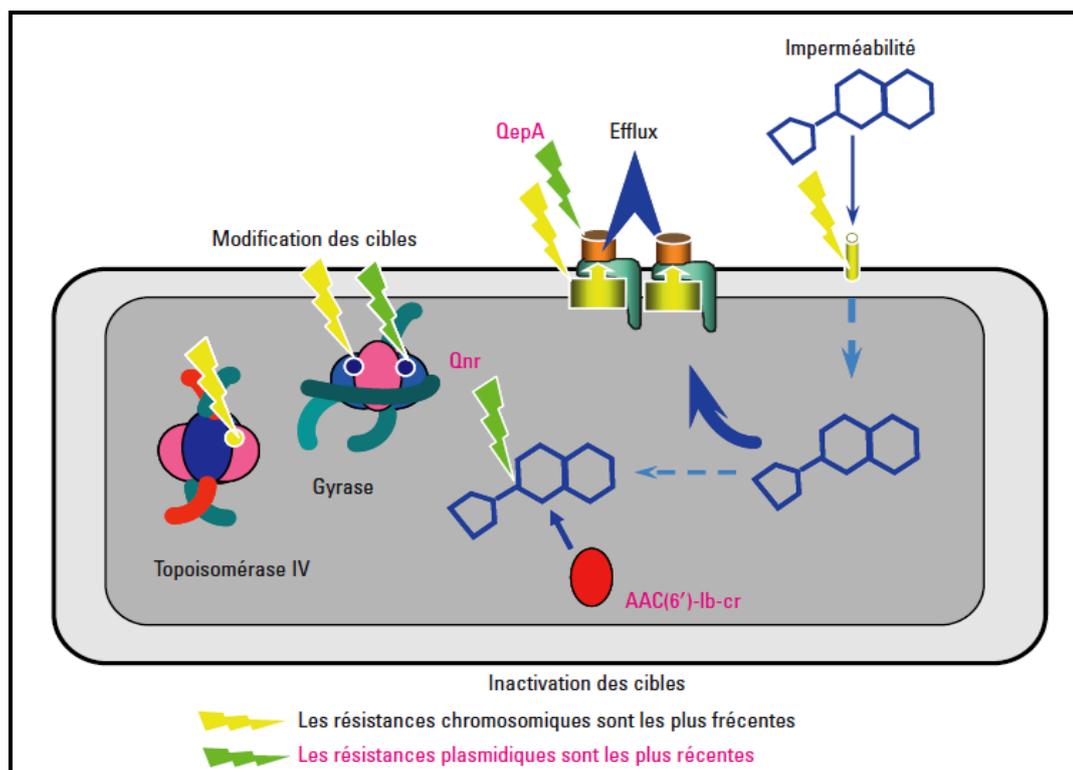


Figure 3: Schéma des mécanismes de résistance aux quinolones et fluoroquinolones (CAMBAU E., 2012).

- **Protection de la cible**

La molécule de quinolone arrive intacte au niveau de l'ADN gyrase et de la topoisomérase, mais une protéine à motifs pentapeptidiques répétés, nommée Qnr, vient interférer dans le complexe ADNgyrase/ADN/quinolones et inhibe l'action des quinolones sur sa cible. En présence de la protéine Qnr, les fonctions de surenroulement, relâchement, désenchevêtrement de l'ADN gyrase sont rétablies. A ce jour, 5 déterminants différents ont été rapportés, QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrD. Ces protéines Qnr sont codées par des gènes qnr de support plasmidique chez les entérobactéries (Tran et al., 2005). En 2007 une étude a montré que les gènes qnr trouvés dans 2.4% (4/166) des souches de *S. marcescens* contiennent les gènes suivants: une souche qnrA1, deux qnrB1 et une souche qnrB4 (Park et al., 2007). En 2010, Velasco et al., (2010) ont rapporté une souche de *S. marcescens* hébergeant le gène Smaqnr d'origine chromosomique qui présente 80% d'identité avec le gène qnrB1.

10. Supports génétiques et éléments mobiles de la résistance aux antibiotiques chez *S. marcescens*

La dissémination des gènes de résistance nécessite leur présence sur des supports génétiques pouvant être transmis à la descendance, et capables de diffuser d'une bactérie à une autre non reliées phylogénétiquement (**Singleton P, 2005**).

Les transferts horizontaux de gènes jouent un rôle important dans la dissémination des mécanismes de résistance aux antibiotiques entre espèces bactériennes différentes (**Dutta and Pan, 2002**). Trois mécanismes de transfert horizontal d'éléments génétiques entre bactéries d'une même espèce ou d'espèces et de genres différents sont utilisés par les bactéries: la transformation, la transduction et la conjugaison.

Les éléments génétiques mobiles sont des fragments d'ADN capables de changer de localisation dans le chromosome ou le plasmide sans jamais apparaître à l'état libre (**Lartigue et al., 2006**).

▪ Plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaires, le plus souvent circulaires à localisation extrachromosomique. Ils ont la capacité de se répliquer d'une façon autonome et leur transmission est stable au cours des divisions cellulaires. Les plasmides ne sont pas indispensables à la bactérie hôte, conférant ainsi une grande souplesse génétique. Ils sont classés sur la base de groupes d'incompatibilité (groupe Inc). Deux plasmides sont incompatibles lorsque leur réplication est contrôlée par le même mécanisme de régulation, ils ne peuvent alors pas coexister dans la même bactérie de façon stable. Ils possèdent plusieurs propriétés conférant aux bactéries une meilleure adaptation à l'environnement telles que l'acquisition des gènes de résistance aux antibiotiques ou de virulence (**Clewell, 1993; Davison, 1999**).

▪ Séquences d'insertion et transposons

Ces éléments sont capables de se transférer entre le chromosome et les plasmides, mais aussi entre deux sites de la même molécule d'ADN (plasmide ou chromosome). Les séquences d'insertion (IS) représentent les éléments transposables les plus simples. Elles contiennent les informations nécessaires à leur transposition (gène de la transposase) et des séquences répétées inversées droite et gauche de 10 à 40 pb à leurs extrémités. Ces séquences IR sont impliquées dans la fixation de la transposase et dans

les phases de coupure, d'excision et de transposition de l'ADN. Les IS ont une séquence de reconnaissance sur l'ADN cible, la spécificité de ce site est plus ou moins importante en fonction de l'IS impliquée (**Mahillon and Chandler, 1998**).

Les transposons sont des éléments d'ADN qui peuvent se déplacer d'un endroit à un autre sur un même brin d'ADN ou sur un autre brin. Pour faire de la transposition, aussi appelée recombinaison, un transposon a besoin d'enzymes spéciales telles une intégrase ou une transposase. C'est habituellement le transposon lui-même qui code pour ces protéines. Ce sont des éléments génétiques mobiles, formés d'une séquence d'ADN sans existence autonome stable. L'intégration d'un transposon est réalisée soit sur un plasmide, soit sur le chromosome, le plus souvent dans une région riche en AT.

▪ **Intégrons**

Les intégrons (In) sont des structures génétiques immobiles qui peuvent acquérir ou perdre des gènes de résistance insérés sous forme d'éléments mobiles. Identifiés par **Stokes and Hall, (1989)**, ils sont insérés dans des plasmides, des transposons ou le chromosome bactérien. Les intégrons peuvent être divisés en deux groupes majeurs: intégrons de résistance et super-intégrons. La plupart des intégrons de résistance portent des gènes cassettes qui codent des protéines de résistances aux antibiotiques et aux désinfectants. Le groupe des super-intégrons est constitué d'intégrons de grandes tailles, localisés sur le chromosome et qui portent des cassettes codant des protéines de fonction variée. Une classification, les répartit au sein de quatre classes. Les classes 1, 2 et 3 pour les intégrons de résistance et la classe 4 pour les super-intégron (**Fluit and Schmitz, 2004**). Les intégrons de classe 1 sont les plus fréquemment rencontrés chez les bactéries pathogènes à Gram négatif multirésistantes (**Ploy et al., 2000**) y compris *S. marcescens* (**Wachino et al., 2011**).

11. Méthodes de typage des *S. marcescens*

Les techniques d'études des isolats se sont considérablement développées et diversifiées suite à la mise à portée de nombreux laboratoires des outils de la biologie moléculaire très performants. Leur diversité est issue de la multiplicité des outils disponibles et de la nécessité d'adapter les techniques existantes aux particularités génétiques des micro-organismes.

En raison de la fréquence des infections nosocomiales causées par *S. marcescens*, les laboratoires de microbiologie clinique doivent être en mesure de faire la différence entre les isolats individuels pour identifier les sources potentielles de contamination et de suivre la transmission entre les patients. Le génotypage de *S. marcescens* a été réalisé en utilisant diverses méthodes moléculaires, en particulier PFGE (Electrophorèse en champ pulsé) qui est la technique de référence pour la détection des épidémies chez *S. marcescens* dans le monde (**Dongyou Liu, 2011**).

Du point de vue épidémiologique, différentes méthodes ont été proposées auparavant pour comparer les souches de *S. marcescens*; les marqueurs phénotypiques tels que les caractéristiques métaboliques ou biologiques ont inclus; la biotypie (**Grimont and Grimont, 1978**), la lysotypie (**Hamilton and Brown, 1972; Pitt, 1982**), la bactériocinotypie (**Hamilton and Brown, 1972; Nasu, 1981**), l'antibiotypie (**Knowles et al., 2000; Larose et al., 1990**) et la sérotypie, basée sur la détermination de l'antigène capsulaire K et somatique O ou flagellaire H (**Carbonell et al., 2000; Hejazi et al., 2000**). L'application de ces méthodes comme un moyen de typage a été limitée en raison de leur pouvoir discriminant insuffisant.

Au cours des dernières années d'autres méthodes de typage «génotypages» des *S. marcescens* ont été de plus en plus développées et utilisées en s'appuyant sur des techniques d'étude de séquences non spécifiques qui sont des techniques séparatives après restriction enzymatique, les techniques d'amplification aléatoire et les techniques d'étude de séquences spécifiques (**Boulouis H-j, 2001**).

Parmi les techniques séparatives après restriction enzymatique de séquences non spécifiques, on cite l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe telle que la RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) (**Gupta et al., 2014a; Krawczyk et al., 2003; Merkier et al., 2013**). L'étude des séquences spécifiques telles que les méthodes par PCR-RFLP ont été également décrites (**Parvaz et al., 2002**). les méthodes basées sur la PCR (**Enciso-Moreno et al., 2004; Hejazi et al., 1997; Krawczyk et al., 2003; Vogel et al., 1999**), la PCR répétitive (RE)-PCR (**Patton et al., 2001**), l'amplification des fragments d'ADN environnant les sites de restriction rares (ADSRRS-fingerprinting) (**Krawczyk et al., 2003**), l'ERIC-PCR (**Patton et al., 2001**) et le ribotypage (**Chetoui et al., 1998**). Enfin, le MLST (*multi-locus sequence typing*) est une technique qui a été décrit pour la première fois en 1998

(**Maiden et al., 1998**), elle consiste à amplifier et séquencer plusieurs gènes de ménage, cette méthode est reproductible, elle permet de comparer des souches et détecter des éventuelles épidémies (**Maiden, 2006; Platonov et al., 2000**). Elle est la plus utilisée pour le typage moléculaire de plusieurs bactéries telles que *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii* et *Escherichia coli* (**Girlich et al., 2015; Hiki et al., 2014; Kubo et al., 2015**).

Jusqu'à l'heure actuelle, il n'y a pas encore des études de MLST sur *S. marcescens*.

PARTIE II: MATERIEL ET METHODES

Nous avons mené une étude pratique sur l'identification et la caractérisation de l'antibiorésistance des souches de *Serratia marcescens* sur une période de 20 mois allant de décembre 2011 à aout 2013. Au cours de cette période, un total de 54 souches non dupliquées d'origine pathologique a été collecté à partir de différents établissements de santé (Etablissement hospitalier spécialisé en uro-néphrologie à Constantine, établissement hospitalier public à Skikda et des laboratoires privés à Annaba). L'étude bactériologique et la résistance aux antibiotiques ont été effectuées au sein du laboratoire de Microbiologie du département de biochimie de l'Université BADJI MOKHTAR ANNABA et l'étude moléculaire a été réalisée à l'Unité de Recherche sur les Maladies infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE) au niveau de la faculté de Medecine et de pharmacie à l'université d'Aix-Marseille – France.

Les différentes étapes qui ont été suivies pour la réalisation de ce travail sont les suivantes:

1. Isolement des souches bactériennes

Les souches bactériennes nous ont été parvenues de différents établissements de santé dans des tubes de conservation (BioRad). Un isolement a été effectué pour chaque souche sur milieu MacConkey. L'incubation a été faite à 37°C pendant 18 à 24h.

2. Identification des souches étudiées

Après réalisation des examens microscopiques et culturaux, l'identification biochimique a été réalisée par le système API 20E puis confirmée par le MALDI-TOF MS.

2.1. Système API 20 E (BioMérieux, Meylan, France)

C'est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés. La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. 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 à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (**Washington C.Winn et al., 2005**).

2.2. La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex)

Le spectromètre de masse MALDI-TOF (MALDI= *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) et un analyseur à temps de vol (TOF= *Time-Of-Flight*) (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (Seng et al., 2009).

La technique MALDI-TOF s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides. L'échantillon est mélangé à la matrice puis placé sur la cible. Le dépôt formé est appelé spot. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre (Seng et al., 2010).

Le protocole appliqué pour identifier les souches bactériennes est le suivant :

✓ Nettoyage de la plaque (la cible):

Consiste à rincer la plaque avec de l'eau chaude plusieurs fois, et à verser de l'éthanol à 70% que l'on frotte avec du papier de précision (type Kim Wipes), ensuite on plonge la cible dans l'éthanol pendant 15 min, puis on la frotte avec 500µl de TFA (acide Trifluoroacétique) à 80% et enfin on la rince avec de l'eau utilisée pour l'HPLC et on la laisse sécher à l'air libre.

✓ Préparation de la matrice

La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incident.

Dans un tube à Eppendorf on dispose les éléments suivants en respectant la procédure suivante :

- 10 mg d'acide alpha-cyano-4 hydrocinnamique (HCCA)
- 500 µl d'acétonitril HPLC
- 250 µl de TFA à 10% (acide trifluoroacétique)

- 250 µl d'eau HPLC
- Soniquer pendant 10 minutes dans un bain à ultrasons
- Centrifuger 5 minutes à 13000 RPM
- Transférer le surnageant dans un tube à Eppendorf propre, la matrice est prête à être utilisée

✓ **Préparation des échantillons pour l'analyse spectrométrique**

- Sous un PSM (poste de sécurité microbiologique), déposer 2 spots de 1.5 µL témoin positif (T+) (*E. coli*) et recouvrir chaque dépôt de 1.5 µL de matrice.

- Sur la ligne suivante même colonne, déposer 2 spots du témoin négatif (T-) (1.5 µL de matrice seule).

- Sur les lignes suivantes, déposer les échantillons en fine couche en deux exemplaires minimum: prélever une petite quantité de colonies bactériennes différentes pour un même échantillon à l'aide d'une pointe de cône de pipette de 10 µL.

- Une fois tous les dépôts effectués, déposer 1.5 µL de matrice sur chaque spot.

- Laisser sécher sous PSM puis ranger la cible MALDI dans sa boîte plastique.

✓ **Insertion de la cible et lancement du MALDI-TOF**

- La cible était ensuite introduite dans l'appareillage (Microflex, Bruker Daltonics, Germany) et exposée sous vide.
- Remplir la fiche du logiciel MALDI biotyper automation control
- Lancer le spectromètre de masse: Microflex

✓ **Interprétation des résultats de l'analyse spectrométrique**

MALDI TOF identifie les micro-organismes en utilisant le logiciel Biotyper 2.0. Le logiciel Biotyper MALDI mesure les protéines très abondantes qui se trouvent dans tous les micro-organismes. L'analyte est d'abord co-cristallisé a des petits composés organiques (matrice) pour le protéger d'un contact direct avec le faisceau ionisant et éviter sa dégradation. Ceux-ci vont absorber la radiation du laser UV et transférer l'énergie aux protéines qui s'ionisent positivement. Les ions générés vont se libérer des protéines. Les molécules chargées (+) sont alors accélérées dans un champ électrique. Après leur passage dans le champ électrique, les ions entrent dans un tube non soumis à un champ électrique et sont séparés selon leur masse-charge. Les ions prennent des vitesses différentes car les grosses molécules se déplacent plus lentement que les petites.

Ensuite, un analyseur de temps de vol va détecter le passage de chaque ion et créer les pics sur le spectre qui seront comparés à une base de données. Certains composants du spectre sont spécifiques à un genre, d'autres à une espèce voire une sous-espèce. Selon la qualité et la pureté de l'échantillon et le nombre de spectres de référence dans la base de données, l'identification de la bactérie se fait en quelques secondes à quelques minutes.

L'identification est correcte lorsque la valeur du score identifiée par le MALDI-TOF est ≥ 1.9 .

3. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par deux méthodes: la technique de diffusion sur milieu gélosé et la concentration minimale inhibitrice par la technique E-test.

3.1. Technique de diffusion sur milieu gélosé

✓ Principe

L'antibiogramme a été réalisé par la technique de diffusion sur milieu gélosé selon les normes préconisées par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM-2013).

Les disques d'antibiotiques utilisés (Bio-RAD) sont: amoxicilline/acide clavulanique (20/10 µg), aztéronam(30µg), céfotaxime(30µg), céftazidime(30µg), céfuroxime (30µg), céfoxitine (30µg), céfepime (30µg), imipénème (10µg), ertapénème (10µg), amikacine (30µg), tobramycine (10µg), gentamicine (15µg), amoxicilline (25µg), ciprofloxacine(5µg), ofloxacine (5µg), acide nalidixique (30µg), colistine (50µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75µg).

Un contrôle de qualité a été réalisé au préalable de chaque antibiogramme en utilisant la souche de référence: *Escherichia coli* ATCC 25922 pour s'assurer de la validité des résultats obtenus.

✓ Technique

- A partir d'une colonie jeune de 24h, mesurer la densité optique de l'inoculum en utilisant l'appareil de MacFarland et ajuster en ajoutant la culture s'il est très faible ou

de l'eau physiologique stérile s'il est très fort, la densité optique doit être équivalente à 10^8 UFC/ml (0,5 McFarland).

-Après avoir ajusté la turbidité de l'inoculum, tremper l'écouvillon dans cette suspension.

- Presser fermement contre la paroi intérieure du tube, tourner l'écouvillon pour enlever l'excès du liquide.

- Etaler à trois reprises sur la surface entière de la gélose Mueller Hinton, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application afin d'obtenir une distribution égale de l'inoculum.

- Appliquer les disques d'antibiotiques sur les boîtes de pétri après 15 minutes d'ensemencement à l'aide d'une pince stérile.

- Incuber les boîtes à 37°C pendant 18 heures à 24h.

✓ **Lecture et interprétation**

Mesurer avec précision les diamètres de chaque zone d'inhibition en mm, et classer les bactéries dans l'une des catégories: sensible, intermédiaire ou résistante.

3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par E-test

E-test est une technique quantitative pour la détermination sur milieu gélosé Mueller Hinton de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des antibiotiques vis-à-vis des microorganismes.

✓ **Préparation de l'inoculum:** A partir d'une culture jeune et pure de 24 heures, préparer une suspension de la souche à étudier, dans de l'eau physiologique stérile, d'une densité équivalente à 0,5Mc Farland.

✓ **Ensemencement:** Plonger un écouvillon stérile dans la suspension et retirer l'excès de liquide en appuyant l'écouvillon contre la paroi interne du tube. Ecouvillonner doucement toute la surface de la gélose dans trois directions. Laisser absorber complètement et s'assurer que la surface de la gélose est complètement sèche avant le dépôt des bandelettes E-test.

✓ **Application des bandelettes:** Appliquer les bandelettes E-test à la surface de la gélose en s'assurant que l'échelle de CMI soit positionnée correctement (vers soi). Utiliser une paire de pince pour le dépôt des

bandelettes. Veiller à ce que tout le gradient antibiotique soit en contact avec la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C.

- ✓ **Lecture:** Lire la CMI de l'antibiotique au point d'intersection de l'ellipse d'inhibition et de la bandelette.

4. Recherche phénotypique de la production des BLSE

Cette recherche a été effectuée par deux méthodes :

4.1. Milieu chromogène ESBL (Biomérieux)

chromID ESBL est un milieu chromogène innovant développé pour le dépistage des entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu.

- **Principe**

Isolement et détection des BLSE grâce à une base nutritive additionnée d'un mélange breveté d'antibiotiques conçus spécifiquement pour permettre la croissance sélective d'entérobactéries productrices de BLSE la plus fréquemment rencontrée, incluant le Céfepodoxime reconnu comme marqueur de choix de ce mécanisme de résistance et les substrats chromogènes pour l'identification directe des entérobactéries productrices de BLSE. Il suffit d'observer la couleur des cultures, le substrat chromogène contenu dans chaque milieu spécifique permet de distinguer chaque type de colonie par couleur: les colonies des souches de *S. marcescens* productrices de BLSE se distinguent par une couleur verte sur le milieu ESBL (Biomérieux) et d'une couleur rouge pour les souches productrices de la prodigiosine (<http://www.biomerieux-diagnostics.com/chromidr-esbl>) (2015). L'isolement et l'identification des micro-organismes se réalisent en une seule étape, ce qui permet de raccourcir le temps des résultats, il est d'une grande simplicité d'utilisation caractérisé par une inhibition sélective des bactéries Gram positif et des levures.

- **Méthode**

- Deviser la boîte du milieu ESBL (Biomérieux) en compartiments.
- Sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) et à l'aide d'une onse prélever une colonie de la bactérie à tester,
- Ensemencer la bactérie par strie dans un compartiment.

- Ensemencer dans un compartiment une souche déjà vérifiée BLSE+ comme témoin positif et une autre souche BLSE- comme témoin négatif.

- Incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

- **Lecture et interprétation des résultats**

- L'absence d'une culture désigne une bactérie BLSE-.

- La présence d'une culture verte ou rouge désigne une *S. marcescens* BLSE+.

4.2. Test de synergie

La détermination des phénotypes de la BLSE se fait par la détection des substrats préférentiels de cette enzyme; elle se réalise en recherchant les éventuelles images de synergie en « bouchon de champagne » ou en « entonnoir » qui peuvent apparaître sur gélose entre l'amoxicilline-acide clavulanique et une céphalosporine de troisième génération (Drieux et al., 2008).

La préparation de la suspension bactérienne ainsi que l'ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton sont réalisés selon la technique de l'antibiogramme en utilisant les disques d'antibiotiques suivants: l'amoxicilline-ac-clavulanique (AMC), la ceftazidime (CAZ), la cefotaxime (CTX), la ceftriaxone (CRO) et l'aztreonam (ATM) sont placés sur la gélose Mueller-Hinton. La distance entre deux disques est de 30 mm centre à centre. L'incubation des boîtes se fait 18 à 24h à 37°C (Nedjai et al., 2012).

Un résultat positif est basé sur l'inhibition des BLSE par l'acide clavulanique, et par conséquent l'augmentation de l'activité des céphalosporines de troisième et quatrième génération en présence d'acide clavulanique.

5. Recherche moléculaire des gènes de résistance

5.1. Extraction de l'ADN bactérien

Pour l'extraction d'ADN nous avons utilisé l'automate EZ1 BioRobot de QIAGEN. La technique des particules magnétiques donne à l'ADN une haute qualité.

Le rendement dépend de la souche de bactéries, de la densité, du volume d'échantillon et du volume d'élution. L'extraction dure 15 minutes. Le tampon ainsi que la protéinase K vont permettre d'éliminer les protéines et de libérer les acides nucléiques. Quand cette étape est terminée, les acides nucléiques sont capturés par les particules magnétiques

qui vont être lavées à plusieurs reprises. Lors de l'éluotion, l'éluât se détache des billes et celles-ci sont capturées par un système d'aimantation qui les retient.

- ✓ Le protocole d'extraction suivi est le suivant :
- Mettre 190µl de Tampon G2 dans des tubes carrés.
- Ajouter 10 µl de protéinase K.
- Ajouter quelques colonies bactériennes.
- Bien vortexer.
- Mettre au bain sec à 70°C pendant 10 min ou à 56°C toute une nuit.
- On place les tubes et les instruments nécessaires dans l'appareil EZ1 et on insère la carte EZ1 DNA Bacteria dans l'automate.
- Après avoir appuyé sur START, suivre les instructions de l'appareil, choisir le programme avec 50 µl de volume d'éluotion.

5.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) standard

Le principe de « Polymérase Chain Réaction » (PCR) consiste à amplifier spécifiquement une séquence cible. Les réactions d'amplifications des gènes codant pour la résistance aux β -lactamines, aminosides et quinolones sont réalisées avec des couples d'amorces spécifiques (Tableau 5) dans un thermocycleur de type BioRad. Les amplicons sont ensuite purifiés et séquencés, les séquences obtenues ont été comparées à celles déposées et blastées contre ARG-ANNOT (**Gupta et al., 2014b**) ou NCBI.

Le protocole utilisé pour effectuer une PCR standard est le suivant :

Dans une plaque à Thermocycleur ABI 2700 (Applied Biosystems) on dépose un volume total de 25µl du mélange réactionnel dans chaque puits composé des éléments suivants (Tableau 4):

Tableau 4: Composition des mélanges réactionnels pour la PCR standard.

Composant	Quantité
Quantitect Probe PCR Master Mix	12.5µl
Amorce Forward	0.5 µl
Amorce Reverse	0.5 µl
H ₂ O	6.5 µl
ADN à amplifier	5 µl

Les différentes étapes de la PCR standard comprennent une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 15 min à 95°C. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification de l'ADN avec 60 secondes à 94°C (dénaturations), 50 secondes à 50-60°C (appariement des amorces, température variable selon le T_m des amorces) et 1 min 30 secondes à 72°C (élongation, temps variable selon la taille du fragment à amplifier). Une étape finale de 7 min à 72°C permet de terminer la synthèse des brins inachevés.

- **Gènes de résistance aux β-lactamines**

La PCR standard a été utilisée pour l'identification des β-lactamases de classe A d'Ambler : *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB} et *bla*_{GES}.

- **Gènes de résistance aux aminosides**

Plusieurs gènes codant pour les enzymes modificatrices des aminosides ont été amplifiés par PCR standard: les acétyltransférases *aac(3)-Ia* et *aac(6')-Ib*, les nucléotidyltransférases *ant(2'')-Ia* et *aadA*, et les phosphotransférases *aph(3')-VI*. D'autres gènes qui codent pour les 16S ARNr méthyltransférases ont été également amplifiés par PCR standard: *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*.

- **Gènes de résistance aux quinolones**

La résistance aux quinolones est analysée en amplifiant les gènes *qnrA* et *qnrB*.

Tableau 5: Amorces utilisées pour les PCR standard et séquençage utilisées pour les souches de *Serratia marcescens*.

Gene	Amorce	Séquence des amorces	Taille d'amplicon (bp)	Référence
β-lactamases				
<i>bla_{TEM}</i>	<i>TEM-F</i>	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	840	(Kruger et al., 2004)
	<i>TEM-R</i>	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG		
<i>bla_{CTX}</i>	<i>CTX-F</i>	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	544	(Edelstein et al., 2003)
	<i>CTX-R</i>	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		
<i>bla_{SHV}</i>	<i>SHV-F</i>	TTTATGGCGTTACCTTTGACC	1051	(Yagi et al., 2000)
	<i>SHV-R</i>	ATTTGTGCGTTCTTTACTCGC		
<i>bla_{PER}</i>	<i>PER-F</i>	GTAGTATCAGCCCAATCCCC	738	(Melano et al., 2003)
	<i>PER-R</i>	CCAATAAAGGCCGTCCATCA		
<i>bla_{VEB}</i>	<i>VEB-F</i>	GGAACAACCTTTGACGATTGA	374	(Melano et al., 2003)
	<i>VEB-R</i>	CCCTGTTTTATGAGCAACAA		
<i>bla_{GES}</i>	<i>GES-F</i>	GAAAAAGCAGCTCAGATCG	597	(Melano et al., 2003)
	<i>GES-R</i>	CAACAACCCAATCTTTAGGA		
Aminoglycosides modifying encoding genes				
<i>aac(3)-Ia</i>	<i>aac(3)-Ia-F</i>	GACATAAGCCTGTTCCGGTT	372	(Noppe-Leclercq et al., 1999)
	<i>aac(3)-Ia-R</i>	CTCCGAACTCACGACCGA		
<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-F</i>	TATGAGTGGCTAAATCGAT	395	(Noppe-Leclercq et al., 1999)
	<i>aac(6')-Ib-R</i>	CCCGCTTTCTCGTAGCA		
<i>aadA</i>	<i>aadA-F</i>	CCCAATTTGTGTAGGGCTTA	812	(Belbel et al., 2014)
	<i>aadA-R</i>	TTGTACGGCTCCGCAGTG		
<i>ant(2'')-I</i>	<i>ant(2'')-I-F</i>	GACACAACGCAGGTCACATT	524	(Kim et al., 2008)
	<i>ant(2'')-I-R</i>	CGCATATCGCGACCTGAAAGC		
<i>aph(3')-VI</i>	<i>aph(3')-VI-F</i>	CGGAAACAGCGTTTTAGA	716	(Noppe-Leclercq et al., 1999)
	<i>aph(3')-VI-R</i>	TTCCTTTTGTGTCAGGTC		
<i>armA</i>	<i>armA-F</i>	AGGTTGTTTCCATTTCTGAG	590	(Kim et al., 2008)
	<i>armA-R</i>	TCTCTCCATTCCCTTCTCC		
<i>rmtA</i>	<i>rmtA-F</i>	CTAGCGTCCATCCTTTCTC	634	(Kim et al., 2008)
	<i>rmtA-R</i>	TTTGCTTCCATGCCCTTGCC		

rmtB	<i>rmtB-F</i>	ATGAACATCAACGATGCCCT	769	(Yan et al., 2004)
	<i>rmtB-R</i>	CCTTCTGATTGGCTTATCCA		
rmtC	<i>rmtC-F</i>	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG	711	(Doi and Arakawa, 2007)
	<i>rmtC-R</i>	ATCCCAACATCTCTCCCACT		
rmtD	<i>rmtD-F</i>	CGGCACGCGATTGGGAAGC	401	(Doi and Arakawa, 2007)
	<i>rmtD-R</i>	CGGAAACGATGCGACGAT		
rmtE	<i>rmtE-F</i>	ATGAATATTGATGAAATGGTTG C	818	(Davis et al., 2010; Hidalgo et al., 2013)
	<i>rmtE-R</i>	TGATTGATTTCCCTCCGTTTTTG		
rmtF	<i>rmtF-F</i>	GCGATACAGAAAACCGAAGG	589	(Hidalgo et al., 2013)
	<i>rmtF-R</i>	ACCAGTCGGCATAGTGCTTT		
Quinolones				
qnrA	<i>qnrA-F</i>	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	543	(Touati et al., 2008)
	<i>qnrA-R</i>	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA		
qnrB	<i>qnrB-F</i>	GACAGAAACAGGTTACCCGGT	469	(Touati et al., 2008)
	<i>qnrB-R</i>	CAAGACGTTCCAGGAGCAACG		

6. Analyse des produits de l'amplification

6.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille, leur charge électrique.

Pour vérifier la présence et l'amplification du gène cible, les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1% dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA). La migration se fait pendant 25 minutes sous un voltage de 135V. Les différentes étapes de préparation sont les suivantes :

- **La préparation du gel d'agarose**

- Dans une bouteille, mélanger 6g de poudre d'agarose dans 400ml du Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5 X.
- Ajouter la solution de Bromure d'Ethidium BET diluée ou le Sybersafe (intercalant d'ADN) (12.5 µl pour 50 ml gel d'agarose).
- Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange transparent.
- Laisser refroidir.

- Mettre le peigne dans le support du gel et couler le gel.
- Laisser refroidir le gel jusqu'à solidification.

- **Electrophorèse des produits d'amplification**

- Retirer les peignes après polymérisation du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE X0.5 et le gel doit être totalement émergé par ce tampon.
- Déposer 4µl du DNA marqueur de poids moléculaire [100 Base-Paire Ladder (Gibco-BRL, 15 628-019)] dans le premier et/ou le dernier puits.
- Mélanger 4 µl du produit amplifié (ADN) avec une goutte du tampon de charge (10X Blue Juice®, Gel Loading Buffer Invitrogen®).

- **Migration**

- Déposer le produit amplifié avec un témoin négatif (Mix sans ADN) et un témoin positif (Mix contenant l'ADN recherché)
- Fermer le couvercle de la cuve et brancher la cuve au générateur.
- Mettre l'alimentation sous tension à 135V et régler la durée de migration à environ 25 min.

- **Révélation**

- Une fois la migration finie, placer le gel dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le poids moléculaire du gène du témoin positif, puis photographier et interpréter les résultats.

7. Séquençage

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger modifiée, en utilisant le kit BigDye Terminator v3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le séquenceur Automate ABI 3130 (Applied Biosystems). Le séquençage passe par les étapes suivantes :

- **Purification**

On ajoute au produit PCR 100µl d'eau ultra pure, puis on transfère le tout dans une plaque blanche Machery Nagel à filtre pour faire la première purification. Ensuite, on dépose cette plaque à filtre sur une pompe sous vide pendant 20 min (filtration sous vide). Enfin, on ajoute 50 µl d'eau ultra pure et on agite pendant 20 min sur un agitateur. Le produit est purifié et prêt pour la PCR BigDye.

- **PCR BigDye**

Cette PCR consiste à amplifier le forward et le reverse séparément pour les séquencer. Le protocole utilisé pour effectuer une PCR BigDye est le suivant :

Dans une plaque de thermocycleur Bio-rad on dépose 20µl du mélange réactionnel dans chaque puit composé de **buffer, mix Big Dye, amorce R ou amorce F, H₂O UP et ADN à amplifier**. Pour chaque ADN pure d'une souche bactérienne, on fait 2 mélanges réactionnels séparés, un pour le forward et l'autre pour le reverse, exécuté selon le programme porté dans le tableau 7.

L'amplification pour la PCR BigDye est programmée en 25 cycles.

Tableau 6: Composition du mélange réactionnel pour la PCR BigDye.

Composants pour Forward	Composants pour Reverse	Quantité PCR BigDye
Buffer	Buffer	3 µl
MixBigDye	MixBigDye	2 µl
Amorce F	Amorce R	1 µl
H ₂ O UP	H ₂ O UP	10 µl
ADN à amplifier	ADN à amplifier	4 µl
Volume totale	Volume totale	20 µl

Tableau 7: Programme de l'amplification de la PCR BigDye.

Température	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Temps	2 min	10 sec	5 sec	1min15 sec	∞

- **Préparation et purification par Sephadex**

Dans une plaque à filtre spécifique à la purification par Sephadex G 50 de la marque sigma, on met la poudre de Sephadex dans les puits de la plaque auxquels on ajoute 300µl d'eau ultra pure et laisser reposer 2 à 3 heures. Après avoir mis la plaque à filtre au dessus d'une plaque contenant des puits, on réalise une centrifugation à 12000 rpm pendant 10min à 10°C pour récupérer l'excédent d'eau dans les puits qui sera jeté. On met par la suite, les produits PCR BigDye dans la plaque à filtre qui sera placée sur une deuxième plaque à puits pour collecter après centrifugation (à 12000 rpm pendant 10min à 10°C) les produits PCR sont donc purifiés et la plaque est ensuite recouverte par un papier de protection.

Le produit récupéré est alors prêt à être séquencer.

- **Méthode du séquençage**

- Remplir les fiches pour séquençage.
- Préparer la plaque pour le séquençage (mettre le support).
- Mettre la plaque dans le séquenceur Automate ABI 3130.
- Lancer le séquençage

8. Analyse des séquences ADN

- La correction et l'analyse des séquences obtenues ont été faites par le logiciel Sequencher aligner 4.1.4.
- Comparer les séquences *via* internet avec les séquences homologues retrouvées dans la banque informatique internationale « GenBank » en utilisant soit le BLSATN (séquence nucléotidique) qui compare les bases azotées de l'ADN ou le BLASTP (séquence protéique) qui compare les acides aminés de la protéine traduite.
- Les résultats sont ensuite exprimés en pourcentage de similarité de la souche à étudier avec les espèces les plus proches pour déterminer leur affiliation génétique ou bien par l'utilisation d'un logiciel appelé ARG-ANNOT (Gupta et al., 2014b).

❖ **Clustering des phénotypes et des génotypes de la résistance de *S. marcescens***

Les tests de la sensibilité aux antibiotiques ont été déterminés pour 18 antibiotiques, et la détermination des gènes de la résistance ont été réalisés comme décrit précédemment. Les résultats d'antibiogramme et les gènes de la résistance des souches ont été introduits dans le logiciel MultiExperiment Viewer (MeV), c'est est un outil de clustering hiérarchique simple et rapide, appliqué aux résultats d'antibiogramme et les gènes de résistance, en mesure d'étudier qualitativement et quantitativement la prévalence des phénotypes et des génotypes qui pourraient rapidement être mis en œuvre en routine dans des laboratoires de microbiologie clinique.

Afin d'effectuer la classification hiérarchique, les données d'antibiogramme (Résistant et Sensible) sont transformées en valeurs (1 et -1), et les données des gènes (Présent et Absent) en valeurs (1 et 1-) respectivement où la couleur marron indique les souches résistantes aux antibiotiques et porteuses des gènes de résistance.

9. Expérience de la conjugaison et le transfert de la résistance

Le mode de transfert génétique par conjugaison consiste en un transfert du matériel génétique (plasmide) par l'intermédiaire d'un pont cytoplasmique entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice.

L'expérience de conjugaison dans notre étude a été réalisée dans le but de vérifier la nature plasmidique des supports des BLSE et le 16S ARNr méthyltransférase et leurs transférabilité.

Nous avons pris cinq souches de *S. marcescens* (3 pigmentées et 2 non pigmentées) qui portent les gènes de résistance; *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{TEM-1}*, *aadA* et *armA*, ces souches ont été utilisées comme donatrices putatives.

La conjugaison a été réalisée en utilisant comme souche réceptrice la souche *Escherichia coli* J53 (appelée aussi F- ou Azide R) qui est une dérivé de *E. coli* K-12 résistante seulement à l'azide (l'azoture de sodium) et sensible à tous les antibiotiques.

Les tranconjugants ont été sélectionnées sur gélose de Lauria Bertani (LB) additionnée de l'azide de sodium (100µg/ml) et de la céftriaxone (20µg/ml).

Les souches donatrices et réceptrices ont été cultivées dans des tubes contenant 9 ml de bouillon de soja Trypticase (TSB) (Becton Dickinson and Company, France).

Les clones transconjugés ont été choisis après culture sur de la gélose Luria-Bertani (LB) (Becton Dickinson and Company, France) contenant de la ceftriaxone (20ug/ml) et de l'azide (100ug/ml), et caractérisés en utilisant MALDI-TOF MS.

Un antibiogramme a été réalisé pour confirmer l'acquisition du phénotype de résistance des transconjugants et l'amplification par PCR comme décrit ci-dessus pour vérifier la présence des gènes de résistance aux antibiotiques.

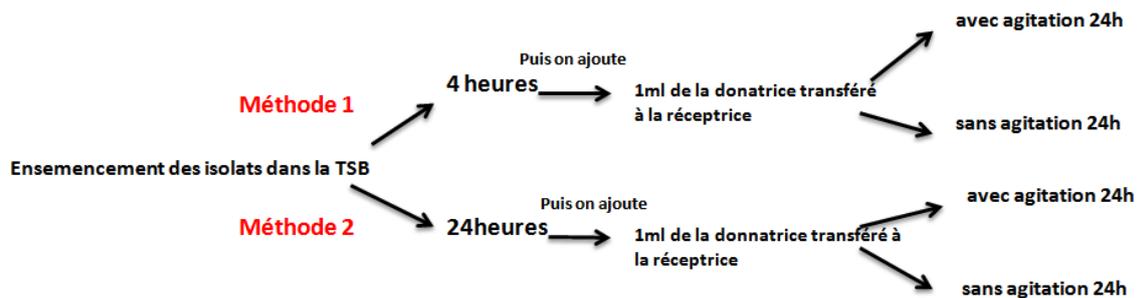
Les étapes réalisées pour la conjugaison sont comme suit:

➤ **Jour 1**

Ensemencer la souche *E coli J53* réceptrice et les souches *S. marcescens* donatrices sur le milieu MacConkey et incubé pendant 24 heures à 37°C.

➤ **Jour2**

- Cultiver la souche réceptrice et les souches de *S. marcescens* donatrices dans 9ml de bouillon de TSB (Becton Dickinson and Company, France) comme suit :



➤ **Jour 3**

- Préparer les boîtes des milieux sélectifs de Luria–Bertani agar (LB) (Becton Dickinson and Company, France) en ajoutant à la gélose le ceftriaxone (20µg/ml) et l'Azide (100µg/ml).

- Ensemencer par épuisement le mélange sur la moitié des boîtes comme le montre la figure N°4.

- Vérifier la sélectivité des milieux utilisés en ensemençant par spot (ou par dépôt de 4µl à l'aide d'une micropipette) la souche donatrice et la souche réceptrice dans l'autre moitié.

- Incuber 24 heures à 48heures à 37°C.

➤ **Jour 4**

- Après incubation, identifier la culture du transconjugant par MALDI-TOF-MS.
- Faire un antibiogramme du transconjugant et de la souche donatrice et la réceptrice selon les recommandations de la CA-SFM.

➤ **Jour 5**

- Comparer les antibiogrammes.
- Vérifier le transfert des gènes de résistance des transconjugants par l'extraction de ses ADN et réaliser les PCR standard des gènes CTX-M, TEM, aadA2 et *armA* codants pour la résistance aux β -lactamines et aux aminosides et leur séquençage.

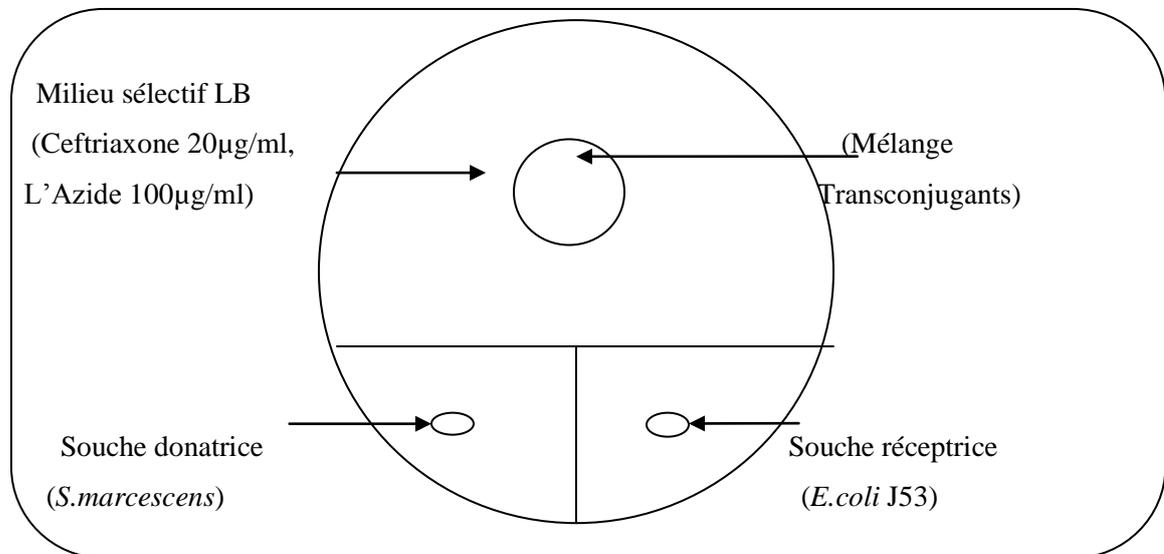


Figure 4: Schéma explicatif de la disposition des souches sur le milieu LB.

10. Extraction et analyse du plasmide

Après avoir obtenus les transconjugants, une extraction de leur ADN a été faite à fin d'analyser leur plasmide plasmidique et détecter leur groupe d'incompatibilité. Le réplicon-typing des plasmides a permis de les assigner majoritairement aux groupes d'incompatibilité.

✓ **Extraction du plasmide**

Cinq souches de *S. marcescens* possédant un plasmide conjugatif ont fait l'objectif d'une extraction plasmidique en utilisant la colonne QIAGEN provenant du QIAprep® Spin Miniprep Kit.

Le protocole suivi est celui décrit dans le manuel d'utilisation du manufacturier comme suit :

- 1) **A partir d'une colonie fraîchement isolée sur boîte, préparer une culture de nuit en milieu LB additionné de l'antibiotique approprié. Incuber 12 à 16h à 37°C avec agitation.**
- 2) **Récupérer 1,5 mL de culture et centrifuger à au moins 8000 rpm dans une microcentrifugeuse de paillasse à température ambiante.** (Pour des plasmides à moyen ou bas nombre de copies, on peut centrifuger successivement 2 x 1,5 mL de culture afin d'augmenter le rendement).

Éliminer la totalité du surnageant par retournement.

- 3) **Resuspendre totalement le culot bactérien dans 250 µL de tampon P1 et transférer dans un tube eppendorf.** Vérifier au préalable que la RNase a été ajoutée au tampon P1.

NB : Il ne doit pas rester d'agrégats bactériens visibles après cette étape.

- 4) **Ajouter 250 µL de tampon P2 et mélanger délicatement en retournant le tube 4 à 6 fois.** La solution doit devenir visqueuse. **Ne laisser pas cette réaction de lyse se prolonger plus de 5 minutes.**

Si le tampon P1 contenait du « LyseBlue », la solution doit virer au bleu après ajout de P2, et la coloration être bien homogène après le mélange.

- 5) **Ajouter 350 µL de tampon N3 et mélanger immédiatement et vigoureusement en retournant le tube 4 à 6 fois.**

Un précipité blanc nuageux doit se former.

Si le « LyseBlue » a été utilisé, mélanger jusqu'à disparition de la coloration bleue. Une suspension homogène et incolore indique que le SDS a bien été précipité.

- 6) **Centrifuger pendant 10 minutes à 13 000 rpm sur une centrifugeuse de paillasse.**

Un culot compact se forme au fond du tube.

- 7) **Récupérer le surnageant et déposer le sur la colonne QIAprep. Centrifuger pendant 45 secondes. Eliminer le liquide collecté.**

- 8) **Laver la colonne QIAprep en ajoutant 500 µL de tampon PB et centrifuger pendant 45 secondes. Eliminer le liquide collecté.**

Cette phase de lavage permet d'éliminer les traces de nucléases.

- 9) **Laver la colonne QIAprep en ajouter 750 µL de tampon PE et centrifuger pendant 45 secondes.**

- 10) **Eliminer le liquide collecté et re-centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute supplémentaire pour éliminer toute trace de tampon de lavage.**

Des traces d'éthanol résiduel pourraient inhiber les réactions enzymatiques réalisées ultérieurement sur l'ADN préparé.

- 11) **Déposer la colonne sur un tube eppendorf propre de 1,5 mL. Ajouter 50 µL de tampon EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) ou d'eau qualité biologie moléculaire au centre de la colonne.**

Laisser reposer 1 minute puis centrifuger 1 minute à vitesse maximale.

Eliminer la colonne et étiqueter correctement le tube contenant l'ADN extrait.

Conserver à -20° C jusqu'à l'utilisation.

✓ **Visualisation du plasmide**

Une migration sur gel d'agarose des plasmides extraits à 1% à 135V pendant trois heures réalisées selon les étapes décrites précédemment en utilisant le phage Lamda digéré par HINDIII comme marqueur de poids.

10-1-Détermination du groupe d'incompatibilité des plasmides

Les plasmides sont classés en groupe d'incompatibilité en fonction de leur système de contrôle de la réplication. Pour caractériser les plasmides transférés aux transconjugants,

L'ADN total a été extrait à partir des transconjugants et les plasmides ont été identifiés en fonction de leur groupe d'incompatibilité.

Les 18 groupes d'incompatibilité les plus fréquents chez les entérobactéries ont été utilisés (**HI1, HI2, I1, X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, FI1A, F, P, W, T, A/C, K, B/O, Y**) (Tableau 8) (**Carattoli et al., 2005**).

Pour chaque souche productrice de **BLSE, arma et aadA2**, des PCR ont été réalisées pour la recherche de ces groupes d'incompatibilité.

Tableau 8: Les amorces utilisées dans l'analyse du plasmide (**Carattoli et al., 2005**).

Name	DNA sequence	Amplicon size (bp)
HI1 FW	5'-GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC-3'	471
HI1 RV	5'-TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA-3'	
HI2 FW	5'-TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC-3'	644
HI2 RV	5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'	
I1 FW	5'-CGAAAGCCGGACGGCAGAA-3'	139
I1 RV	5'-TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT-3'	
X FW	5'-AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT-3'	376
X RV	5'-TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC-3'	
L/M FW	5'-GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG-3'	785
L/M RV	5'-CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG-3'	
N FW	5'-GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3'	559
N RV	5'-GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-3'	
FIA FW	5'-CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG-3'	462
FIA RV	5'-GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG-3'	
FIB FW	5'-GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG-3'	702
FIB RV	5'-CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT-3'	
W FW	5'-CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG-3'	242
W RV	5'-GGTGCGCGGCATAGAACCGT-3'	
Y FW	5'-AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG-3'	765
Y RV	5'-GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTTT-3'	
P FW	5'-CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA-3'	534
P RV	5'-TCACGCGCCAGGGCGCAGCC-3'	
FIC FW	5'-GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG-3'	262
FIC RV	5'-TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT-3'	
A/C FW	5'-GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA-3'	465
A/C RV	5'-ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT-3'	
T FW	5'-TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT-3'	750
T RV	5'-CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC-3'	
FI1S FW	5'-CTGTCGTAAGCTGATGGC-3'	270
FI1S RV	5'-CTCTGCCACAACTTCAGC-3'	
FrepB FW	5'-TGATCGTTTAAGGAATTTTG-3'	270
FrepB RV	5'-GAAGATCAGTCACACCATCC-3'	
K/B FW	5'-GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC-3'	160
K RV	5'-TCTTTCACGAGCCCGCCAAA-3'	
B/O RV	5'-TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA-3'	159

11. L'analyse phylogénétique

On a essayé dans cette étude et pour la première fois d'utiliser une autre méthode en sélectionnant quatre gènes de ménage (*gyrB*, *rpoB*, *infB* et *atpD*). Pour la détermination de la relation phylogénétique entre les isolats, les amorces ont été extraites d'une étude précédente sur le multilocus sequencing analysis (MLSA) (Tableau 9).

L'amplification et le séquençage ont été réalisés et les séquences obtenues sont assemblées, analysées, corrigées à l'aide du logiciel Sequencher concaténées puis alignées avec ClustalW, ensuite analysées par le logiciel MEGA 6, en utilisant la méthode « Neighbour-joining » avec un bootstrap 1000. Un arbre phylogénétique a été donc construit par ce MEGA6 software qui est un système intégré qui fournit des outils pour effectuer un alignement automatique et manuel, inférer des arbres phylogénétiques, estimer des taux de l'évolution moléculaire, déduire des séquences ancestrales et de tester des hypothèses d'évolution. Son objectif consistait à explorer, découvrir, et analyser l'ADN et les séquences protéiques dans une perspective évolutive (**Tamura et al., 2013**).

Tableau 9: les amorces utilisées pour la construction d'un arbre phylogénétique de *S. marcescens* (Brady et al., 2008).

Séquence [5'-3']	
Amplification primers	
gyrB 01-F	TAARTTYGAYGAYAACTCYTAYAAAGT
gyrB 02-R	CMCCYTCCACCARGTAMAGTT
rpoB CM7-F	AACCAGTTCCGCGTTGGCCTG
rpoB CM31b-R	CCTGAACAACACGCTCGGA
atpD 01-F	RTAATYGGMGCSGTRGTNGAYGT
atpD 02-R	TCATCCGCMGGWACRTAWAYNGCCTG
infB 01-F	ATYATGGGHCAYGTHGAYCA
infB 02-R	ACKGAGTARTAACGCAGATCCA
Sequencing primers	
gyrB 07-F	GTVCGTTTCTGGCCVAG
gyrB 08-R	CTTTACGRGKGCATWTCAC
rpoB CM81-F	CAGTTCCGCGTTGGCCTG
rpoB CM81b-F	TGATCAACGCCAAGCC
rpoB CM32b-R	CGGACCGGCCTGACGTTGCAT
atpD 03-F	TGCTGGAAGTKCAGCARCAG
atpD 04-R	CCMAGYARTGCGGATACTTC
infB 03-F	ACGGBATGATYACSTTCCTGG
infB 04-R	AGYTTAGATTTCTGCTGACG

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION

1. Isolement des souches bactériennes

Sur le milieu MacConkey, certaines colonies apparaissent bombées d'une couleur transparente et d'autres colonies sont d'une couleur rose à rouge vif parfois orange suite à la production d'une pigmentation appelée la prodigiosine (Figure 5).

1.2. Répartition des souches selon la pigmentation (Prodigiosine)

Un taux de 56% des souches produisent de la prodigiosine sur le milieu MacConkey à une température inférieure à celle de la température d'incubation (Figure N°5).

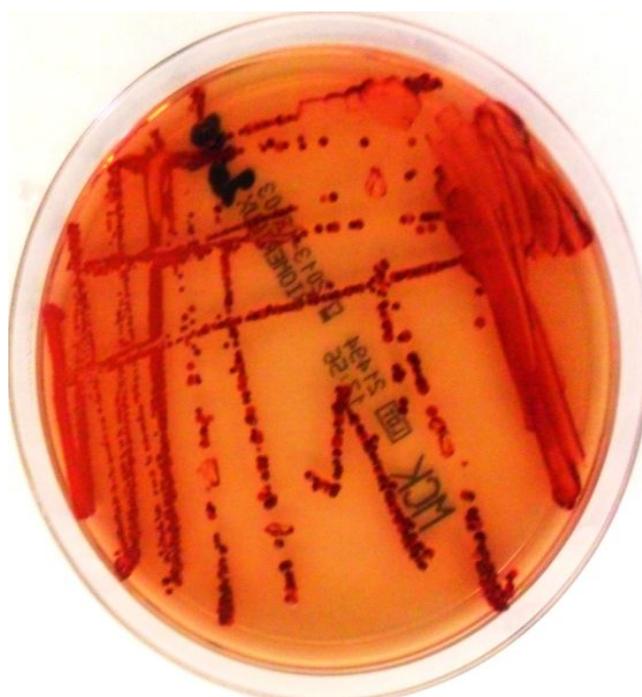


Figure 5: Souche N° 50 de *S. marcescens* productrice de prodigiosine sur gélose MacConkey à la température ambiante.

La figure 6 montre la répartition des souches de *S. marcescens* selon la production de la prodigiosine.

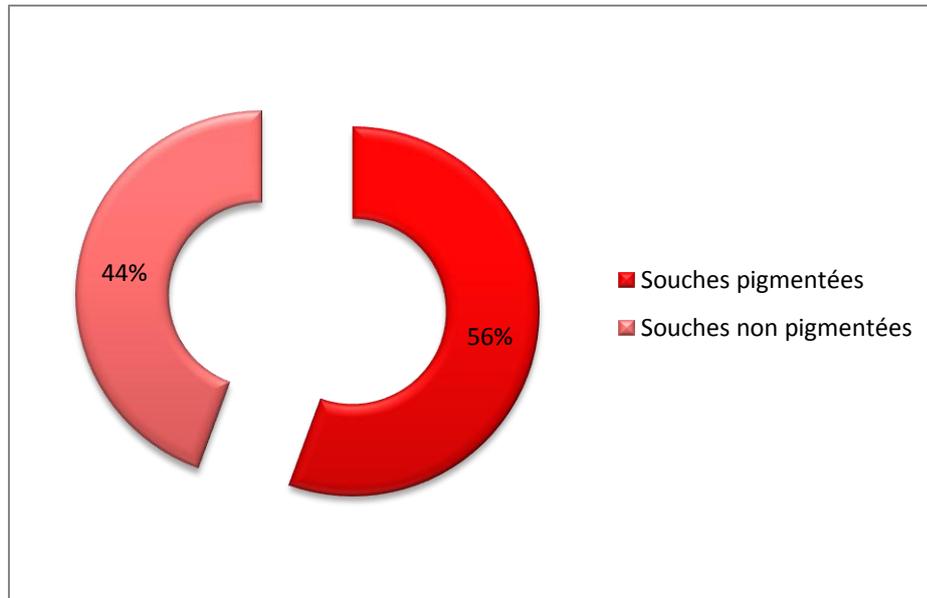


Figure 6: Répartition de *S. marcescens* selon la pigmentation (Prodigiosine).

2. Identification des souches isolées

2.1. Identification par API 20E

L'identification par le système Api 20E (Biomérieux, Meylan, France) nous a montré que les 54 souches testées répondent à certains profils numériques spécifiques de l'espèce *S. marcescens*.

30 souches correspondent parfaitement au profil numérique de *S. marcescens* avec une excellente identification appartenant au code 5 307 761 ce qui présente un taux de (56%), 15 souches correspondent au code 5 307 771 avec (RHA+) ce qui représente un taux de (28%). 5 souches font partie du profil numérique qui appartient au code 5 306 761 avec (VP-) (9%) et 4 souches au profil 5 317 761 (URE+) (7%).

2.2. Identification par MALDI-TOF MS

Une seconde technique par la spectrométrie de masse MALDI-TOF-Microflex a confirmé l'identification par Api 20E des 54 souches de *S. marcescens* isolées et elle a donné de très bons scores allant de 1.910 à 2.302, comme le montre la figure N°7 et le tableau N° 10.

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
A1 (+)(B)	A1	<i>Serratia marcescens</i>	1.766	not reliable identification	1.366
A2 (+)(A)	A2	<i>Serratia marcescens</i>	2.172	<i>Serratia marcescens</i>	2.066
A3 (+)(B)	A3	<i>Serratia marcescens</i>	2.205	<i>Serratia urelytica</i>	2.142
A4 (+)(B)	A4	<i>Serratia marcescens</i>	2.232	<i>Serratia marcescens</i>	2.189
B1 (+)(B)	B1	<i>Serratia marcescens</i>	2.261	<i>Serratia marcescens</i>	2.205
B2 (+)(B)	B2	<i>Serratia marcescens</i>	2.239	<i>Serratia marcescens</i>	2.177
B3 (+)(B)	B3	<i>Serratia marcescens</i>	2.24	<i>Serratia marcescens</i>	2.238
B4 (+)(A)	B4	<i>Serratia marcescens</i>	2.167	<i>Serratia marcescens</i>	2.152
C1 (+)(B)	C1	<i>Serratia marcescens</i>	2.125	<i>Serratia marcescens</i>	2.109
C2 (+)(B)	C2	<i>Serratia marcescens</i>	2.185	<i>Serratia marcescens</i>	2.14
C3 (+)(B)	C3	<i>Serratia marcescens</i>	2.168	<i>Serratia marcescens</i>	2.127
C4 (+)(A)	C4	<i>Serratia marcescens</i>	1.922	<i>Serratia marcescens</i>	1.866

Figure 7: Exemple des scores d'identification bactérienne des souches de *S. marcescens* obtenue par le MALDI-TOF.

Tableau 10: Provenance des 54 souches de *S. marcescens* isolées et leurs scores MALDI-TOF-MS.

Code	Nature de prélèvement	Age	Sexe	Service	Score MALDI-TOF
C1	Urine	83 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.175-2.143]
C2	Urine	30mois	Homme	Chirurgie urologique	[2.292 -2.199]
C3	Urine	1mois	Homme	Chirurgie urologique	[2.15- 2.189]
C4	Urine	39 ans	Homme	Chirurgie urologique	[1.925-1.951]
C5	Pus	35 ans	Femme	Chirurgie urologique	[2.177-2.257]
C6	Urine	67 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.072-2.131]
C7	Urine	75 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.040 -1.94]
C8	Pus	75 ans	Femme	Chirurgie urologique	[2.256-2.210]
C9	Urine	72 ans	Femme	Chirurgie urologique	[1.921-2.037]
C10	Urine	68 ans	Femme	Chirurgie urologique	[1.976-2.019]
C11	Urine	58 ans	Homme	Chirurgie urologique	[1.91 - 2.05]
C12	Urine	72 ans	Homme	Chirurgie urologique	[1.978-2.199]
C13	Urine	33 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.178-2.251]
C14	Urine	36 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.15-2.013]
C15	Urine	26 ans	Homme	Chirurgie urologique	[1.977-2.199]
C16	Urine	34 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.063-2.266]
C17	Urine	28 ans	Femme	Chirurgie urologique	[1.995-2.11]
C18	Urine	62 ans	Femme	Chirurgie urologique	[2.255-2.231]
C19	Urine	55 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.063-2.018]
C20	Urine	5 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.022-2.208]
C21	Urine	12 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.170-2.171]
C22	Pus	4 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.259-2.264]
C23	Urine	5 ans	Femme	Chirurgie urologique	[2.086-2.087]
C24	Urine	64 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.082-2.159]
C25	Urine	4ans	Femme	Chirurgie urologique	[2.156-2.122]
C26	Pus	67 ans	Homme	Chirurgie urologique	[1.958-1.927]
C27	Urine	5 ans	Femme	Chirurgie urologique	[2.130-2.118]
C28	Urine	50 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.139-2.226]
C29	Urine	9 ans	Femme	Chirurgie urologique	[2.035-2.135]
C30	Urine	47 ans	Femme	Chirurgie urologique	[2.192-2.259]
C31	Urine	58 ans	Homme	Chirurgie urologique	[1.992-2.032]
C32	Urine	23 ans	Femme	Chirurgie urologique	[2.297 -2.228]
C33	Urine	73 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.170-2.238]
C34	Urine	80 ans	Homme	Chirurgie urologique	[1.967-2.124]

C35	Urine	44 ans	Femme	Chirurgie urologique	[1.925-2.199]
C36	Urine	75 ans	Homme	Chirurgie urologique	[2.11 -2.132]
C37	Urine	43 ans	Femme	Ambulatoire	[1.928-1.939]
C38	Urine	51 ans	Homme	Ambulatoire	[2.147-2.266]
C39	Urine	47 ans	Femme	Ambulatoire	[2.244-2.034]
C40	Urine	56 ans	Homme	Ambulatoire	[2.267 -2.127]
C41	Urine	47 ans	Femme	Ambulatoire	[2.153-2.101]
C42	Urine	20 ans	Homme	Ambulatoire	[1.988-1.976]
C43	Urine	73 ans	Femme	Ambulatoire	[2.283-2.177]
C44	Urine	50 ans	Homme	Ambulatoire	[1.9 -2.199]
S1	Pus	2 ans	Homme	Néonatalogie	[2.170-2.146]
S2	Pus	2ans	Homme	Néonatalogie	[2.084-2.074]
S3	Pus	2mois	Homme	Néonatalogie	[2.111-2.065]
A1	Urine	58 ans	Homme	Communautaire	[2.18 -2.147]
A2	Urine	60 ans	Homme	Communautaire	[2.089-2.040]
A3	Urine	50 ans	Femme	Communautaire	[2.283-2.302]
A4	Urine	66 ans	Homme	Communautaire	[1.959 -2.048]
A5	Urine	45 ans	Femme	Communautaire	[2.147 -2.17]
A6	Urine	40 ans	Femme	Communautaire	[1.995-2.075]
A7	Urine	65 ans	Femme	Communautaire	[2.143-2.078]

(C): Constantine (Etablissement hospitalier spécialisé), (A): Annaba (Laboratoires privés), (S): Skikda (Etablissement hospitalier public).

2.3. Répartition des souches selon le sexe

Au total, 54 patients touchés par *S. marcescens* sont concernés par cette étude, on remarque que les hommes sont les plus touchés par cette bactérie 33 (61%) par rapport aux femmes 21 (39%). Le sexe ratio est de 0.64 (Figure 8).

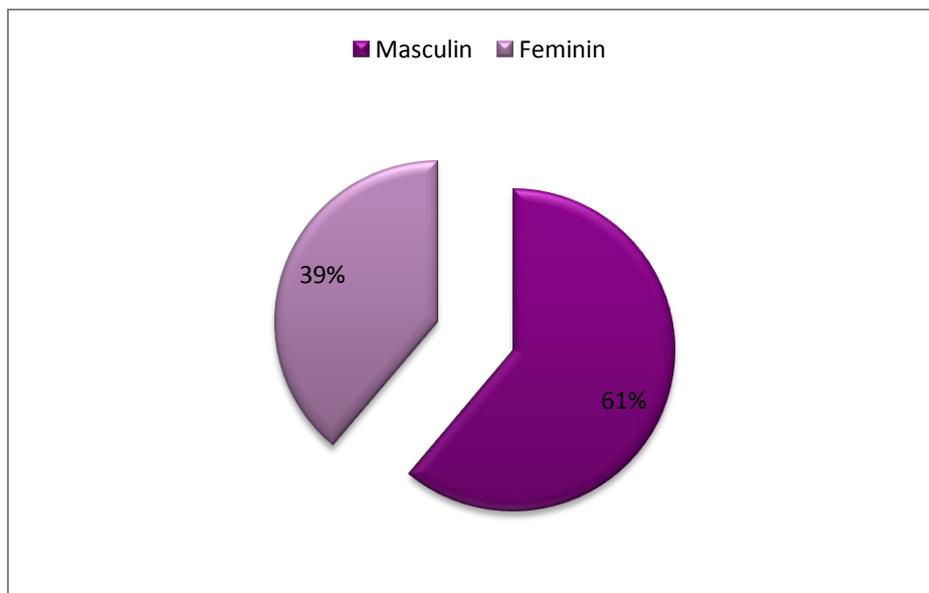


Figure 8: Répartition de *S. marcescens* selon le sexe.

2.4. Répartition des souches selon l'âge des patients

Toutes les tranches d'âges sont touchées par *S. marcescens* et cela varie entre 1 mois et 83 ans. La tranche d'âge qui semble la plus touchée par *S. marcescens* dans notre étude est la population des personnes dont l'âge dépasse 50 ans soit un pourcentage de 43%. (Figure 9).

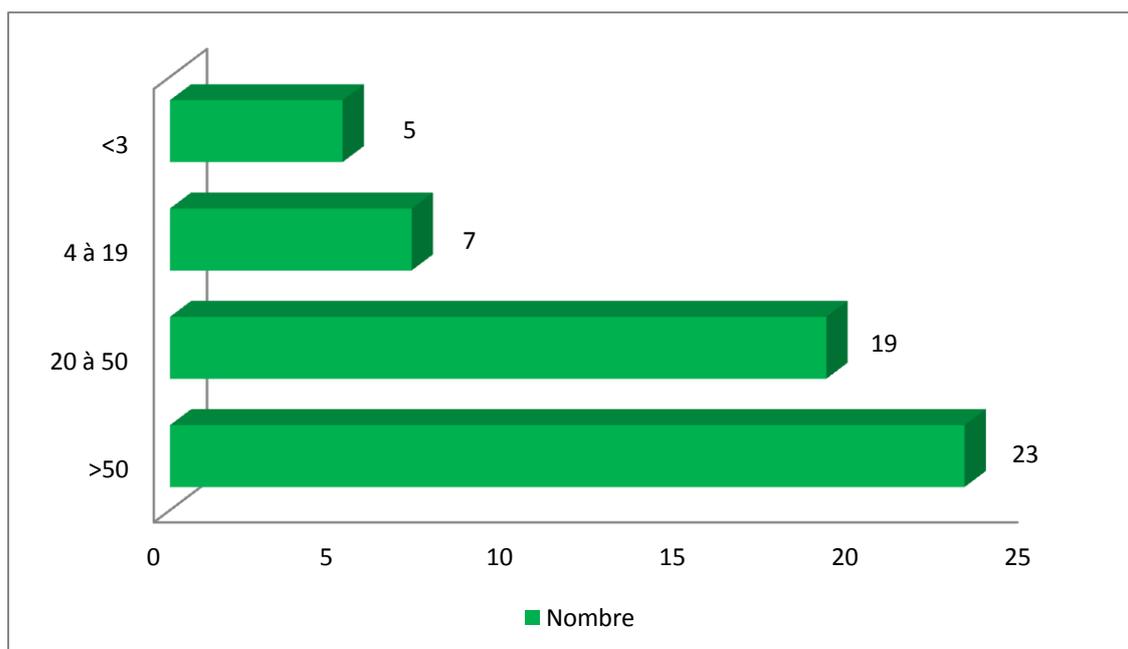


Figure 9: Répartition de *S. marcescens* selon l'âge.

2.5. Répartition des souches selon la nature de prélèvement

Parmi les 54 souches de *S. marcescens* isolées dans les différents produits pathologiques, 47 ont été diagnostiquées dans les urines (87%) et 7 dans les prélèvements de pus (13%) comme le montre la figure 10.

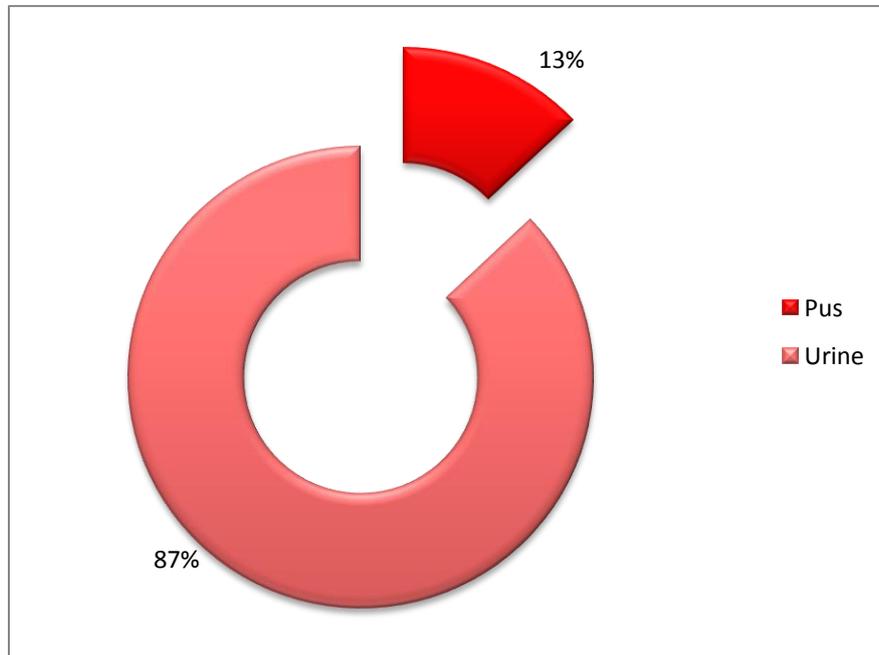


Figure 10: Distribution des souches de *S. marcescens* dans les différents produits pathologiques

2.6. Répartition des souches selon le service

Le service de chirurgie urologique de l'établissement hospitalier spécialisé-d'urologie néphrologie et de transplantation rénale Daksi de Constantine semble être le plus incriminé car 67% des souches proviennent de ce service, elles ont été isolées chez des patients hospitalisés, notons qu'au même établissement un taux de 15% des souches sont d'ambulatoire (Figure 11).

Un taux de 13% des souches ont été isolées de prélèvements des laboratoires privés d'Annaba et de 5% ont été enregistré au service de la néonatalogie de l'établissement hospitalier public de Skikda.

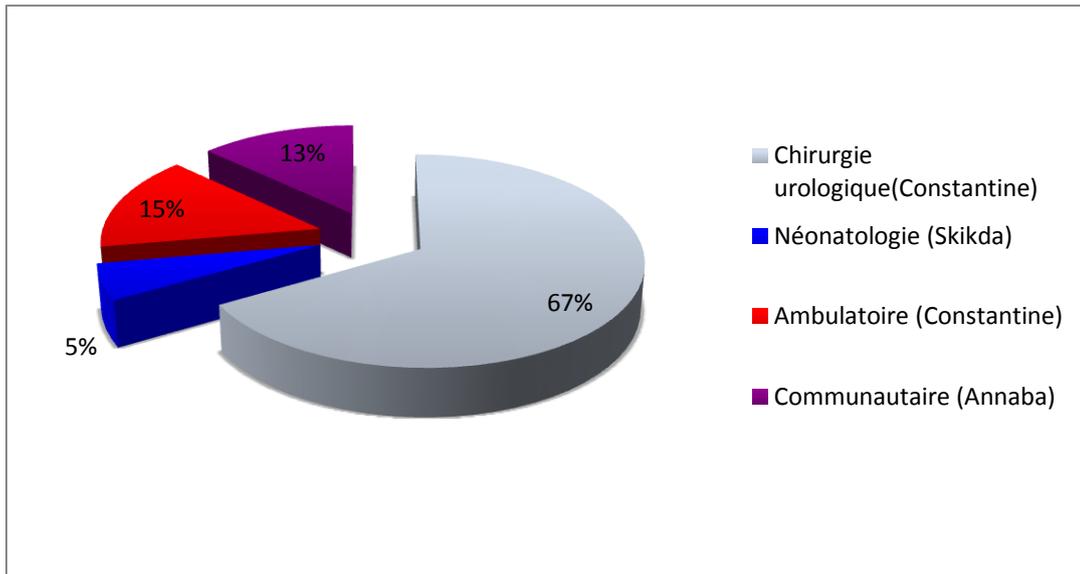


Figure 11: Distribution des souches de *S. marcescens* dans les différents services.

3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

3.1. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion sur gélose

L'antibiogramme des souches de *S. marcescens* (Figure 12 et figure 13), montre des niveaux de résistances très élevés aux 18 antibiotiques testés, particulièrement aux β -lactamines et aux aminosides.

Les β -lactamines:

Durant la période d'étude, le taux de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} et de 4^{ème} génération a connu une augmentation très remarquable.

- On note une résistance élevée vis-à-vis des β -lactamines: 67% vis-à-vis de la céfotaxime, 56% vis-à-vis de la céftazidime, 65% vis-à-vis de la céftriaxone et 63% vis-à-vis de l'aztréonam et 61% pour la céfépime.
- Aucune souche n'a été résistante ni à l'imipénème ni à la l'értapénème.

Les aminosides:

- Une résistance assez remarqué pour les aminosides: 43% vis-à-vis de l'amikacine, 61% vis-à-vis de la gentamicine, une résistance importante avec un taux de 80% vis-à-vis de la tobramycine.

Les quinolones :

- La résistance à l'acide nalidixique a été observée chez 52% des souches.
- Pour la résistance aux fluoroquinolones on observe une résistance de 43% vis-à-vis de la ciprofloxacine et 50% pour l'ofloxacine (Figure 12).

Autres:

- La résistance aux triméthoprime/sulfaméthoxazole était également importante avec un taux de 43%.

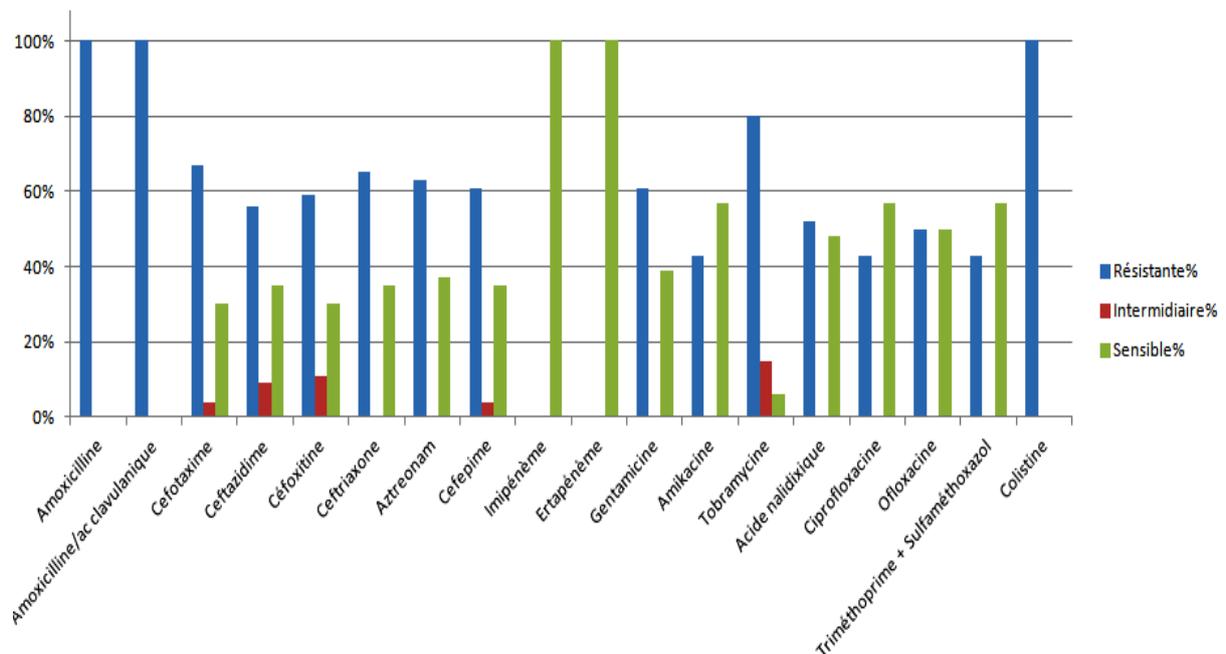


Figure 12: Sensibilité aux antibiotiques des 54 souches de *S. marcescens* aux antibiotiques testés.

Le tableau 11 montre le pourcentage de la résistance de *S. marcescens* en fonction de leur distribution.

Tableau N°11: Pourcentage de la résistance de *S. marcescens* en fonction de leur distribution.

	Pourcentage (%)			
	Constantine		Skikda	Annaba
Antibiotiques	n=36 Chirurgie urologique (Constantine)	n=8 Ambulatoire (Constantine)	n=3 Service de la néonatalogie (Skikda)	n=7 Laboratoires privés
Amoxicilline	100	100	100	100
Amoxicilline/acide clavulanique	100	100	100	100
Aztreonam	64	00	100	100
Céfotaxime	57	00	100	100
Céftazidime	45	00	100	71
Céfoxitine	50	75	100	100
Céfepime	61	00	100	57
Céftriaxone	55	00	100	100
Gentamicine	61	00	100	100
Tobramycine	57	25	100	100
Amikacine	47	00	67	57
Acide nalidixique	61	00	33	71
Ciprofloxacine	50	00	33	57
Ofloxacine	61	00	33	57
Trimethoprim/sulfamethoxazole	64	13	100	50
Colistine	100	100	100	100
Imipénème	0	0	0	0
Ertapénème	0	0	0	0

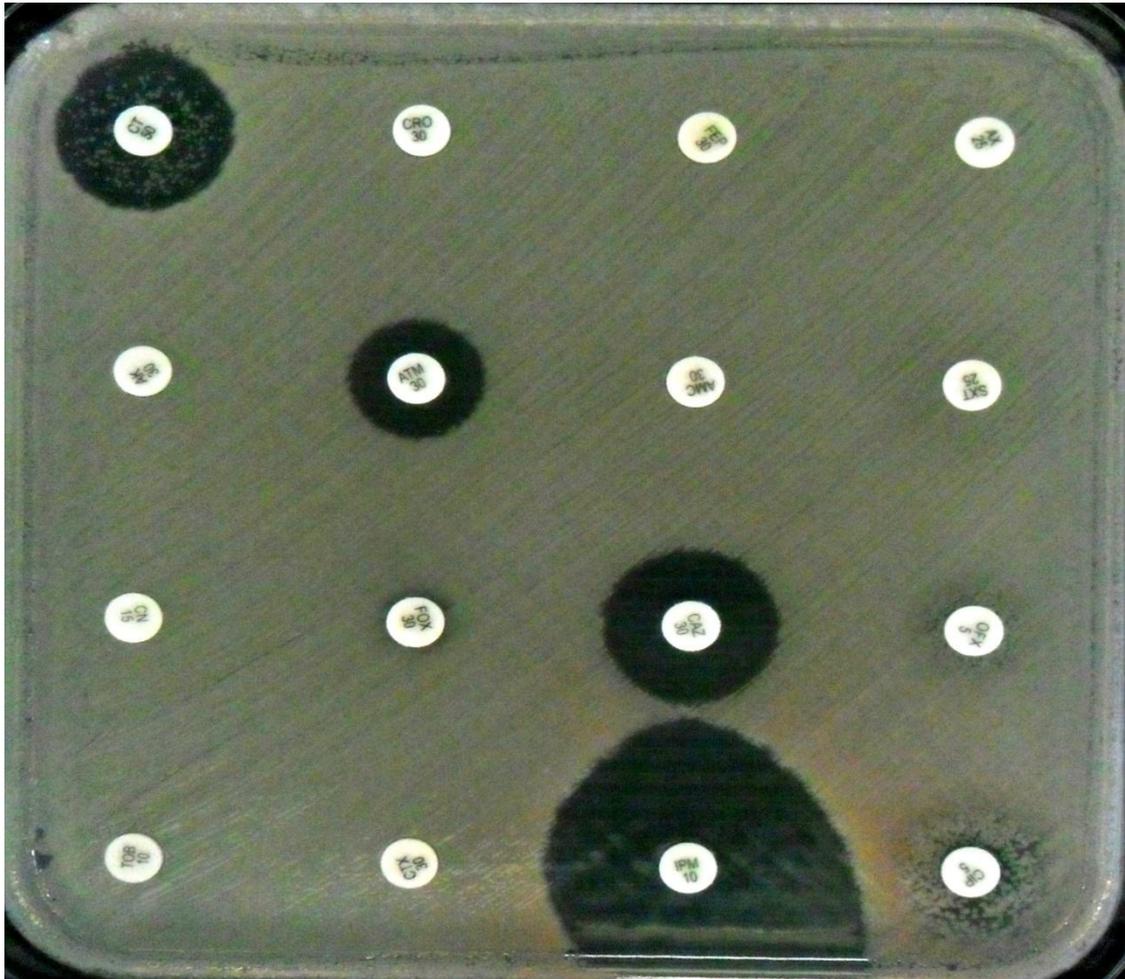
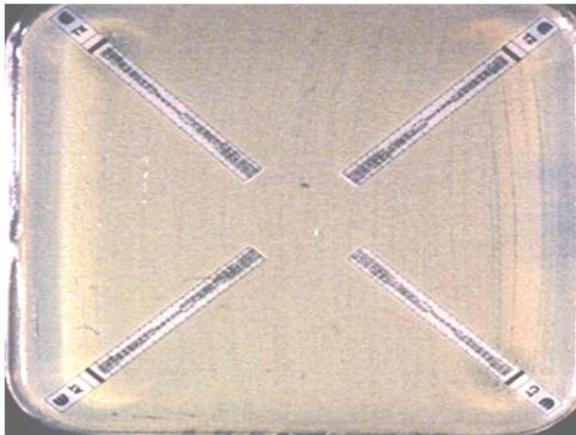


Figure 13: Antibiogramme d'une souche de *S. marcescens* multirésistante.

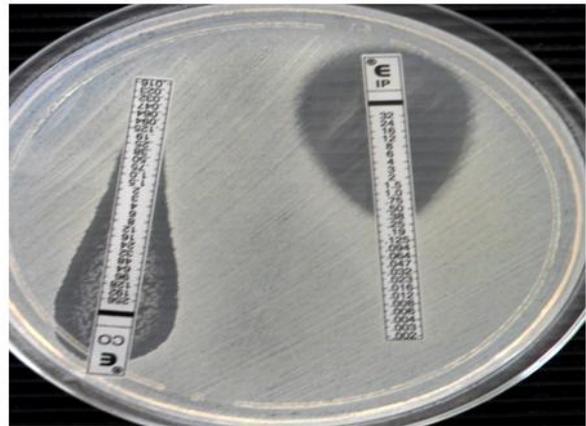
3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Quelques bandelettes d'E-test ont été utilisées pour 35 souches de *S. marcescens* à savoir; céfotaxime, céftazidime, amikacine, gentamicine, ciprofloxacine et l'imipénème

Les 35 souches productrices de BLSE ont montré toutes un niveau de résistance très élevé à tous les β -lactamines. Les CMI de la céfotaxime étaient rangées de 12 à $>256 \mu\text{g/ml}$, la céftazidime à partir de 4 à $32 \mu\text{g/ml}$. La résistance des souches aux aminosides et aux fluoroquinolones était également remarquable: Les CMI de la gentamicine étaient rangées de 32 à $> 256 \mu\text{g/ml}$, l'amikacine avec des CMI allant de 8 à $>256 \mu\text{g/ml}$ et à la ciprofloxacine avec des CMI ragées de 1 à $>256 \mu\text{g/ml}$. Toutes les souches étaient sensibles à l'imipénème (figure 14).



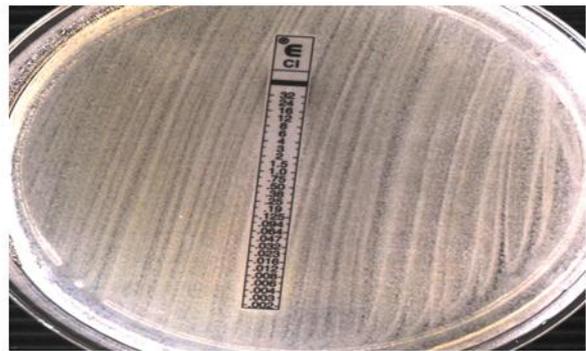
TZ:Céftazidime, TX:Céftriaxone, AT: Aztréonam, CT: Céfotaxime



Co: Colistine, IP: Impipénème



GM: Gentamicine, AK: Amikacine



Cl: Ciprofloxacine

Figure 14: Détermination des CMI des souches de *S. marcescens* par E.Test.

4. Phénotypes de résistance de *S. marcescens* aux antibiotiques

4.1. Recherche phénotypique des BLSE

- **Gélose BLSE (biométrieux)**

La recherche des bêta-lactamases à spectre étendu sur gélose ESBL a montré que 35 souches de *S. marcescens* ont présenté des colonies de couleur verte, ou rouge ce qui indique qu'elles sont productrices d'enzyme bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE+) (Figure 15). En revanche, aucune culture n'a été observée sur le milieu BLSE pour les 19 souches restantes (BLSE-).

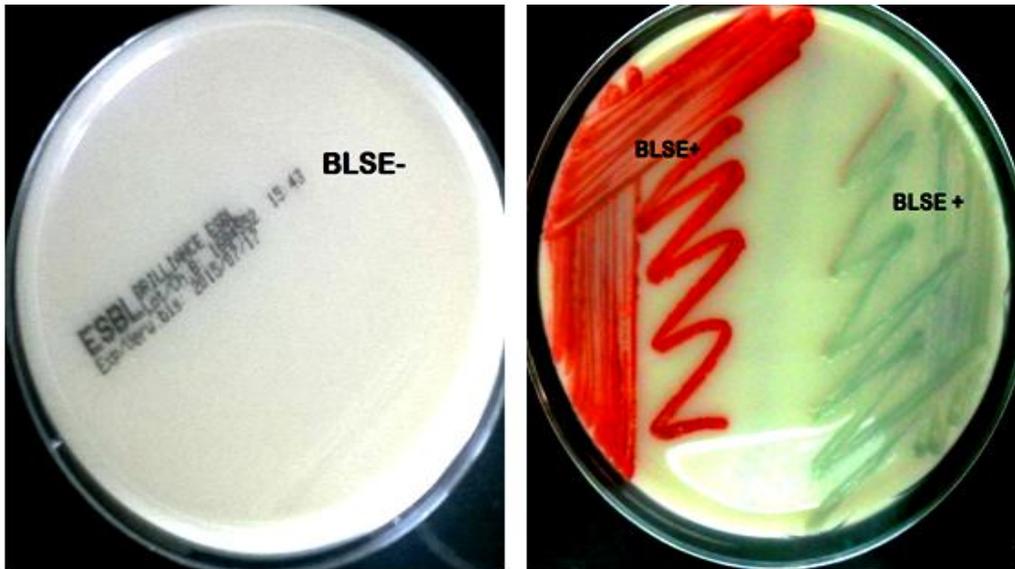


Figure 15: Détection de la production de β -lactamase à spectre étendu sur milieux ESBL Biomérieux.

- **Test de synergie**

Pour le test de synergie, la lecture des résultats a révélé la présence d'une zone d'élargissement autours des disques en «bouchon de champagne» ou en «entonnoir» entre les disques utilisés chez 22 (41%) souches de *S. marcescens* indiquant clairement la production de BLSE par ces souches (Figure 16). Cependant, l'absence des images de synergie chez les souches restantes peut être expliquée par la sensibilité du test.

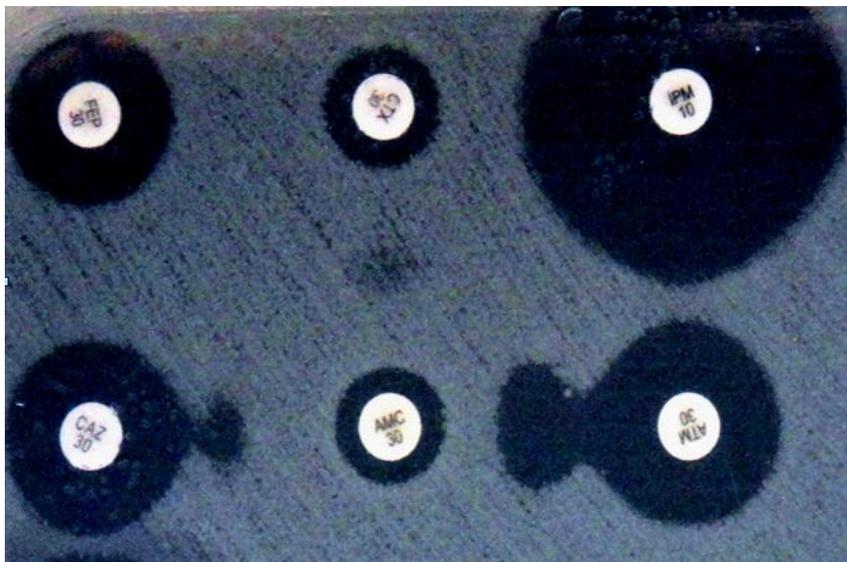


Figure 16: Images de synergie entre les C3G et l'AMC de la souche *S. marcescens* (bouchon de champagne).

Le comportement des souches de *S. marcescens* vis-à-vis des β -lactamines nous a permis de classer les souches en fonction de leur phénotype de résistance.

L'analyse phénotypique de *S. marcescens* est en faveur d'une production de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) soit (41%).

- Ce qui a été remarqué comme phénotype de résistance sur les boites d'antibiogramme des *S. marcescens* c'est la production de céphalosporinase chromosomique inductible, les inducteurs sont des β -lactamines (imipénème, céfoxitine) (Figure 17). L'induction peut être détectée *in vitro* en plaçant, sur la boîte d'antibiogramme, un disque de C3G à côté d'un disque d'imipénème ou de céfoxitine: on obtient une image d'antagonisme avec diminution de la zone d'inhibition autour du disque de C3G en regard du disque d'imipénème ou du la céfoxitine. Une production phénotypique de cette céphalosporinase inductible a été remarquée chez (26%) des souches (Tableau 12).

Tableau 12: Phénotype de résistance des souches de *S. marcescens* aux β -lactamines.

Phénotype de résistance	Nombre d'isolats
β -lactamases à spectre étendu BLSE (Bouchon de champagne)	22
ampC inductible (effet antagonisme entre IMP et CTX)	14

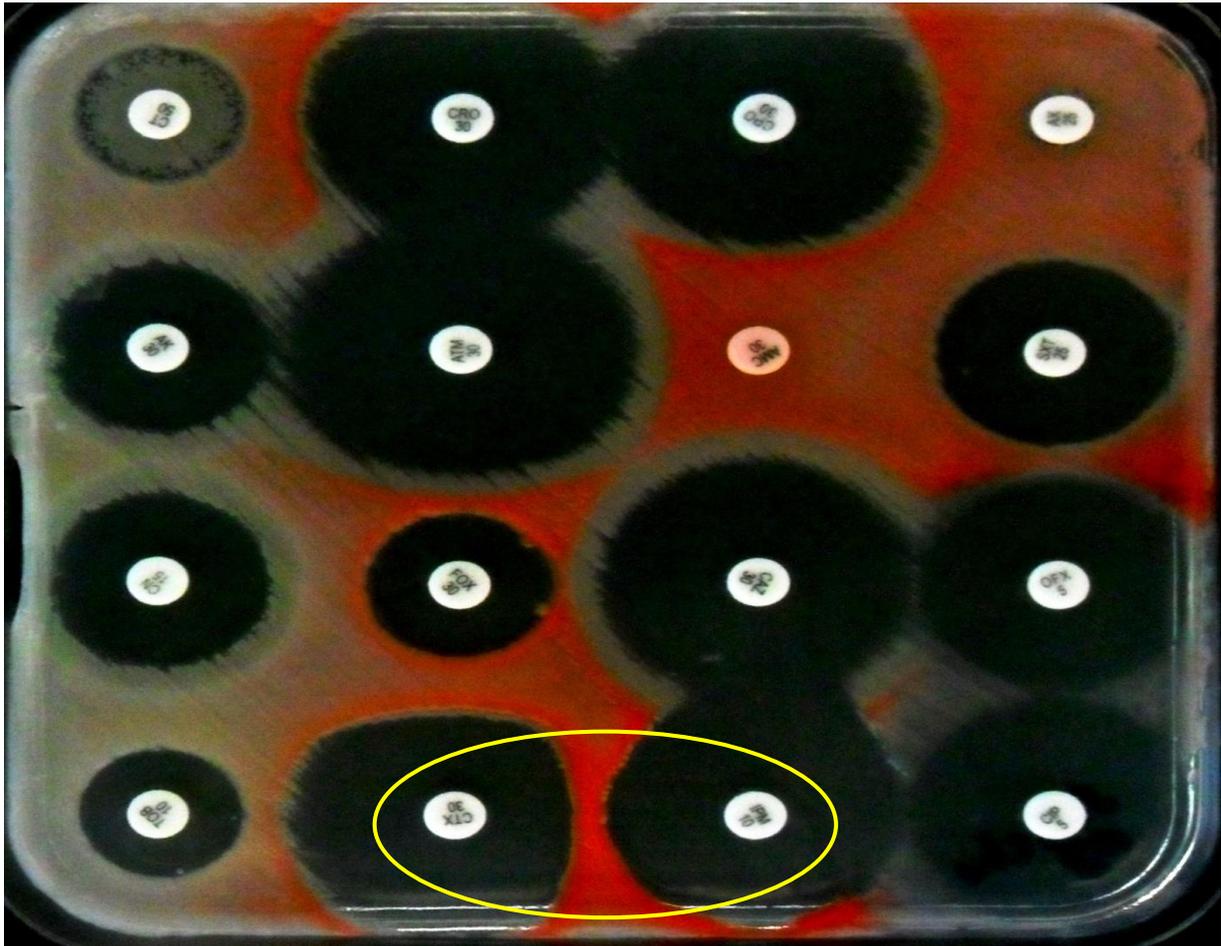


Figure 17: Souche de *S. marcescens* pigmentée productrice d'ampC inducible (Effet antagonisme CTX et IMP).

4.2. Phénotypes de résistance aux aminosides

Les souches de *S. marcescens* présentent un profil particulier aux aminosides avec une résistance assez remarquée.

Les phénotypes de résistance vis-à-vis des aminosides sont illustrés dans le tableau 13.

On remarque que les souches représentent un phénotype de résistance avec un pourcentage de 43% vis-à-vis les trois antibiotiques testés.

Tableau 13: Phénotype de résistance aux aminosides.

Phénotype de résistance	Pourcentage
TOB	34%
CN/TOB	17%
CN/TOB/AK	43%

4.3. Phénotypes de résistance aux quinolones

Les souches de *S. marcescens* présentent un phénotype de résistance remarquée, un taux de 41% s'avèrent résistants aux trois antibiotiques testés à la fois; la ciprofloxacine, l'ofloxacine et l'acide nalidixique (Annexe 1 et tableau 16).

4.4. Phénotype de la co-résistance aux antibiotiques des *S. marcescens*

La résistance des souches aux céphalosporines de 3^{ème} génération par production de BLSE est associée à une résistance remarquée aux quinolones et aux aminosides chez 28 souches soit (52%) ce qui montre la multirésistance de ces souches à ces trois familles d'antibiotiques (Figure 18).

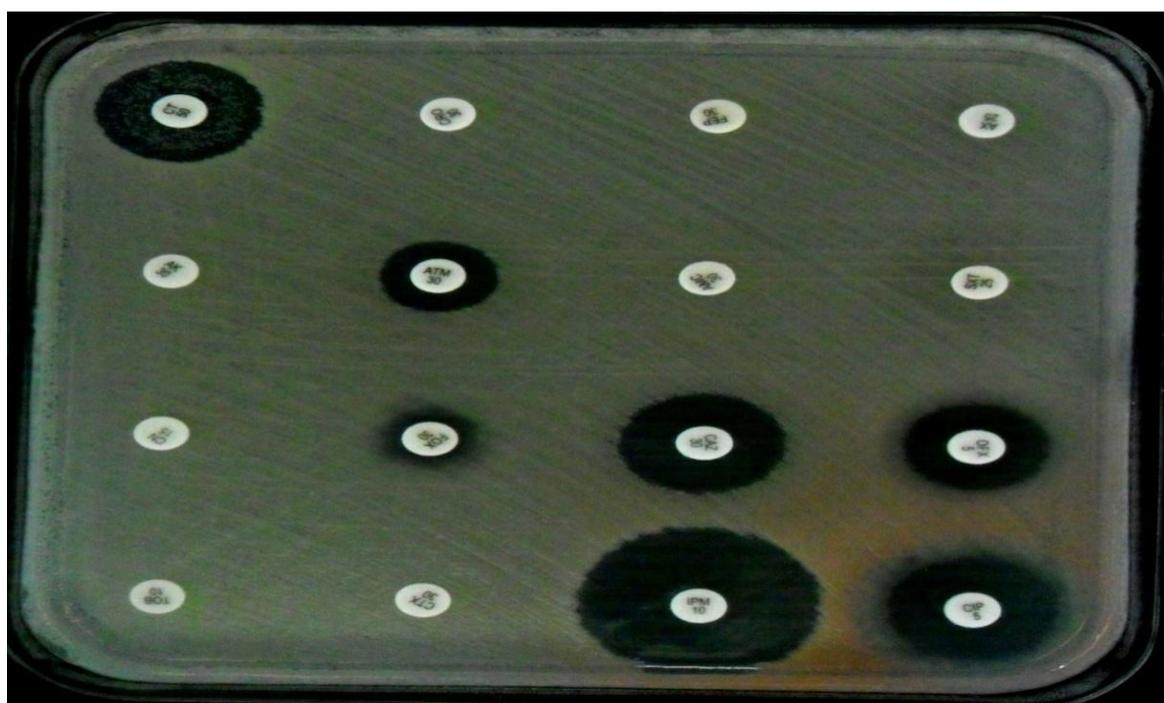
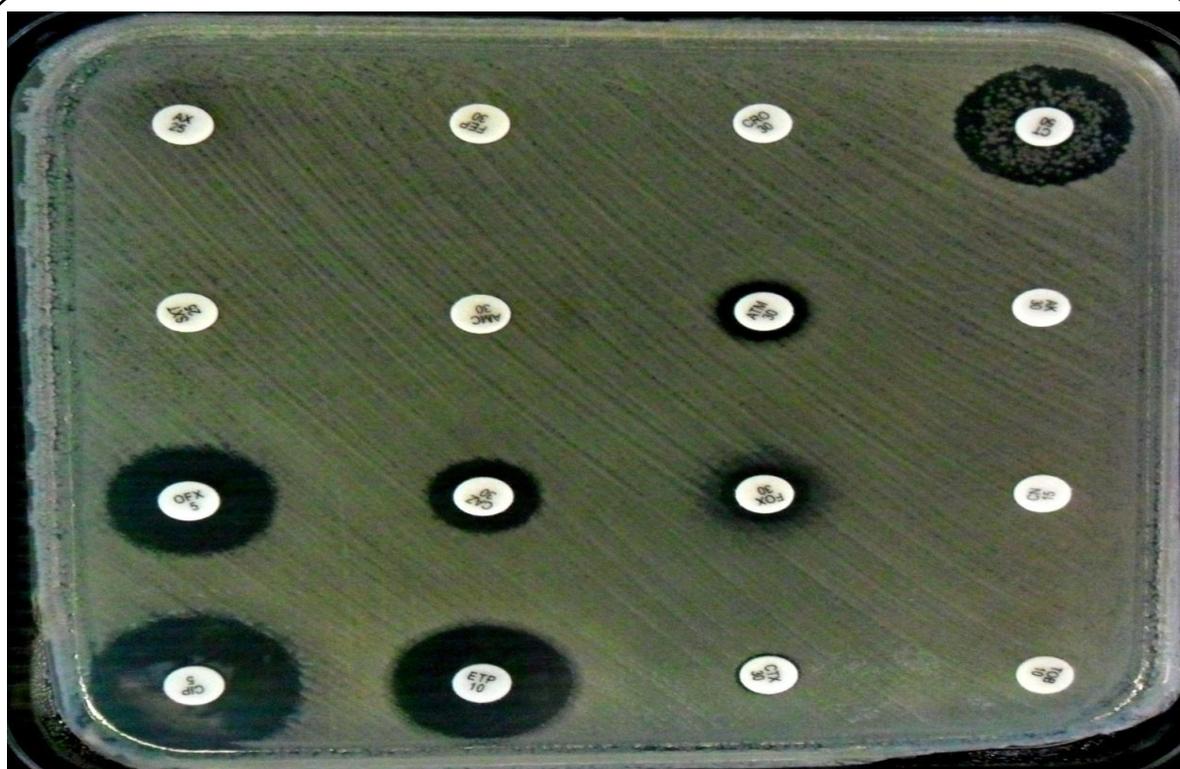


Figure 18: Souches de *S. marcescens* N°2186 et N° 21 résistantes aux C3G, aminosides et fluoroquinolones.

5. Recherche moléculaire de la résistance aux β -lactamines des souches de *S. marcescens*

5.1. Profil moléculaire des gènes codant pour les β -lactamases, séquençage et analyse des séquences des gènes

Après la révélation des bandes d'ADN sur gel d'agarose par électrophorèse sous UV, la purification, le séquençage des produits de PCR positifs, la correction des séquences par le logiciel Sequencher 4.1.4 aligner et la comparaison des séquences obtenues à la base de donnée NCBI ou ARG-ANNOT software, les résultats ont montré que 35 souches sont productrices des gènes de résistance qui codent pour la résistance aux β -lactamines et qu'une souches au moins possèdent un gènes ou plus codant pour les β -lactamases comme suit:

- 32 (59%) des souches possèdent le gène *bla*_{CTX-M-15}.
- 26 (48%) des souches possèdent le gène *bla*_{TEM-1}.
- 1 (2%) des souches possèdent le gène *bla*_{TEM-71}.
- 1 (2%) des souches possèdent le gène *bla*_{SHV-2a}.
- 12 (22%) des souches possèdent le gène *bla*_{PER-2}.

D'après ces résultats, nous notons qu'aucune souche ne possède les gènes: *bla*_{VEB} et *bla*_{GES}.

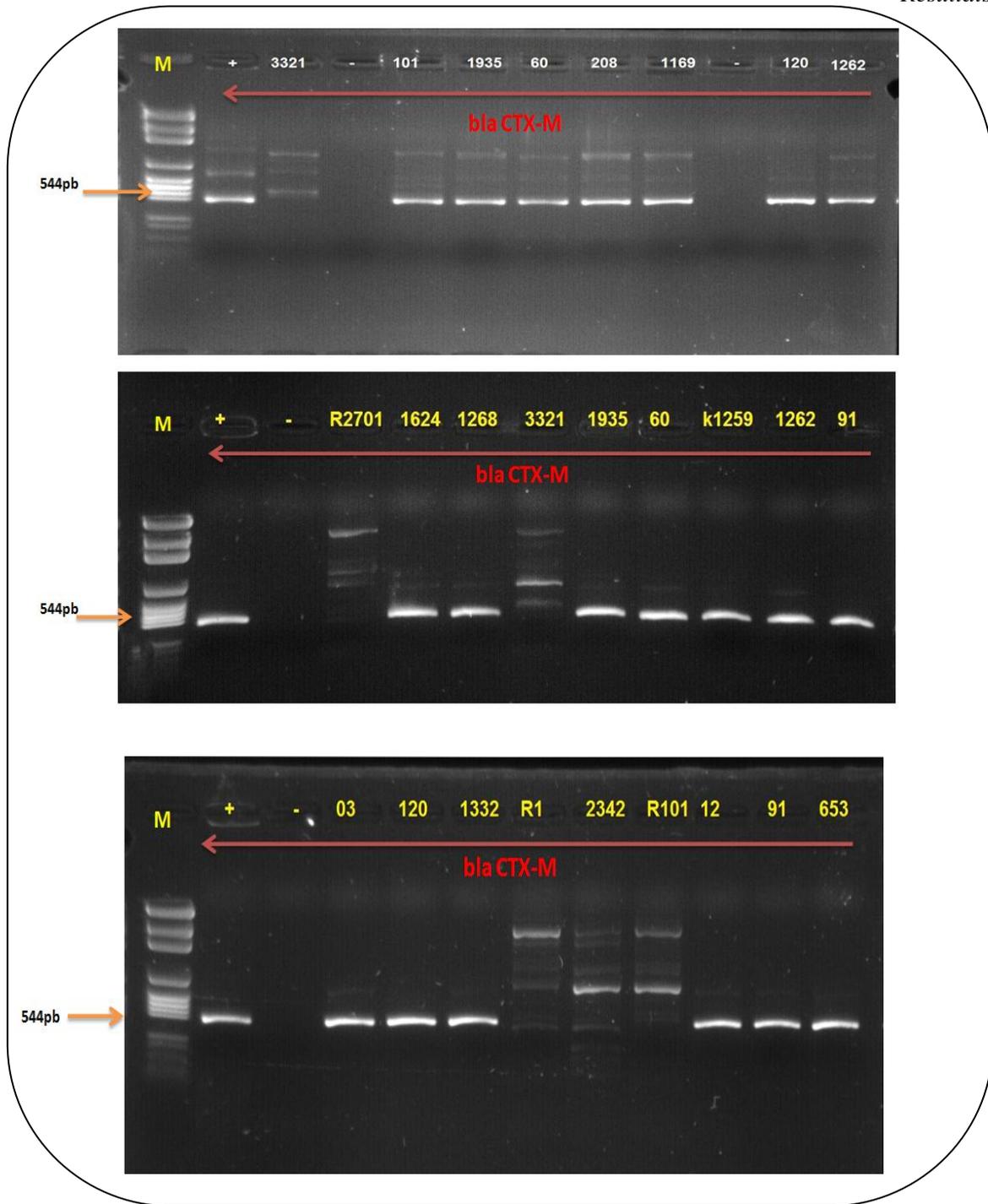


Figure 19: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *bla*_{CTX-M}.

M: marqueur de tailles de l'ADN, **+**: témoin positif, **-**: témoin négatif, **pb**: paire de bases

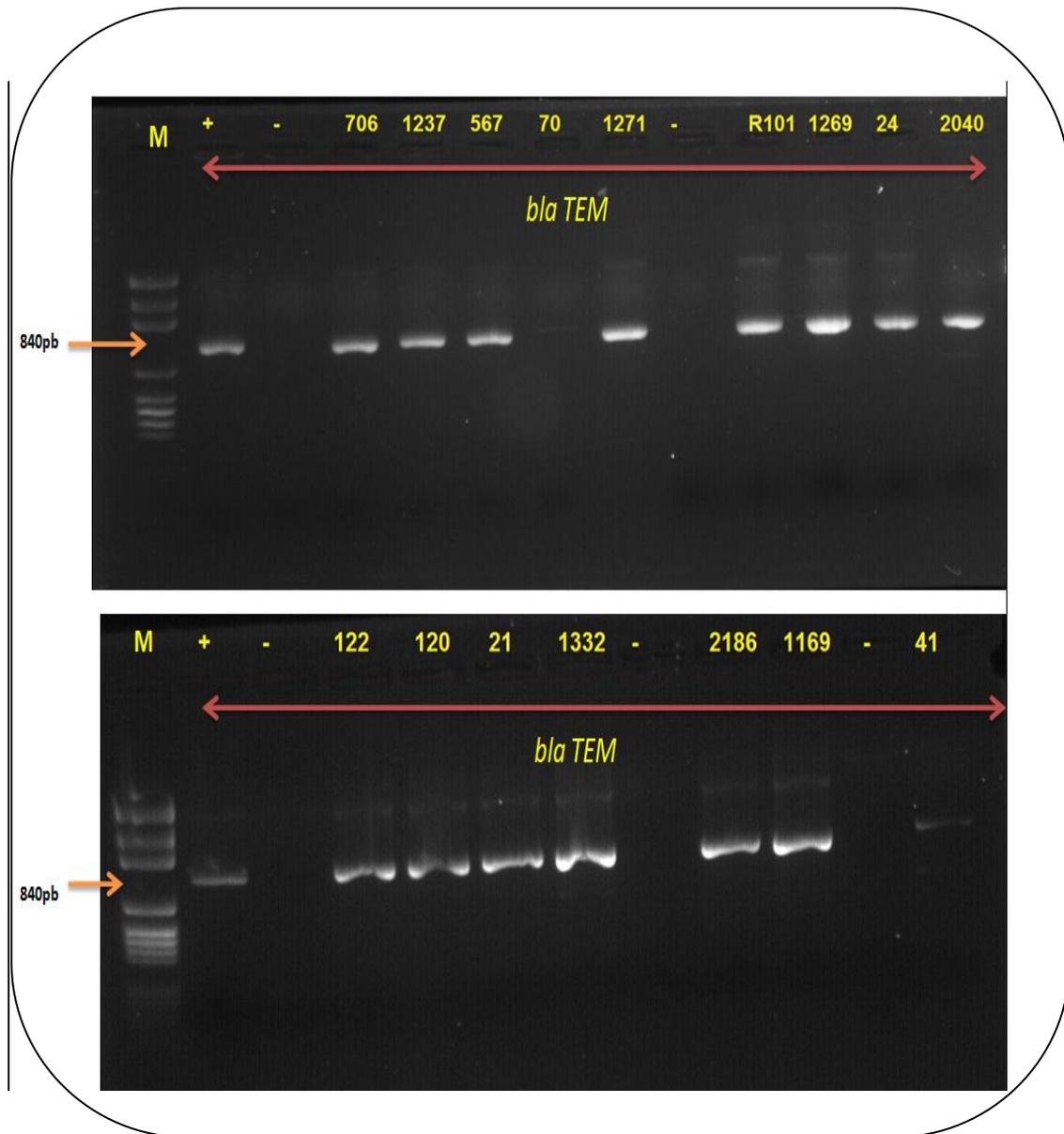


Figure 20: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *bla_{TEM}*.

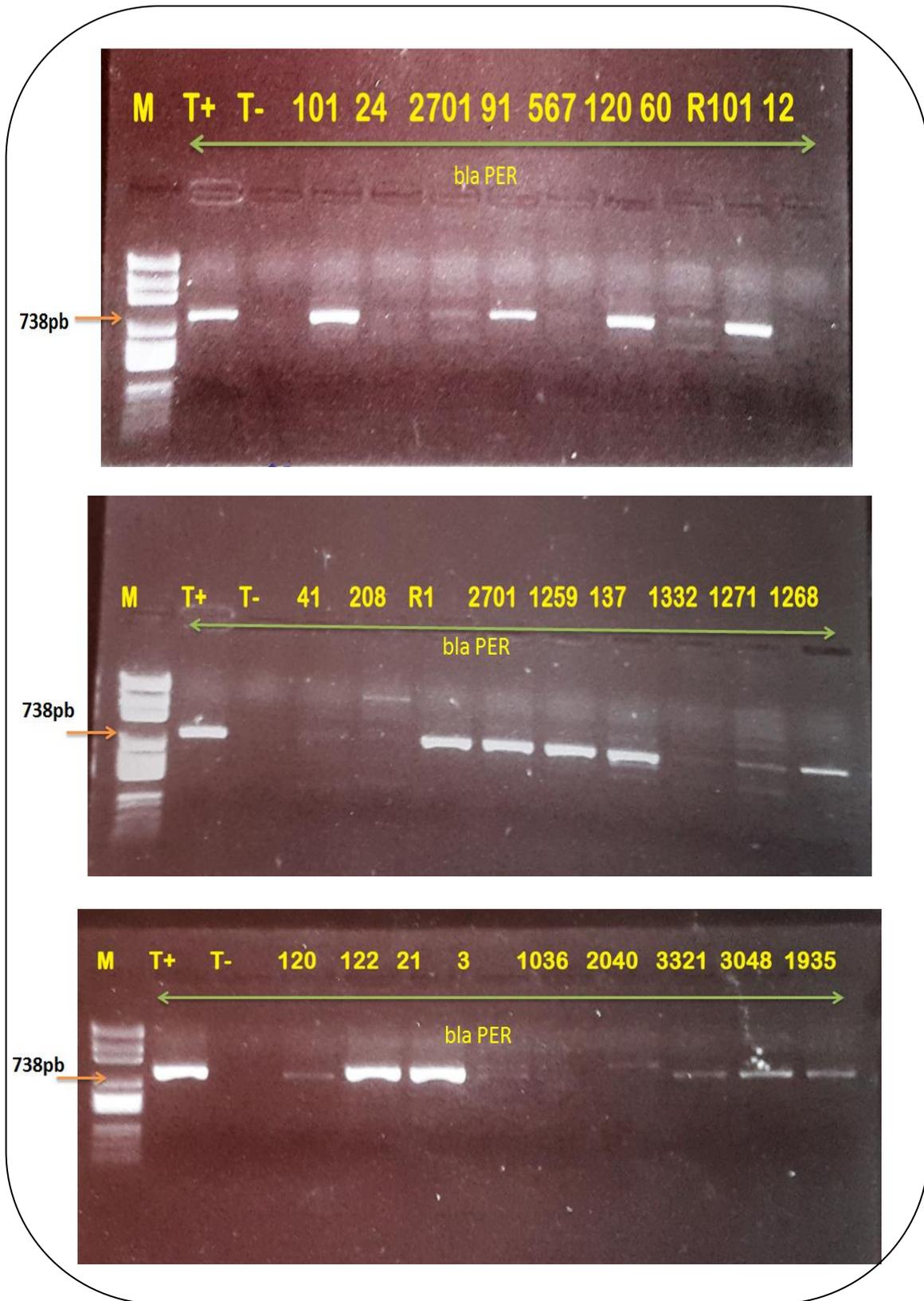


Figure 21: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *bla_{PER}*.

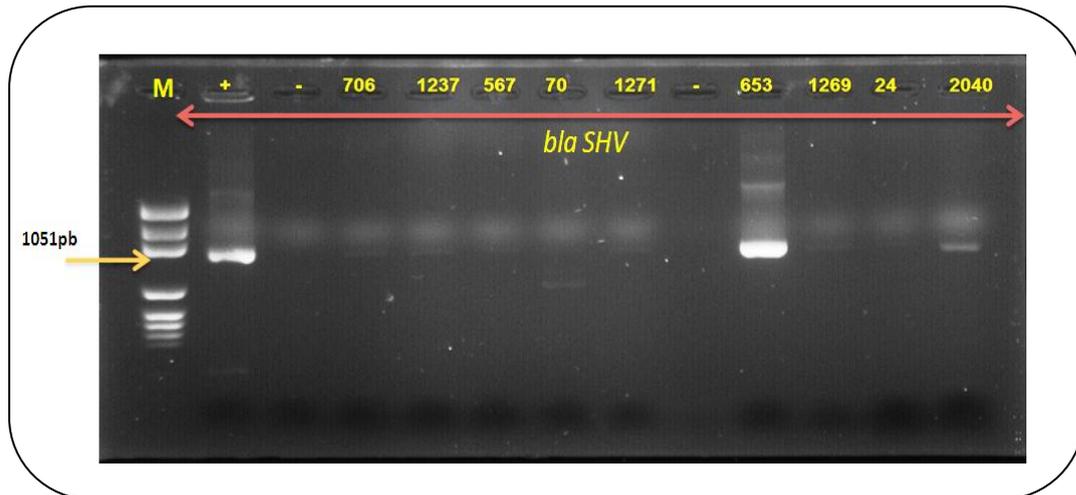


Figure 22: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *bla_{SHV}*.

Tableau 14: Profil moléculaire des 35 souches de *S. marcescens* productrices de BLSE.

Code	Le profil de résistance aux β -lactamines	Les gènes BLSE détectés
C1	ATM.CTX.CAZ.CRO. FOX. FEP	CTX-M-15,TEM-1
C2	ATM.CTX.CAZ.CRO. FOX. FEP	CTX-M-15,TEM-1,PER-2
C3	ATM.CTX.CAZ.CRO. FEP	CTX-M-15,TEM-1,PER-2
C4	ATM.CTX.CRO. FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1
C5	ATM.CTX.CRO. FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1
C6	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1
C7	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP	TEM-71,PER-2
C8	CTX.CAZ.CRO. FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1,
C9	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1
C10	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1
C11	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1
C12	CTX, FOX.FEP	CTX-M-15
C13	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15
C14	CTX.CRO.FOX	TEM-1,PER-2,SHVa2
C15	CTX. FOX	CTX-M-15,PER-2
C16	ATM.CTX.CAZ.CRO. FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1
C17	ATM.CRO. FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1
C18	ATM.CTX.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1
C19	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX	TEM-1,PER-2
C20	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1,
C21	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1
C22	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1
C23	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP	CTX-M-15,TEM-1,PER-2
C24	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15,TEM-1
C25	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15,TEM-1

S1	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15, TEM-1, PER-2
S2	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15, TEM-1, PER-2
S3	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15
A1	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15, PER-2
A2	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15, TEM-1, PER-2
A3	ATM.CTX.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15, TEM-1
A4	ATM.CTX.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15, PER-2
A5	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15
A6	ATM.CTX.CAZ.CRO, FOX.FEP	CTX-M-15
A7	ATM.CTX.CAZ.CRO, FOX.FEP	CTX-M-15, TEM-1

6. Recherche moléculaire de la résistance aux aminosides

6.1. Enzymes modificatrices des aminosides

La PCR standard et le séquençage des gènes qui codent pour les enzymes modificatrices des aminosides ont montré que six souches (11%) qui hébergent au moins un gène de BLSE portent le gène *aac(6)-Ib-cr*, 20 (37%) des souches porteuses également des gènes de BLSE portent le gène *aadA* (18 *aadA2* et 2 *aadA1*) (Figure25). Dans notre étude une seule souche de *S. marcescens* héberge le gène *aph (3')-VIb* (2%). En revanche, aucune souche de *S. marcescens* ne possède les gènes *ant (2'')-I* ou *aac(3)-Ia*.

6.2. 16S ARNr méthyltransférases

La PCR et le séquençage ont montré que 19 (35%) des souches de *S. marcescens* possèdent le gène *armA* qui code pour le 16S ARNr méthyltransférase responsable de la résistance élevée à tous les aminosides (Figure25).

La production simultanée de deux gènes de résistance aux aminosides a été remarquée chez 18 (33%) souches de *S. marcescens*. Sept souches (13%) de *S. marcescens* ont donné une résistance importante aux aminosides mais elles n'ont donné aucun résultat positif à l'ensemble des gènes testés.

Aucune souche de *S. marcescens* n'a donné un résultat positif pour les variants des *rmt* testés.

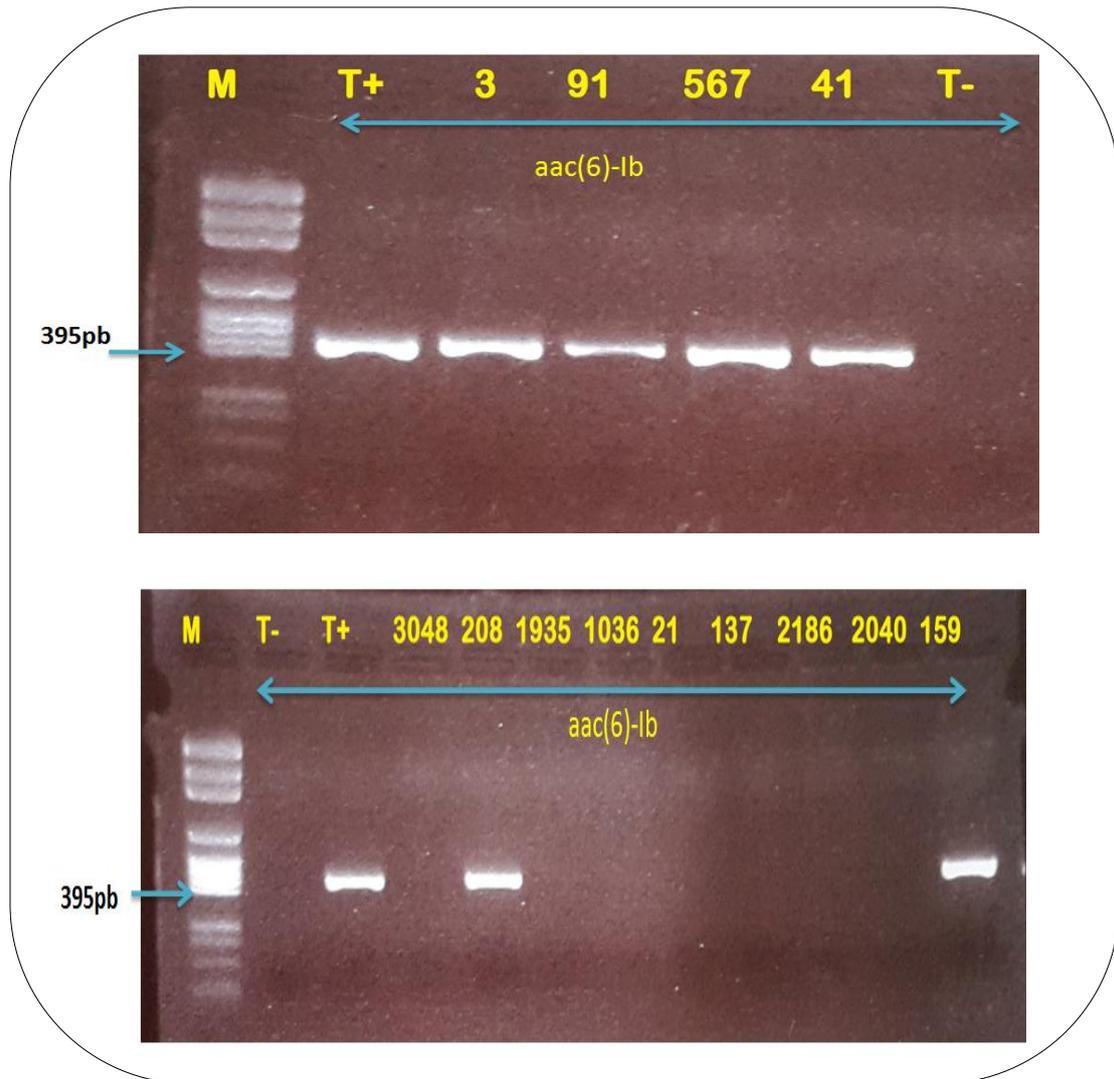


Figure 23: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *aac(6)-Ib*.

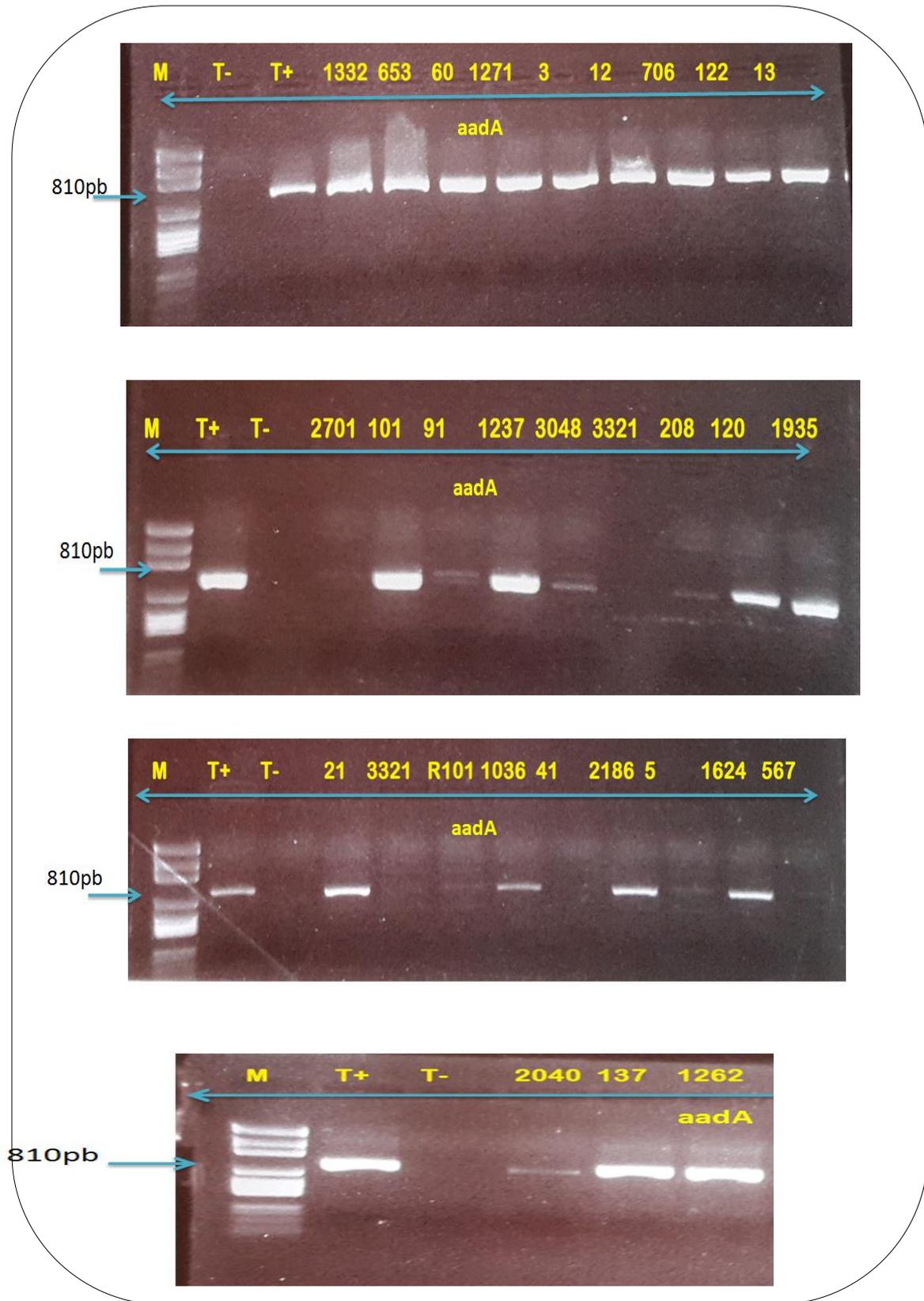


Figure 24: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *aadA*.

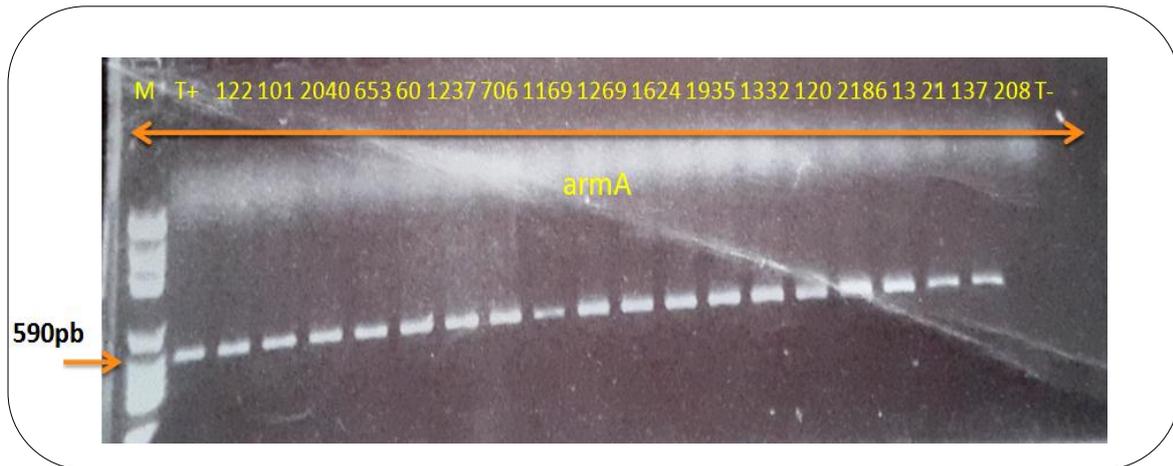


Figure 25 : Electrophorèse sur gel d’agarose 1% des produits d’amplification par PCR du gène armA.

Tableau 15: Profil moléculaire des 35 souches de *S. marcescens* productrices d enzymes modificateuses des aminosides et 16S ARNr méthyltransphérase.

Code	Profil de résistance aux aminoglycosides	Les gènes d’aminoglycosides détectés
C1	CN.TOB	aac6Ib-cr
C2	CN.TOB.AK	aadA2,armA
C3	CN.AK.TOB	aadA2,armA
C4	CN.AK .TOB	aadA2,armA
C5	CN.AK.TOB	aadA2,armA
C6	CN.AK.TOB	aadA2,armA
C7	CN.TOB	-
C8	CN.AK.TOB	aadA2,armA
C9	CN.TOB	-
C10	CN.TOB.AK	aadA2,armA
C11	CN.TOB.AK	armA
C12	TOB	aadA2
C13	TOB	-
C14	CN.TOB.AK	-
C15	CN.TOB	aadA1
C16	CN.TOB	-
C17	CN.TOB.AK	armA
C18	TOB	aadA2
C19	CN.AK.TOB	aph(3’)VIb
C20	CN.AK.TOB	aadA2,armA
C21	CN.AK.TOB	aadA2,armA

C22	CN.AK.TOB	aadA2,armA
C23	CN.AK.TOB	aadA2,armA
C24	CN.AK.TOB	aadA2,armA
C25	CN.AK.TOB	aadA2,armA
S1	CN.AK.TOB	aadA2,armA
S2	CN.AK.TOB	aadA2,armA
S3	CN.TOB	aac6Ib-cr
A1	CN.TOB	aac6Ib-cr
A2	CN.TOB	aac6Ib-cr, aadA1
A3	CN.AK.TOB	-
A4	CN.AK.TOB	-
A5	CN.TOB	aac6Ib-cr
A6	CN.AK.TOB	aadA2,ArmA
A7	CN.AK.TOB	aac6Ib-cr,ArmA

7. Recherche moléculaire de la résistance aux quinolones

L'amplification par PCR standard et le séquençage ont montré que 3 (6%) des souches de *S. marcescens* isolées dans cette études possèdent le gène qnrB42 qui code pour la résistance aux fluoroquinolones. Le gène qnrB42 a toujours coexisté avec le gène *aac(6')-Ib-cr*, ce dernier code pour la résistance simultanée aux aminosides et à la ciprofloxacine, et dans cette étude on trouve que 3 souches (6%) hébergent ces deux gènes à la fois. L'amplification par PCR et le séquençage ont montré également que deux souches de *S. marcescens* possèdent les gènes qnrA6 et qnrB6.

8. Recherche moléculaire de la co-résistance aux antibiotiques

La résistance des souches aux céphalosporines de 3^{ème} génération par production de BLSE est associée à une résistance importante aux quinolones et aux aminosides. En effet, la PCR standard et le séquençage des gènes qui codent pour les enzymes modificatrices des aminosides montrent que de 16 (30%) souches de *S. marcescens* BLSE+ portent simultanément les gènes aadA (18 aadA2 et 2 aadA1) et armA. Il est également à noter que sur l'ensemble des 54 souches un total de 30 (56%) souches portent au minimum un gène de résistance aux β -lactamines et aux aminosides et (9%) de souches possèdent au minimum un gène de résistance à chaque famille d'antibiotique soit (14%) sur l'ensemble des souches qui ont présenté un phénotype de multirésistance important (annexe 1).

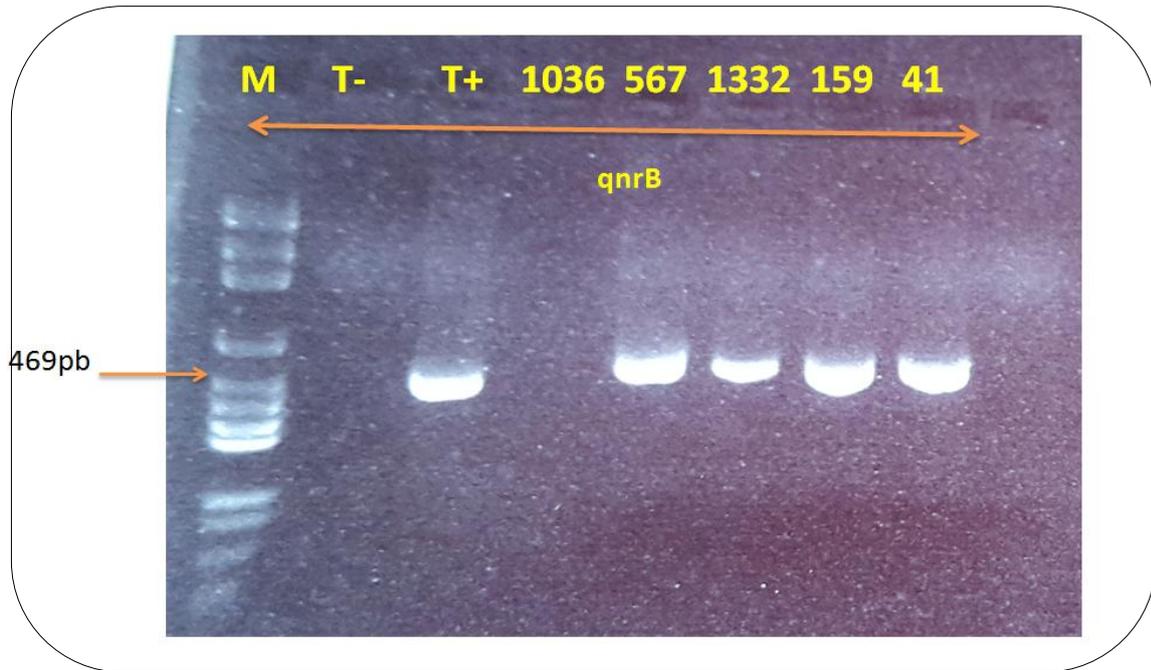


Figure 26: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène qnrB.

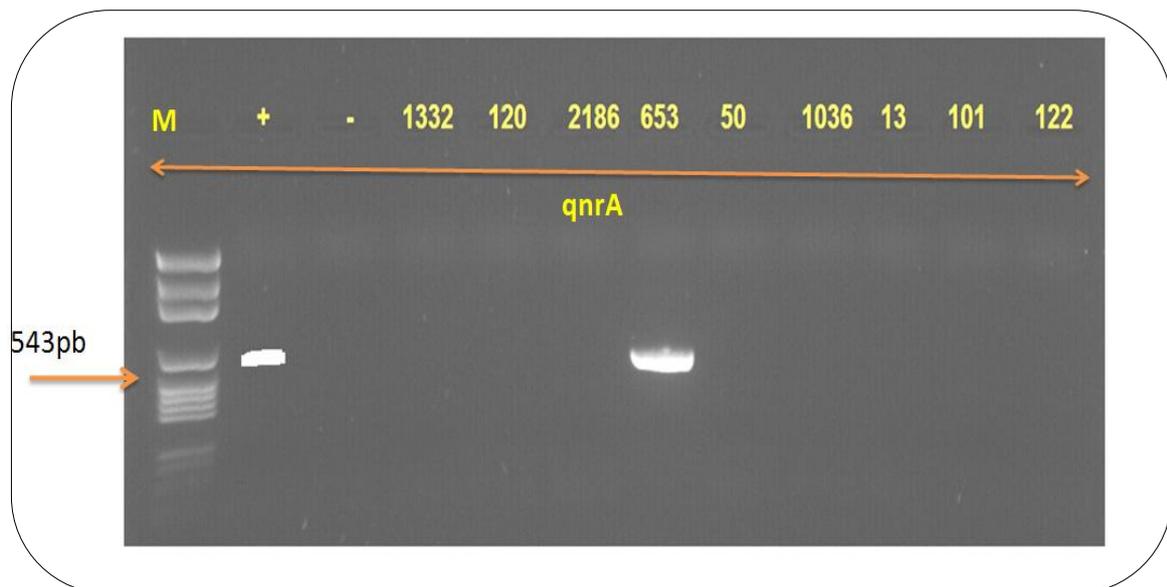


Figure 27: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène qnrA.

Tableau 16: Profil moléculaire de *S. marcescens* résistantes aux fluoroquinolones.

Code	Profil de résistance aux fluoroquinolones	Les gènes de résistances aux fluoroquinolones détectés
C1	CIP.OFX.AN	qnrB42
C2	-	-
C3	-	-
C4	CIP.OFX AN	-
C5	CIP.OFX AN	-
C6	OFX .AN	-
C7	OFX .AN	-
C8	CIP.OFX AN	-
C9	CIP.OFX.AN	-
C10	CIP.OFX AN	-
C11	CIP.OFX AN	-
C12	OFX.AN	-
C13	CIP.OFX.AN	-
C14	OFX AN	-
C15	CIP.OFX.AN	-
C16	CIP.OFX .AN	-
C17	CIP.OFX AN	-
C18	CIP.OFX.AN	-
C19	CIP.OFX AN	qnrA6
C20	CIP.OFX AN	-
C21	CIP.OFX AN	-
C22	CIP.OFX AN	qnrB6
C23	-	-
C24	CIP.OFX AN	-
C25	CIP.OFX AN	-
S1	-	-
S2	-	-
S3	CIP.OFX.AN	qnrB42
A1	CIP.AN	-
A2	-	-
A3	-	-
A4	CIP.OFX AN	-
A5	CIP.OFX.AN	qnrB42
A6	OFX AN	-
A7	CIP.OFX AN	-

❖ Clustering des phénotypes et des génotypes de la résistance de *S. marcescens*

Les résultats d'antibiogramme et les gènes de la résistance des souches ont été introduits dans le logiciel MultiExperiment Viewer (MeV) (Figure 28), afin d'effectuer la classification hiérarchique, les données d'antibiogramme (Résistant et Sensible) sont transformées en valeurs (1 et -1), et les données des gènes (Présent et Absent) en valeurs (1 et -1) respectivement où la couleur marron indique les souches résistantes aux antibiotiques et porteuses les gènes de la résistance.

La classification hiérarchique par le logiciel MeV selon la répartition en couleur appliquée aux résultats d'antibiogramme et les gènes de résistance des souches (Figure 28) a permis de générer des clusters qui étaient **significativement corrélés** avec la classification phénotypique et génotypique.

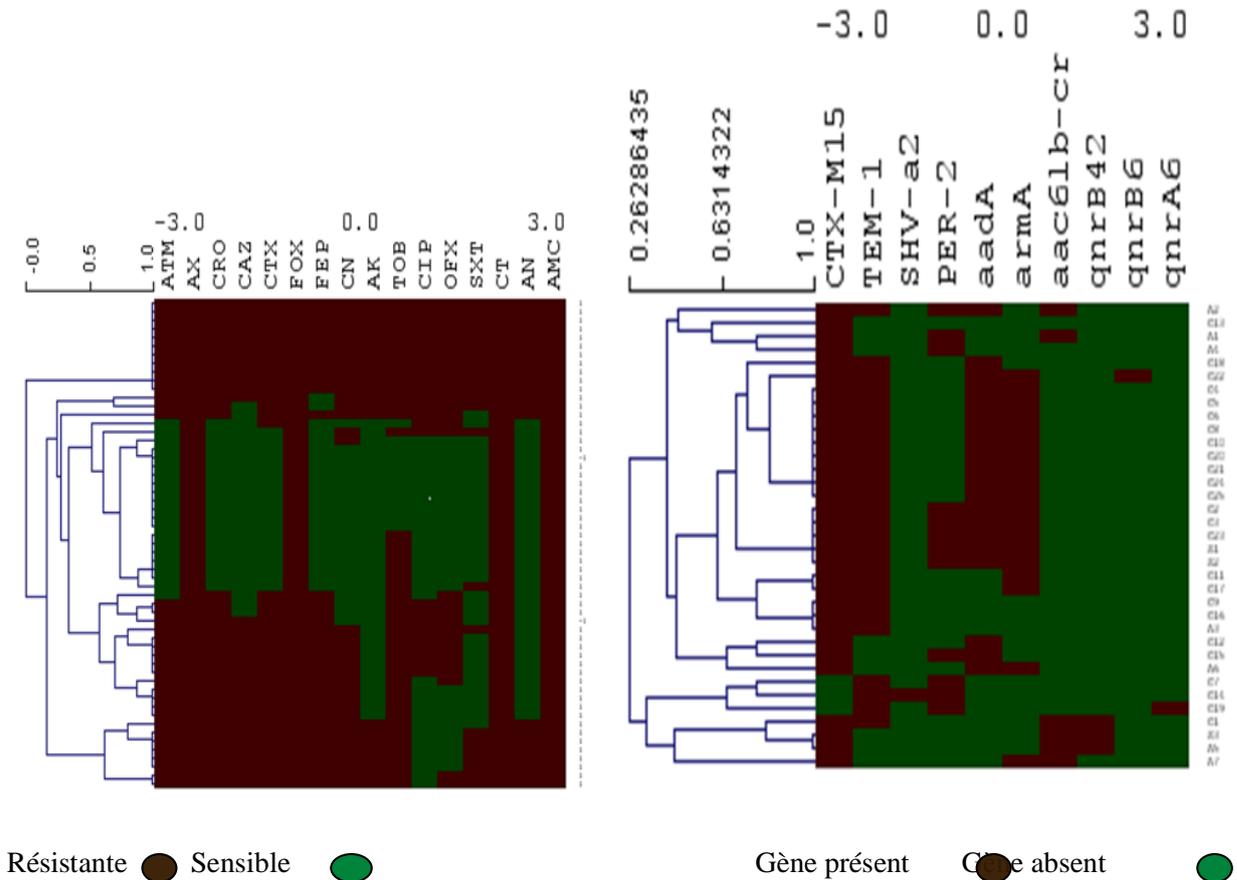


Figure 28: Clustering des phénotypes et des génotypes de la résistance de *S. marcescens* par le MultiExperiment Viewer (MeV).

9. Conjugaison bactérienne des souches de *S. marcescens*

A fin de déterminer le support génétique de la résistance aux antibiotiques, et la possibilité du transfert des plasmides au service de chirurgie urologique de Constantine, des expériences de conjugaison ont été réalisées, cinq souches de *Serratia marcescens* (pigmentées et non pigmentées) résistantes aux céftriaxone (CMI > 256µg/ml) ont été utilisées comme donatrices.

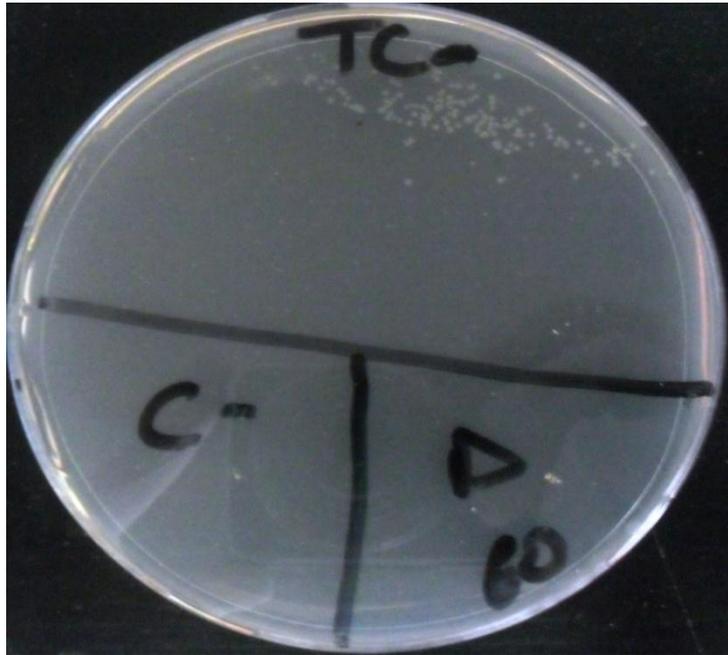
Escherichia coli J 53 résistante à l'azide comme souche réceptrice.

Les transconjugants ont été sélectionnés sur le milieu Luria Bertani (LB) agar contenant 100µg/ml d'azide et 20µg/ml de céftriaxone (Figure 29).

L'identification des transconjugants par le MALDI-TOF MS montre qu'il s'agit des souches d'*Escherichia coli* (Figure 30).

L'analyse des profils d'antibiorésistance des transconjugants par la méthode de diffusion en milieu solide a montré le transfert de la résistance aux β-lactamines et aux aminosides (Figure 31).

Les résultats de la PCR standard montrent que les transconjugants contiennent les mêmes gènes de résistance aux β-lactamine et aux aminosides (bla_{CTX} , bla_{TEM} , $armA$ et $aadA$) (Figure 32).

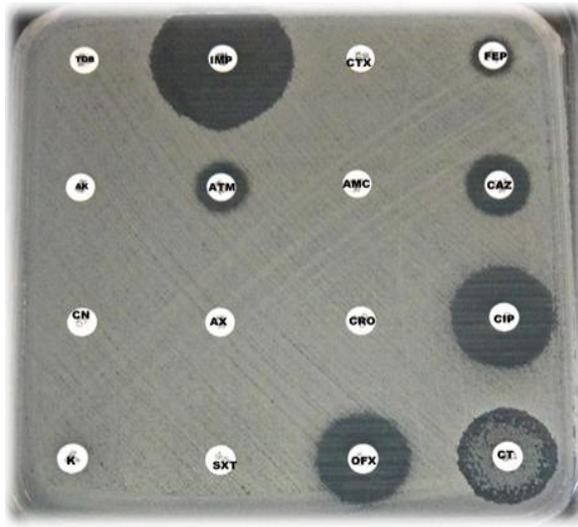


TC :Transconjugant, D : donnatrice, C- : réceptrice

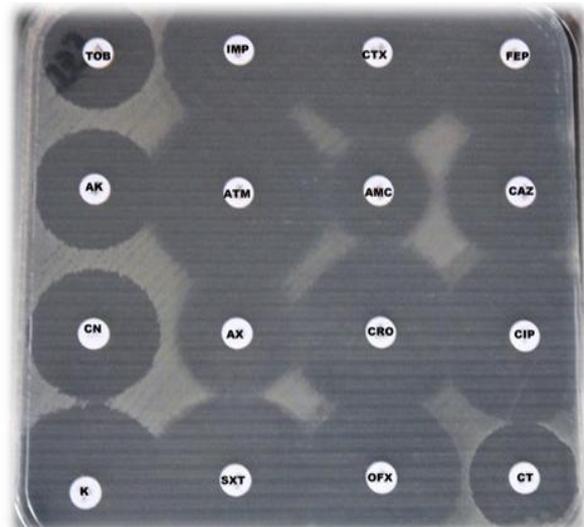
Figure 29: Exemple de résultat positif de la souche n°60 de transconjugant sur le milieu sélectif de Lauria Bertani additionné de 20µg/ml céftriaxone et 100 µg/ml azide sans agitation après incubation de 48h.

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
A1 (++)(A)	A1	<i>Escherichia coli</i>	2.184	Escherichia coli	1.967
A2 (++)(A)	A2	<i>Escherichia coli</i>	2.18	Escherichia coli	2.147
A3 (+++)(A)	A3	<i>Escherichia coli</i>	2.271	Escherichia coli	2.119
A4 (++)(A)	A4	Escherichia coli	2.201	Escherichia coli	2.102

Figure 30: Transconjugants d'*E. coli* confirmés par le MALDI-TOF MS.



Donatrice: *Serratia marcescens*



Réceptrice : *E.coli J53 Azide R*



Transconjugant

Figure 31: Antibiogrammes du transfert des déterminants de la résistance par le plasmide transconjugant.

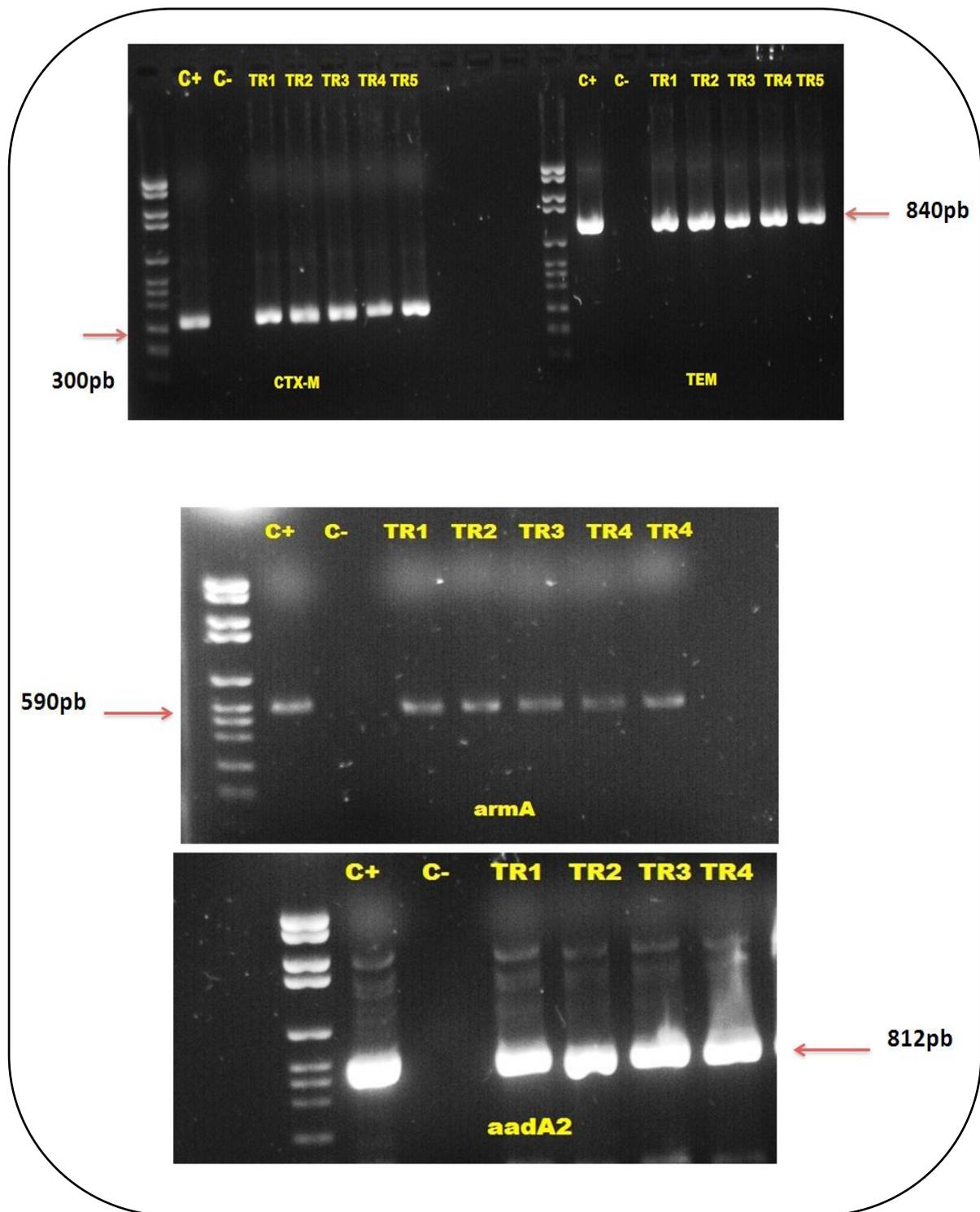
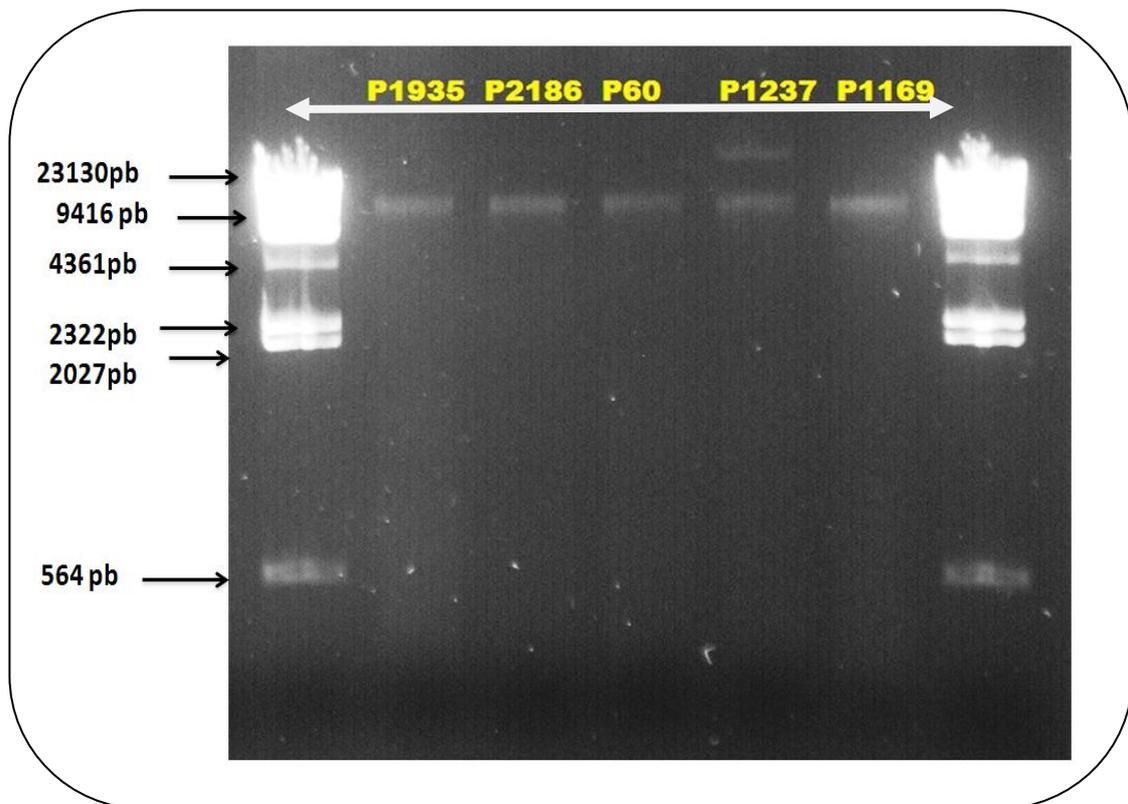


Figure 32: PCR standard des transconjugants d'*Escherichia coli*.

C+: control positif, C-: control négatif, TR: transconjugant, pb: paire de base

10. Analyse du plasmide

Les cinq souches de *S. marcescens* (trois pigmentées et deux non pigmentées) provenant de service de chirurgie urologique à Constantine possédant un plasmide conjugatif ont fait l'objectif d'une extraction plasmidique à l'aide de colonne QIAGEN provenant du QIAprep® Spin Miniprep Kit (Figure 33) et le résultat montre que nos souches possèdent un plasmide de taille supérieur à 10 Kb.



M : Marqueur Lamda DNA Hind III

Figure 33: Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'extraction du plasmide des cinq transconjugants.

11. Détermination des groupes d'incompatibilité des plasmides

Dans le but de vérifier la typabilité des souches de *S. marcescens*, les 18 groupes d'incompatibilité les plus fréquents chez les entérobactéries (HI1, HI2, I1, X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, FIIA, F, P, W, T, A/C, K, B/O, Y) ont été testés pour cinq souches des transconjugants productrice de BLSE, *armA* et *aadA2*, des PCR ont été réalisées pour la recherche de ces groupes d'incompatibilité. Les résultats montrent que les plasmides

appartiennent au groupe L/M (Figure 34), en revanche les autres PCR réalisées n'ont donné aucun résultat positif pour les autres groupes. Ces résultats montrent bien que c'est le même type de plasmide qui circule et qui pourra probablement être la cause d'une épidémie au niveau du service de chirurgie urologique de Constantine.

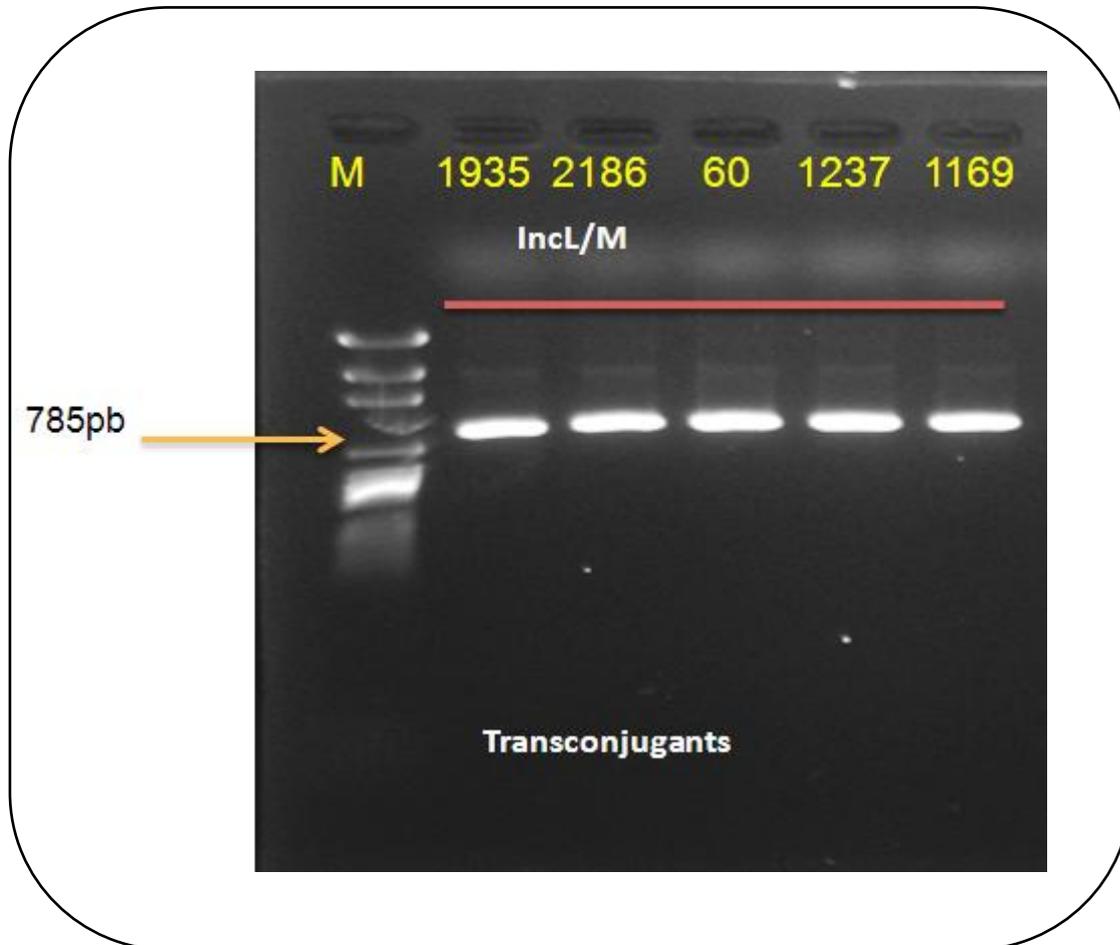


Figure 34: Le groupe d'incompatibilité L/M des transconjugants.

12. Génotypage

- Arbres phylogénétiques

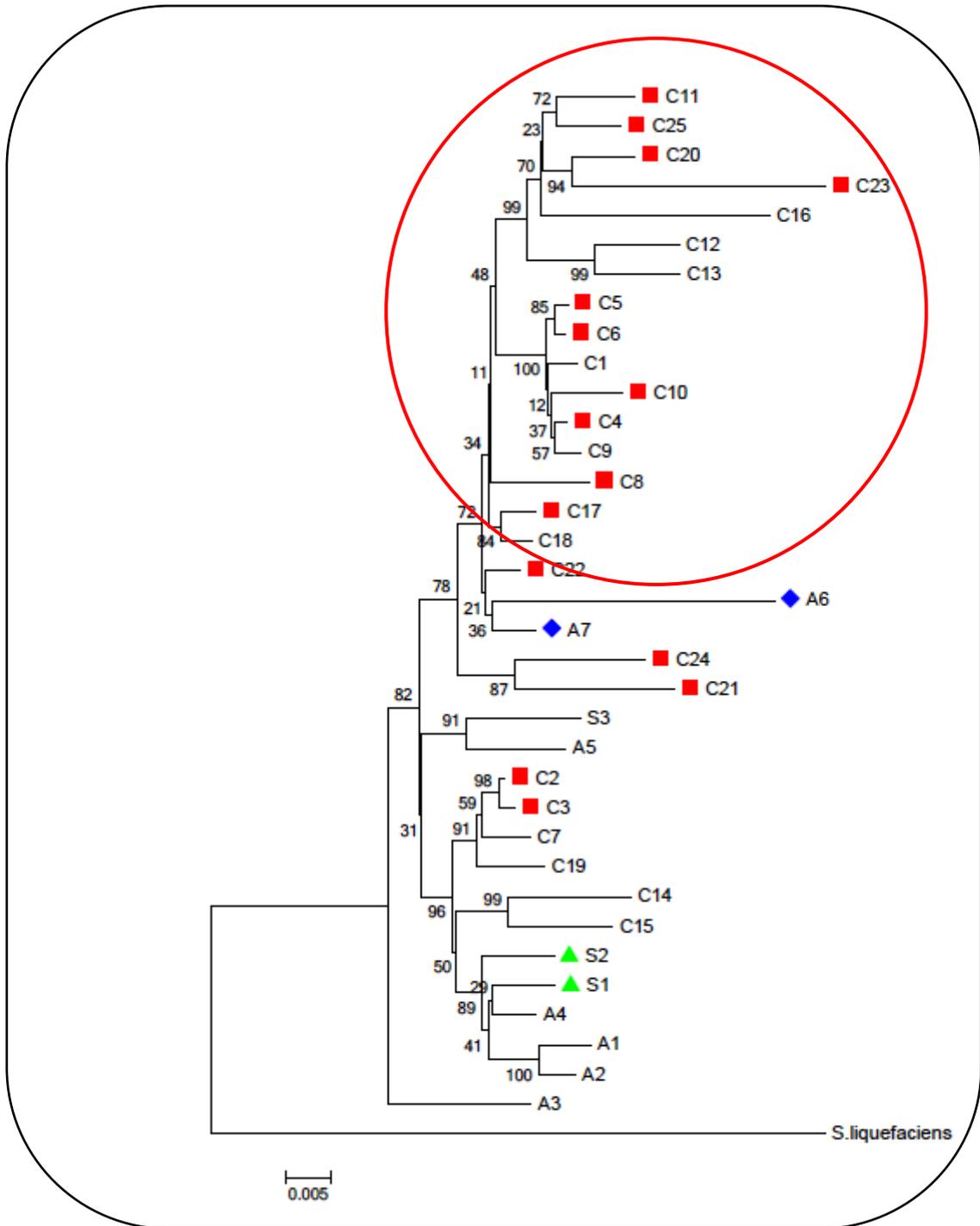
Après les résultats obtenus de l'extraction et d'analyse du plasmide, la détermination des relations entre les isolats a été basée sur les isolats qui possèdent le gène *armA* dans le service de chirurgie urologique à Constantine suite à une suspicion d'une épidémie.

Dans cette étude on a essayé pour la première fois d'utiliser une autre méthode de génotypage en sélectionnant quatre gènes de ménage (*gyrB*, *rpoB*, *infB* et *atpD*). L'amplification, séquençage, la concaténation et l'alignement avec ClustalW des séquences nous a permis

d'obtenir un arbre phylogénétique construit avec le MEGA6 en utilisant la méthode « Neighbour-joining » (Figure 35) et comme le montre la figure les isolats qui hébergent les gènes de β -lactamine et les armA sont regroupés dans le même groupe ce qui nous poussé à suspecter une épidémie dans ce service de la chirurgie urologique (Figure 35).

- **Arbres phylogénétiques et le MALDI-TOF MS clustering**

Un arbre phylogénétique a été construit pour déterminer la parenté entre les isolats sur la base des séquences concaténées des quatre gènes de ménage (gyrB, atpD, rpoB, et InfB). D'après les résultats obtenus, on note la présence d'un groupe d'isolats associés à des isolats hébergeant armA et les BLSE dans l'unité d'urologie de Constantine entre Octobre 2011 et Mars 2013. Il est important de noter que ce groupe correspond au même groupe obtenu dans le dendrogramme du MALDI-TOF à la distance arbitraire de 300 (Figure 36).



■ ◆ ▲ : Souches productrices *d'armA*

Figure 35: Arbre phylogénétique des 35 souches multirésistantes de *S. marcescens*.

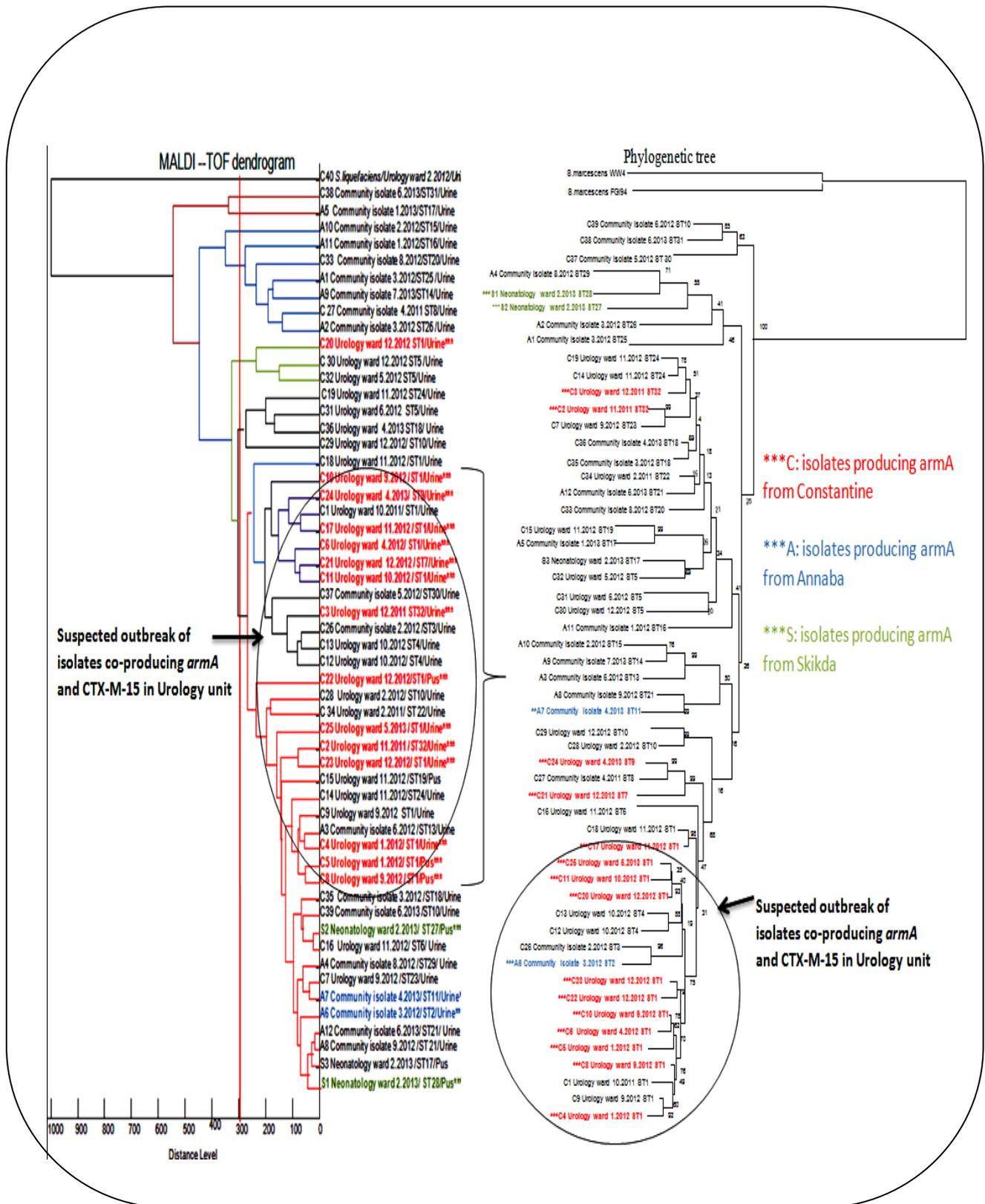


Figure 36: Arbres phylogénétiques et le MALDI-TOF MS clustering des 54 souches de *S. marcescens*.

Depuis l'apparition de l'antibiothérapie, l'utilisation des antibiotiques s'accompagne souvent de l'émergence de bactéries résistantes. Cette émergence s'est amplifiée et accélérée suite à l'utilisation immodérée et non contrôlée des antibiotiques, ce qui a entraîné des échecs thérapeutiques conduisant ainsi au développement des bactéries multirésistantes. La fréquence de ces bactéries multirésistantes aux antibiotiques a atteint, partout dans le monde, des proportions très inquiétantes.

L'émergence des entérobactéries surtout celles sécrétrices de bêta-lactamases à spectre étendu et celles sécrétrices de carbapénèmases est inquiétante, elle concerne non seulement les bactéries rencontrées en milieu hospitalier mais également les bactéries communautaires.

Parmi ces entérobactéries *S. marcescens*, un pathogène opportuniste fréquemment impliqué dans plusieurs types d'infections particulièrement dans les services d'urologie, pédiatrie et les unités de soins intensifs. Ce pathogène présente une multirésistance importante aux antibiotiques particulièrement les β -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones.

Les objectifs de notre étude consistaient à évaluer les niveaux de la résistance aux antibiotiques des souches de *S. marcescens*, de mettre en évidence les souches productrices de BLSE et armA, d'identifier le support génétique de la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones, d'étudier la possibilité de transfert de la résistance entre les bactéries, l'analyse de leur plasmide en déterminant leur groupe d'incompatibilité et enfin essayer de tester de nouveaux moyens de typage moléculaire des souches multirésistantes de *S. marcescens*.

Ce travail a porté sur 54 souches de *S. marcescens* non-dupliquées collectées durant une période de 20 mois du mois de Décembre 2011 au mois d'Aout 2013, à partir de prélèvements bactériologiques d'origine pathologique recueillis de différents établissements de santé au niveau de l'Est algérien.

Au cours de ce travail nous avons procédé comme suit:

- **Identification bactérienne**

L'identification biochimique des souches de *S. marcescens* a été réalisée par la galerie 20E puis confirmée par le spectromètre de masse MALDI-TOF qui est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI=*Matrix-Assisted Laser*

Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = *Time-Of-Flight*). Cette dernière a été utilisée avec succès pour l'identification des espèces de *S. marcescens* dans plusieurs études y compris celles rapportées aux États-Unis et en Allemagne (**Richter et al., 2013; Schaumann et al., 2013**).

Dans notre étude cette spectrométrie de masse a donné un très bon score d'identification pour toutes les souches bactérienne. En outre, elle reste un moyen très efficace et rapide d'identification des bactéries dans la pratique quotidienne au sein des laboratoires de microbiologie clinique, elle est basée sur l'ionisation des protéines bactériennes et peut être utilisée en première intention pour l'identification bactérienne à la place de la coloration de Gram, d'autres techniques d'orientations ou encore celles basées sur les caractéristiques biochimiques des bactéries nécessitant beaucoup de temps pour les réaliser.

- **Provenance des souches**

Les souches de *S. marcescens* ont été isolées dans (67%) des cas à partir du service de la chirurgie urologique de l'établissement hospitalier spécialisé de Constantine, dont les prélèvements concernés proviennent dans plus de la moitié des urines suivis par les prélèvements de pus. Ceci concorde à l'échelle nationale avec les données d'une étude algérienne décrivant l'existence de cette espèce dans le service d'urologie (**Nedjai et al., 2012**) et celle rapportée en Arabie Saoudite sur les infections nosocomiale à *S. marcescens* a révélé un taux de (4.9%) de *S. marcescens* dans le service d'urologie (**Hani S.Faidah, 2015**).

les infections urinaires semble être placées en premier rang sur l'ensemble des infections diagnostiquées en médecine de ville qui commence actuellement à constituer un problème de santé publique (**Sibanarayan et al.; 2015**), et ceci concorde avec les résultats obtenus dans la présente étude, en effet un taux de (28%) des souches de *S. marcescens* ont été d'origine communautaire provenant d'urine à Annaba, et à Constantine, Ces résultats obtenus restent inférieurs à ceux rapportés dans une étude effectuée en 2007 dans la région sanitaire de Calgary (Canada) qui a montré que (92%) des isolats de *S. marcescens* présentent un taux de (65%) d'infections d'origine communautaire (**Laupland et al., 2008**), inférieurs à ceux rapporté en 2009 en Australie où l'incidence annuelle à *S. marcescens* est de 1,03 pour 100.000 habitants, avec 47% d'épisodes ayant leur apparition dans la communauté (**Engel et al., 2009**) et ceux d'une autre étude rétrospective en Grèce sur la fréquence des *S. marcescens* d'origine communautaire (38%) (**Samonis et al., 2011**).

- **Répartition des souches selon le type d'infection**

Le taux d'infection urinaire due à *S. marcescens* révélé est de 87%, plusieurs travaux similaires ont montré que les souches de *S. marcescens* ont été responsables d'infection urinaire; parmi les quels on cite :

- Une étude en Pologne a montré que *S. marcescens* était responsable d'infection urinaire avec un taux de (32.39%) (**Kawecki et al., 2011**),
- Au Taiwan, 138 souches de *S. marcescens* collectées pendant deux ans provenaient d'urine étaient responsables d'infection nosocomiale du tractus urinaire dont (33.48%) de 1991 à 1995 et (42.05%) de 1996 à 2000 (**Su et al., 2003**).
- Le rapport de la surveillance de laboratoire des souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes isolées au Québec entre octobre 2011 et décembre 2012 a montré que *S. marcescens* représente un taux de 8% des bactéries isolées responsables d'infection urinaire (**Dessi et al., 2009**).
- En 2014, selon le programme (TSAR) de surveillance de la résistance aux antibiotiques au Taiwan a montré que sur un total de 403 *S. marcescens* isolées (22.3%) proviennent des prélèvements du tractus urinaire (**Liou et al., 2014**).
- Enfin, une étude rapportée récemment en Arabie Saoudite sur les infections nosocomiales dues à *S. marcescens* affirme que ce pathogène est responsable d'infection urinaire avec un pourcentage de (8.6%) (**Hani S.Faidah, 2015**).

- **Répartition des souches selon le sexe des patients**

Concernant le sexe des patients, nous avons constaté que le sexe masculin est prédominant pour toutes les souches. Au total, 54 patients touchés par *S. marcescens* ont été concernés par cette étude, 21 femmes et 33 hommes le sexe ratio étant 0.64. Cette différence dans la présente étude reste statistiquement non significative, cependant une étude de 10 ans faite en Australie a montré que (68%) des infections à *S. marcescens* touchent le sexe masculin (**Engel et al., 2009**). Une autre étude rétrospective sur les infections nosocomiales des *S. marcescens* en Grèce a également montrée la prédominance du sexe masculin (67.5%) (**Samonis et al., 2011**) donc le sexe masculin semblerait être un facteur de risque pour les infections à *S. marcescens*.

- **Répartition des souches selon l'âge des patients**

La répartition des patients selon l'âge a montré que toutes les tranches d'âges sont touchées par *S. marcescens* et cela varient entre 1 mois et 83 ans. La tranche d'âge qui semble être la plus touchée par les infections à *S. marcescens* est la population des personnes dont l'âge dépasse 50 ans soit un pourcentage de 43%.

Plusieurs études dans ce contexte ont pu montrer que *S. marcescens* touche également toutes les tranches d'âge; nouveau-né, adultes ou personnes âgées (**Al Jarousha et al., 2008; Casolari et al., 2013; Merkier et al., 2013**); une étude effectuée en 2007 dans la région sanitaire de Calgary (Canada) a montré un taux d'isolement plus élevé chez les personnes de plus de 60 ans. Dans la population de moins de 60 ans, le taux d'isolement chez les hommes et les femmes diffère légèrement (65,9 pour 100 000 chez les hommes et 36,5 pour 100 000 chez les femmes) (**Laupland et al., 2008**).

Résistance aux antibiotiques

En Algérie, très peu de données actualisées permettant de décrire l'évolution du niveau de la résistance des *S. marcescens* aux antibiotiques afin d'actualiser les mesures prophylactiques et thérapeutiques.

- **Phénotype de résistance aux β -lactamines**

Les souches de *S. marcescens* ont présenté une résistance assez importante aux C3G; (67%) vis-à-vis de la céfotaxime, (56%) vis-à-vis de la céftazidime, et (65%) vis-à-vis de la céftriaxone et surtout les céphalosporines de 4^{ème} génération; céfépime avec 61%. Ces résultats sont assez comparables à une étude réalisée sur la résistance aux antibiotiques au Taiwan qui a révélé qu'un taux de (93.8%) sur l'ensemble des souches de *S. marcescens* isolées, étaient résistantes à la céftazidime et (73.2%) étaient résistantes à la céftriaxone (**Liou et al., 2014**).

Une autre étude au Taiwan a également montré que (92%) des souches sont résistantes à la céfotaxime, mais (99%) sont toujours sensibles à la céftazidime (**Mlynarczyk et al., 2007**).

Une étude en Iraq (Baghdad) a montré que (100%) des souches isolées étaient résistantes à la céftazidime (**Anfal Mohammed Khudhair, 2011**).

A l'échelle national et selon le réseau national de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques en Algérie (AARN), nous remarquons que les taux de résistance des souches

rapportées dans la présente étude sont généralement plus élevés. En effet, selon ce réseau AARN en 2010, sur l'ensemble des souches de *S. marcescens* isolées à l'échelle nationale la résistance au céfotaxime était de (33%) (AARN, 2011).

Selon le même rapport d'évaluation correspondant à la période (Janvier 2011 à Décembre 2011), sur l'ensemble des souches de *S. marcescens* testées seulement (22%) étaient résistantes aux C3G, sur l'ensemble des souches de *S. marcescens* isolées (AARN, 2012).

- ❖ Le traitement des *S. marcescens* nécessite l'utilisation des antibiotiques le plus souvent en association avec les bêta-lactamines (le plus souvent des céphalosporines de 4^{ème} génération), mais leur large utilisation a contribué à l'émergence des souches résistantes conduisant ainsi à une antibiothérapie restreinte.

- **Phénotype de résistance aux aminosides**

Concernant la résistance aux aminosides, les souches de *S. marcescens* ont présenté une résistance assez remarquable; (43%) vis-à-vis de l'amikacine, (61%) vis-à-vis de la gentamicine, et (80%) vis-à-vis de la tobramycine; ce taux de résistance trouvé se rapproche de celui trouvé en Arabie Saoudite: (69%) vis-à-vis de la gentamicine et vis-à-vis de l'amikacine, (67%) (Hani S.Faidah, 2015). Ces résultats restent supérieurs à ceux rapportés par une étude rétrospective en Grèce avec un pourcentage de (46%) vis-à-vis de la gentamicine, (48%) vis-à-vis de l'amikacine, et (8%) vis-à-vis de la tobramycine (Samonis et al., 2011)

Selon le rapport du Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques AARN en 2010, sur l'ensemble des souches de *S. marcescens* isolées à l'échelle nationale la résistance à la gentamicine était de (19%) et à l'amikacine était de (3%) (AARN, 2011).

Selon le même rapport en 2011, sur l'ensemble des souches de *S. marcescens* isolées à l'échelle nationale la résistance à la gentamicine et à l'amikacine étaient de (23%) et (22%) respectivement (AARN, 2012).

- **Phénotype de résistance aux fluoroquinolones**

Pour la résistance aux quinolones, on note une résistance assez remarquable pour l'acide nalidixique avec un taux de 52%, et pour la résistance aux fluoroquinolones on observe une résistance de (43%) vis-à-vis de la ciprofloxacine, ce taux reste légèrement inférieur à celui

rapporté en Arabie Saoudite avec un taux de (51%) (**Hani S.Faidah, 2015**) et supérieur à celui publié par le Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques AARN en 2010 et 2011 avec un taux de (10%) et (12%) respectivement (**AARN, 2012**).

- **Phénotype de résistance des BLSE**

Nous remarquons dans cette étude que le taux des BLSE est assez élevé ainsi il atteint les (65%), ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus au sud de l'Iran où les BLSE présente un taux de (69%) sur l'ensemble des *S. marcescens* isolées (**Mostatabi et al., 2013**) et dépasse le taux de prévalence trouvé à l'hôpital d'Annaba en Algérie (6,8%) (**Nedjai et al., 2012**), plus élevé que ce qui a été trouvé en Bulgarie (20%) (**Markovska et al., 2014**) et celui rapporté en France (12,5%) (**Adjide et al., 2004**).

A l'échelle national, Selon le Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN) en 2010, les souches BLSE+ trouvés chez *S. marcescens* représentent (31,76%) sur l'ensemble des isolats d'entérobactéries en milieu hospitalier (N=5434), les données retenues étant celles de 18 laboratoires membres (**AARN, 2011**).

Nous notons une nette recrudescence par rapport à l'année 2009 pour laquelle il a été enregistré 22,62% de souches BLSE+ à l'hôpital (N=4837). La fréquence d'isolement à l'hôpital, des souches BLSE+ était de (31.6%) pour *S. marcescens* (N=250) (**AARN, 2011**).

Selon le 13^{ème} rapport du Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques AARN en 2011, Les souches BLSE+ représentent (30,28%) des isolats d'Entérobactéries en milieu hospitalier (N=4726), les données retenues étant celles de 12 laboratoires à l'échelle nationale. La fréquence d'isolement à l'hôpital des souches BLSE+ était de (23,85%) pour *S. marcescens* (N=218) (**AARN, 2012**).

En ce qui concerne les autres molécules d'antibiotiques testées, des taux légèrement élevés de résistance ont été retrouvées dans notre collection, 43% de résistance a été révélée vis-à-vis des sulfamides.

- ❖ Suite à l'émergence et l'apparition des souches multirésistantes, les polymyxines ont été réintroduites dans le protocole thérapeutique pour traiter les infections dues aux bactéries sensible à cette famille d'antibiotique. *S. marcescens* est naturellement

résistante à la colistine, et cela peut expliquer la possibilité de l'émergence de souches de *S. marcescens* pan résistantes (résistantes à tous les antibiotiques).

- **Profil moléculaire des BLSE**

Le profil moléculaire des BLSE a révélé que le type CTX-M-15 a été détecté chez 59% (32) des isolats, ce qui confirme l'émergence et l'augmentation de la fréquence de CTX-M-15 des souches de *S. marcescens* isolées en Algérie, ce gène a été déjà rapporté chez une souches de *S. marcescens* sm21 isolée à Alger en 2007 (**Iabadene et al., 2009**) et d'autre part confirme la propagation du gène CTX-M-15 chez les entérobactéries à l'échelle national (**Ahmed et al., 2012; Belbel et al., 2014; Touati et al., 2006**) et à l'échelle mondiale (**Garza-Gonzalez et al., 2011; Lahlaoui et al., 2014**).

Le type SHV-2a a été trouvé chez une seule souche (2%), ce gène a été déjà isolé dans différents continents en provenance de différentes espèces bactériennes, en 2013, en Egypte et en Algérie chez les souches de *K. pneumoniae* (**Belbel et al., 2014; Newire et al., 2013**), à Mexico chez *Escherichia coli*, et en France chez *Pseudomonas aeruginosa* (**Jeannot et al., 2013**).

Un total de 25 (48%) des isolats hébergeaient le gène TEM-1, cela été déjà décrit chez *S. marcescens* dans le monde entier y compris l'Italie et le Japon (**Crivaro et al., 2007; Yatsuyanagi et al., 2006**).

Une seule souche de *S. marcescens* productrice de bla_{TEM-71}, ce gène a été déjà rapporté chez *Klebsiella pneumoniae* aux USA (**Rasheed et al., 2002**) et chez *Escherichia coli* en France et aux USA (**De et al., 2004; Wong-Beringer et al., 2002**), ce gène est rapporté pour la première fois dans la présente étude en Algérie chez *S. marcescens*.

Enfin 12 des isolats hébergeaient le gène PER-2 avec un taux de 22%, ce pourcentage reste élevé par rapport à celui rapporté avec un très faible pourcentage chez les souches de *S. marcescens* en Argentine où seulement deux souches porteuses du gène PER-2 ont été identifiées (**Merkier et al., 2013**). Ce pourcentage reste légèrement élevé par rapport à celui rapporté dans une autre étude en Argentine avec un pourcentage de 18% chez *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* et *Enterobacter cloacae* (**Quinteros et al., 2003**).

- **Profil moléculaire des aminosides**

Parmi les enzymes modificateurs d'aminoglycosides (AMEs), une seule souche de *S. marcescens* hébergeait le gène aph(3')VIb, ce gène qui confère la résistance à la gentamicine, l'amikacine et la kanamicine a été récemment décrit chez une souche de *Proteus mirabilis* à Gaza, Palestine (Chen et al., 2015) et en Algérie chez une souche d'*Acinetobacter baumannii* (Bakour et al., 2014).

Nous avons également noté que 20 souches de *S. marcescens* hébergeaient le gène aadA dont (18 aadA₂ et 2 aadA₁), ce dernier a été récemment décrit en Algérie chez des souches de *K. pneumoniae* à Annaba avec un taux plus important que le notre (35 aadA₂ et 4aadA₁) (Belbel et al., 2014), chez *P. aeruginosa* à Tlemcen (Sefraoui et al., 2014) et chez *K. pneumoniae* à Sétif (Bakour et al., 2015).

Nous avons révélé pour la première fois en Algérie chez les souches de *S. marcescens*, la détection du gène armA, une méthyltransférase du 16S ARNr qui code pour la résistance à tous les aminosides. Toutes les souches possédant le gène armA ont exprimé de hauts niveaux de résistance à l'amikacine, à la gentamicine et à la tobramycine avec des CMI supérieure à 256µg/ml.

Dans notre étude l'armA a été détecté avec un taux de (35%), ce pourcentage reste élevé par rapport à celui trouvé chez *S. marcescens*, en Bulgarie (Sabtcheva et al., 2008), en Corée (Kang et al., 2008; Park et al., 2009a) et en Chine (Yang et al., 2013).

Les souches productrices d'armA ont été associées à la production de BLSE avec un pourcentage de (35%) et ce taux reste élevé par rapport aux résultats rapporté en Corée (Park et al., 2006).

Plusieurs publications à l'échelle nationale ont rapporté la production des souches bactériennes des méthyltransférase du 16S ARNr avec la co-production de BLSE.

A l'échelle national, le gène armA a été identifié pour la première fois chez des souches d'entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter amalonaticus*) isolées chez quatre patients algériens transféré en Belgique (Bogaerts et al., 2007), chez des *K. pneumoniae* au CHU d'Annaba associées aux gènes CTX-M-15 (Belbel et al., 2014), *Salmonella enterica* à Constantine sur des plasmides conjugatifs portant les gènes TEM-1 et CTX-M-3 ou CTX-M-15, *Salmonella non-typhi* à Annaba associé aux gènes CTX-M-15 et CMY-2 (Bouzidi et al., 2011; Naas et

al., 2011), récemment *Acinetobacter baumannii* associé aux gènes de NDM-1 (**Bakour et al., 2014**) et *Enterobacter cloacae* à Constantine associées aux BLSE sur des plasmides conjugatifs portant les gènes CTX-M-15, TEM-1 et aadA (**Khennouchi et al., 2015**).

Le gène *armA* a été également rapporté dans le monde entier chez *S. marcescens* y compris le Japon et la Corée (**Doi et al., 2004; Park et al., 2006; Park et al., 2009b**). Une étude faite sur les entérobactéries résistantes à l'amikacine collectés de 1995 à 1998 et de 2001 à 2006 dans un hôpital universitaire en Corée du Sud, a montré que 307 souches de *S. marcescens* étaient résistantes à l'amikacine et la prévalence de gène 16S ARNr méthylase *amrA* présentait un taux de 2% (6) sur l'ensemble des *S. marcescens* isolées résistantes à l'amikacine (**Kang HY et al.; 2008**).

- Cependant, sept souches s'avèrent résistantes aux aminoglycosides sans gènes de résistances détectées, cela nécessitera une recherche plus approfondie et peut être expliqué par la possibilité d'acquisition de la résistance suite à d'autres mécanismes de résistance probablement non enzymatique.

- **Profil moléculaire des quinolones**

Six souches de *S. marcescens* sont porteuses du gène *aac(6')-Ib-cr*, un variant de déterminant *aac(6')-Ib*. Conformément à certaines études le gène *aac(6')-Ib-cr* peut co-exister avec *qnrA* ou *qnrB*, ce *aac(6')-Ib-cr* à médiation plasmidique a été trouvé chez *S. marcescens* qui contiennent des *qnrA1* et *qnrB1* (**Kim et al., 2009**).

Dans la présente étude 3 (6%) des souches de *S. marcescens* isolées possèdent le gène *qnrB42* qui code pour la résistance aux fluoroquinolones, ce gène a toujours coexisté avec le gène *aac(6')-Ib-cr*, ce dernier code pour la résistance simultanée aux aminosides et à la ciprofloxacine, et dans cette étude on trouve que les 3 souches (6%) hébergent ces deux gènes à la fois.

Une de nos souches héberge le gène *qnrB6*, ce dernier a été déjà rapporté chez des souches de *K. pneumoniae* au niveau des hôpitaux de la Corée (**Tamang et al., 2008**), le gène *qnrA6* trouvé dans cette étude chez la souche de *S. marcescens* a été également rapporté chez *Providencia stuartii* au niveau des hôpitaux de la Tunisie (**Arpin et al., 2012**).

- Dans cette étude certaines souches de *S. marcescens* présentaient une résistance à la ciprofloxacine et/ou l'ofloxacine sans la production de déterminant plasmidique de résistance aux quinolones. Ce résultat suggère que le principal mécanisme de résistance aux fluoroquinolones dans nos souches est probablement dû à des mutations ponctuelles dans les gènes codant pour les gyrases ou les topoisomérases.

- **Conjugaison bactérienne et transfert des gènes de résistance**

Dans cette étude, notre attention s'est portée sur les 19 souches de *S. marcescens* productrices de BLSE et porteuses du gène *armA*, et plus précisément 15 souches productrices d'*ArmA* provenant du service de chirurgie urologique à Constantine. Elles sont caractérisées par une résistance simultanée aux C3G et aux aminosides. Nous avons donc sélectionné cinq souches (pigmentées et non pigmentées) de *S. marcescens* comme donneur putatif afin de tester la transférabilité des gènes de résistance par des expériences de conjugaison bactérienne *in vitro*.

Les résultats obtenus de cette expérience ont montré que tous les transconjugants ont exprimé le même niveau de résistance aux antibiotiques utilisés. Le gène CTX-M-15, TEM-1 ont été co-transférés avec le gène *armA* et le *aadA*, ce qui suggère que les souches hébergent un plasmide conjugatif. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes qui ont démontré que les gènes de BLSE et le gène *armA* sont souvent localisés sur un plasmide conjugatif responsable de nombreuses épidémies chez *S. marcescens* (Park et al., 2006; Park et al., 2009b).

- ❖ Il est à noter qu'un travail similaire sur l'antibiorésistance des souches d'*Enterobacter cloacae* isolées dans la même période d'étude que la notre montre que les plasmides transférables que portent ces souches isolées du même service d'urologie à Constantine contiennent les mêmes gènes de résistance trouvés dans notre étude à savoir; CTX-M-15, TEM-1, *aadA* et *armA*, ce qui confirme nos résultats trouvés (Khennouchi et al.; 2015).

- **Détermination des groupes d'incompatibilité**

La détermination des groupes d'incompatibilité de nos souches a révélé que tous les transconjugants ont été positifs pour le type du plasmide L/M indiquant que les gènes de la résistance aux céphalosporines et aux aminoglycosides ont été localisés sur le même plasmide L/M hébergeant les gènes *armA*, *aadA* et BLSE (TEM-1 et CTX-M-15). Ce type de plasmide

a été déjà rapporté chez des souches de *S. marcescens* porteuses des gènes aac(6)-Ib-cr, bla_{CTX-M}, armA, et bla_{OXA-1} en Corée (**Park et al., 2009b**), au niveau des hôpitaux de la Bulgarie chez *S. marcescens* porteuses des gènes de la BLSE (**Markovska et al., 2014**) et aussi chez une souche de *S. marcescens* sm21 isolée d'un prélèvement urinaire en Algérie 'Alger' (**Iabadene et al., 2009**).

Certaines études ont rapporté qu'il existe une relation inversement proportionnelle entre la production de la prodigiosine des souches de *S. marcescens* et l'acquisition des plasmides (**Ruiz et al., 2003**). Dans notre collection les souches pigmentées ont présenté un taux important par rapport à celles non pigmentées (56%) soit (28%) ont présenté une multirésistance importante au service d'urologie. Les expériences de la conjugaison et l'analyse des plasmides faites montrent bien l'acquisition des deux types de souches le même plasmide L/M qui présente la même taille et porte les mêmes gènes de résistance, cela peut être expliqué par le transfert du plasmide entre les deux catégories des souches pigmentées et non pigmentées.

- ❖ Cette résistance considérable aux antibiotiques et leur possibilité du transfert via des plasmides conjuguables au sein de la même espèce ainsi qu'entre différentes espèces bactériennes augmentent le risque d'épidémies et facilite l'émergence des carbapénémases et leur dissémination.

- ***S. marcescens* et épidémie nosocomiale**

Nos résultats suggèrent une épidémie probable au niveau du service de chirurgie urologique des souches de *S. marcescens* porteuses des plasmides transférables porteuses des gènes de BLSE et d'armA. Ce pathogène présente une résistance naturelle à la colistine qui a été utilisé comme dernier recours administré pour le traitement de *Pseudomonas aeruginosa* au sein du même service. Ces résultats sont similaires à celle rapporté en Tunisie (**Ktari et al., 2010**), en Argentine par **Merkier et al., (2013)** en 2013 suite à l'administration de la colistine pour le traitement d'*Acinetobacter baumannii* au niveau des hôpitaux en Argentine ce qui a provoqué des épidémies à *S. marcescens*.

S. marcescens est une bactérie qui touche l'environnement hospitalier, selon une étude récente faite en Algérie par **DEBABZA MANEL, (2014)** sur l'émergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatif multirésistants aux antibiotiques dans la région de Tebessa, *S. marcescens* était l'espèce dominante avec un taux de (15.69%) sur l'ensemble des BGN

isolées à partir de différents sites de l'environnement hospitalier dont (19.15%) sont des BLSE. Cette étude incite à proposer des recommandations au sein des structures sanitaires plus précisément de l'environnement hospitalier qui peut être la source de plusieurs infections nosocomiales.

Etant donné que les entérobactéries y compris *S. marcescens* sont responsables d'une bonne partie des infections nosocomiales et sont associées à une morbidité et une mortalité importantes, l'émergence et la dissémination de la résistance aux carbapénèmes posent un problème de santé publique majeur; d'une part du fait que certaines bactéries sont «pan-résistantes» et que l'on ne dispose pas d'antibiotiques efficaces pour traiter les infections causées par ces micro-organismes, d'autre part du fait que ces bactéries se répandent rapidement à travers le monde (**Mohamed Abbas, 2012**).

- ❖ Dans notre étude et selon les résultats obtenus les carbapénèmes sont les antibiotiques de choix pour traiter les infections à *S. marcescens*.

Contrairement en Algérie, l'émergence et la dissémination de carbapénémases chez *S. marcescens* à médiation chromosomique a été rapportée dans le monde entier, des carbapénémases de type SME-1, SME-2, SME-3 et SMB-1 rapportés aux Royaume-Uni, États-Unis, Japon, Canada et la suisse (**Bush et al., 2013; Carrer et al., 2008; Haifei Yang, 2012**).

La dissémination des carbapénémases par l'intermédiaire d'intégrons tel que les gènes VIM-2 et VIM-16 ont été aussi détectés en Argentine et en Corée (**Haifei Yang, 2012; Nastro et al., 2013; Vilacoba et al., 2014**).

La dissémination plasmidique a concerné les gènes IMP-6, IMP-1 et IMP-10 identifiés au Japon et au Brésil (**Haifei Yang, 2012; Silva et al., 2015**), les gènes KPC-2, KPC-3 et KPC-4 en Chine, Grèce, États-Unis, et au Brésil (**Haifei Yang, 2012; Silva et al., 2015**).

D'autres carbapénémases de type GES, ont été identifiées chez *S. marcescens* GES-1 et GES-5 au Canada et à la Hollande (**Poirel et al., 2007; Queenan and Bush, 2007**), le GIM-1 en Allemagne et les OXA-48 en Roumanie ont été également rapportés (**Szekely et al., 2013**).

Récemment, les gènes NDM-1 et NDM-7 ont également été décrits récemment chez *S. marcescens* en Allemagne, en Afrique du Sud et au Canada portés sur des chromosomes et des plasmides (**Gruber et al., 2015; Rubin et al., 2014**).

- **Génotypage des souches de *S. marcescens***

En raison de la fréquence des infections nosocomiales causées par *S. marcescens*, les laboratoires de microbiologie clinique doivent être en mesure de faire la différence entre les isolats individuels pour identifier les sources potentielles de contamination et de suivre la transmission entre les patients. Le génotypage de *S. marcescens* a été réalisé en utilisant diverses méthodes moléculaires, en particulier PFGE (Electrophorèse en champ pulsé) qui est la technique de référence pour la détection des épidémies chez *S. marcescens* dans le monde (**Dongyou Liu, 2011**).

Du point de vue épidémiologique, différentes méthodes ont été proposées auparavant pour comparer les souches de *S. marcescens*.

Dans cette étude on a essayé pour la première fois d'utiliser une autre méthode de génotypage en sélectionnant quatre gènes de ménage (*gyrB*, *rpoB*, *INFB* et *atpD*), ce qui nous a permis d'obtenir un arbre phylogénique où les isolats qui hébergent les gènes de β -lactamine et les *armA* ont été regroupés dans le même groupe et cela nous a poussé à suspecter une épidémie dans le service de la chirurgie urologique. Contrairement aux autres techniques de génotypage on n'était pas dans la mesure de confirmer cette suspicion d'épidémie vu que ce qu'on a obtenu comme résultat n'a pas été confirmé par une technique de génotypage validée telle que la PFGE.

- **L'utilité du MALDI-TOF MS dans le génotypage**

Le MALDI-TOF MS est un moyen efficace utilisé pour l'identification bactérienne (**Berrazeg et al., 2013**) maintenant les recherches sont focalisées sur la possibilité de l'utiliser comme un outil discriminatoire de génotypage comme décrit précédemment pour la discrimination des clones d' *E. coli* (**Novais et al., 2014**).

Dans la présente étude, une relation a été observée entre MALDI-TOF MS et l'analyse de la phylogénétique chez *S. marcescens* où un groupe a été significativement associée à la production de l'*armA* par rapport aux résultats MSP à la distance arbitraire 300, suggérant qu'une épidémie probable au niveau du service de chirurgie urologique due à la transmission

manuportée ou à la contamination des équipements telle que la cystoscopie, comme indiqué précédemment dans une étude rapportée en Algérie (**Nedjai et al., 2012**). Cette corrélation suggère que MALDI-TOF MS peut représenter un outil prometteur pour le génotypage des isolats clinique de *S. marcescens* en temps réel et de contrôler les infections nosocomiales au sein des hôpitaux, cette suggestion a été confirmée par plusieurs études, notamment de nombreux isolats comme *E. coli*, *N. méningitis* et *K. pneumoniae* (**Berrazeg et al., 2013; Christner et al., 2014; Honisch et al., 2007; Novais et al., 2014**).

En revanche, certaines études ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre MALDI-TOF MS et le génotypage pour certaines souches bactériennes comme *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus* (**Lasch et al., 2014**) ou encore *K. pneumoniae* dans une autre étude (**Sachse et al., 2014**).

Pour conclure, relever les défis de la résistance à *S. marcescens* nécessitera une approche à multiples facettes, y compris l'utilisation modérée d'antibiotiques, les diagnostics améliorés (y compris la détection rapide de la résistance) et la surveillance d'éventuelle épidémies, un meilleur respect des mesures de base de prévention des infections, le développement de nouveaux antibiotiques, la recherche de nouveau traitement sans antibiothérapie et établir des stratégies de prévention (**Vetter et al., 2016; Zowawi et al., 2015**).

PARTIE IV: CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Les infections nosocomiales et communautaires causées par les bactéries multi-résistantes (BMR) ont conduit non seulement à une augmentation de la mortalité, de la morbidité, et du coût de traitement, mais aussi continuent de mettre en danger la vie des patients surtout en milieu hospitalier. Bien entendu, l'utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques a contribué à la large diffusion des déterminants de la résistance. Face à cette préoccupation mondiale, plusieurs études ont été rapportées avec des recommandations importantes, de conduire des études épidémiologiques, moléculaires et génomiques afin de contrôler la diffusion et l'augmentation de la multirésistance aux antibiotiques.

Notre étude a porté sur 54 souches de *S. marcescens* non-dupliquées collectées à partir de prélèvements pathologiques provenant de différents établissements de santé de l'Est algérien.

Ces souches de *S. marcescens* identifiées dans cette étude présentent un taux de 67% des cas isolées à partir du service de chirurgie urologique et les prélèvements concernés proviennent dans plus de la moitié des urines.

La détermination des niveaux de la résistance aux antibiotiques par la diffusion sur milieu gélosé et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches de *S. marcescens* montre une résistance considérablement élevée vis-à-vis les β -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones.

Le support génétique des enzymes de la BLSE produits par 35 souches de *S. marcescens* isolées représente un taux de (65%) qui a exprimé également des résistances notamment aux aminosides et aux fluoroquinolones. Une diversité génétique des gènes qui codent pour les BLSE, les aminosides et les quinolones avec l'émergence de nouveaux gènes dans notre zone géographique a été révélée. Cette étude confirme la propagation des gènes; bla_{CTX-M-15}, bla_{TEM-1} et bla_{PER-2} chez *S. marcescens*.

Dans la présente étude, nous avons révélé pour la première fois en l'Algérie des souches de *S. marcescens* porteuses du gène armA, une méthyltransférase du 16S ARNr qui code pour la résistance à tous les aminosides. Toutes les souches qui hébergent le gène armA ont exprimé de hauts niveaux de résistance à l'amikacine, à la gentamicine et à la tobramycine avec une CMI supérieure à 256 μ g/ml. L'armA a été détecté avec un taux de (35%), ces méthyltransférase du 16S ARNr ont été exprimé avec la co-production de la BLSE ce qui rend le choix du traitement des infections causées par ces bactéries plus restreint.

Notre attention s'est portée sur les 19 souches de *S. marcescens* productrices de BLSE porteuses du gène *armA* qui sont caractérisées par une résistance simultanée aux C3G et aux aminosides.

Les expériences de la conjugaison et l'analyse des profils plasmidiques ont montré que tous les transconjugants ont exprimé le même niveau de résistance aux antibiotiques utilisés; les gènes CTX-M-15 et TEM-1 ont été co-transférés avec le gène *armA* et le *aadA*, portés sur un plasmide conjugatif de 10Kb.

La détermination des groupes d'incompatibilité des souches a révélé que tous les transconjugants ont été positifs pour le type du plasmide L/M indiquant que les gènes de la résistance aux céphalosporines et aux aminoglycosides ont été localisés sur le même plasmide L/M hébergeant les gènes *armA*, *aadA* et BLSE (TEM-1 et CTX-M-15).

Cette résistance considérable aux antibiotiques et leur possibilité du transfert via des plasmides conjugables au sein de la même espèce ainsi qu'entre différentes espèces bactériennes augmente le risque d'épidémies et facilite l'émergence des carbapénémases et leur dissémination.

L'analyse de la relation phylogénétique des isolats sur la base d'un arbre phylogénétique, identifie un groupe de souches porteuses du gène *armA* ce qui montre une épidémie soupçonnée dans l'unité de chirurgie urologique, ce dernier représente le service qui a hébergé la majorité des souches de *S. marcescens* isolées dans cette étude. La comparaison faite entre cet arbre phylogénétique et le MALDI-TOF MS clustering indique que le MALDI-TOF peut être utilisé comme un moyen de génotypage pour *S. marcescens*.

Perspectives

Pour pouvoir maîtriser la problématique de la multirésistance et le risque de l'émergence de la résistance aux carbapénèmes des entérobactéries y compris *S. marcescens*; différentes approches ont été suggérées:

un meilleur usage des antibiotiques, un meilleur respect des mesures d'hygiène afin de limiter la diffusion de ces bactéries, une meilleure compréhension des mécanismes d'acquisition des résistances aux antibiotiques afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, la constitution des comités au sein de différents établissements de santé chargés des programmes pour le contrôle des infections nosocomiales s'avère ainsi une priorité indispensable, et la nécessité de fournir des données épidémiologiques sur les souches clinique et établir des études plus profonde sur la dissémination des souches environnementales diffusées en milieu hospitalier.

Ce travail a souligné le risque de l'émergence de la résistance aux carbapénèmes des souches de *S. marcescens* porteuses des plasmides conjugatifs, et cela nécessite impérativement l'élaboration des tests rapides permettant la détection des ces souches avant leur dissémination.

Sur le plan microbiologique, l'obtention d'un résultat d'un antibiogramme ainsi qu'à l'identification des souches bactériennes nécessite le plus souvent beaucoup de temps et de tests pour les réaliser, la situation serait beaucoup plus améliorée et maîtrisée si la microbiologie pouvait être accélérée par l'utilisation de quelques techniques d'identification rapide telle que la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) qui est censé d'être également un moyen efficace pour le génotypage bactérien, et les techniques de biologie moléculaire telles que l'amplification par PCR pour la rechercher des gènes de résistance spécifiques. Cependant, le coût élevé de ces appareils reste un grand défi surtout pour les pays en voie de développement.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. (<http://www.biomerieux-diagnostics.com/chromidr-esbl>) Chromogenic media for ESBL screening.2015.
2. **AARN. 2011.** Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques: Surveillance de la résistance aux antibiotiques. 12ème Rapport d'évaluation (Janvier Décembre 2010).
3. **AARN. 2012.** Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques: Surveillance de la résistance aux antibiotiques. 13ème Rapport d'évaluation (Janvier Décembre 2011).
4. **Adjide CC, Li-Thiao-Te V, Biendo M, Weibel B, Laurans G, Krim G, Eb F. 2004.** [Case control study of extended-spectrum betalactamase producing *Serratia marcescens* outbreak in a paediatric intensive care unit]. *Pathol Biol (Paris)* **52**: 423-428.
5. **Ahmed ZB, Ayad A, Mesli E, Messai Y, Bakour R, Drissi M. 2012.** CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in the intensive care unit of Tlemcen Hospital, Algeria. *East Mediterr Health J* **18**: 382-386.
6. **Ajithkumar B, Ajithkumar VP, Iriye R, Doi Y, Sakai T. 2003.** Spore-forming *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* subsp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment tank. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 253-258.
7. **Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. 2008.** Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* **54**: 101-106.
8. **Al Jarousha AM, El Qouqa IA, El Jadba AH, Al Afifi AS. 2008.** An outbreak of *Serratia marcescens* septicaemia in neonatal intensive care unit in Gaza City, Palestine. *J Hosp Infect* **70**: 119-126.
9. **Alberti L, Harshey RM. 1990.** Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. *J Bacteriol* **172**: 4322-4328.
10. **Anfal Mohammed Khudhair SSaMA-F. 2011.** Isolation of Multi Antibiotic Resistance *Serratia marcescens* and the Detection of *AmpC* & *GESBL* Genes by Polymerase Chain Reaction Technique. *Al-Mustansiriyah J Sci* Vol. 22, No. 6: 329-346.

11. **Anuradha V Giri Nandini Anandkumar, Geetha Muthukumaran, Gautam Pennathur. 2004.** A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology* 4:11.
12. **Aronson LC, Alderman SI. 1943.** The Occurrence and Bacteriological Characteristics of *S. marcescens* from a Case of Meningitis. *J Bacteriol* 46: 261-267.
13. **Arpin C, Thabet L, Yassine H, Messadi AA, Boukadida J, Dubois V, Coulange-Mayonnove L, Andre C, Quentin C. 2012.** Evolution of an incompatibility group IncA/C plasmid harboring blaCMY-16 and qnrA6 genes and its transfer through three clones of *Providencia stuartii* during a two-year outbreak in a Tunisian burn unit. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 1342-1349.
14. **Ashkenazi S, Weiss E, Drucker MM. 1986.** Bacterial adherence to intravenous catheters and needles and its influence by cannula type and bacterial surface hydrophobicity. *J Lab Clin Med* 107: 136-140.
15. **B.E.Ostrowsky. 2002.** Bacériémies à *Serratia marcescens*. *Revue Française des Laboratoires* 2002: 12-13.
16. **Bagattini M, Crispino M, Gentile F, Barretta E, Schiavone D, Boccia MC, Triassi M, Zarrilli R. 2004.** A nosocomial outbreak of *Serratia marcescens* producing inducible Amp C-type beta-lactamase enzyme and carrying antimicrobial resistance genes within a class 1 integron. *J Hosp Infect* 56: 29-36.
17. **Bakour S, Sahli F, Touati A, Rolain JM. 2015.** Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria. *New Microbes New Infect* 3: 34-36.
18. **Bakour S, Touati A, Bachiri T, Sahli F, Tiouit D, Naim M, Azouaou M, Rolain JM. 2014.** First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo-beta-lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J Infect Chemother* 20: 696-701.
19. **Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M. 2002.** Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. *J Antimicrob Chemother* 50: 393-396.

20. **Begic S, Worobec EA. 2008.** The role of the *Serratia marcescens* SdeAB multidrug efflux pump and TolC homologue in fluoroquinolone resistance studied via gene-knockout mutagenesis. *Microbiology* **154**: 454-461.
21. **Belbel Z, Chettibi H, Dekhil M, Ladjama A, Nedjai S, Rolain JM. 2014.** Outbreak of an armA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital. *Microb Drug Resist* **20**: 310-315.
22. **Bergey's. 1923.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. *American Journal of Public Health* 1042.
23. **BERNARD LA, SUTTON WC. 1960.** Infection due to chromobacteria. Report of a case of pneumonia due to *Chromobacterium prodigiosum* successfully treated with kanamycin. *Arch Intern Med* **105**: 311-315.
24. **Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, Rolain JM. 2013.** Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One* **8**: e61428.
25. **Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. 2004.** Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* **50**: 59-69.
26. **Bizio B. 1823.** Lettera di Bartolomeo Bizio al chiarissimo canonico Angelo Bellani sopra il fenomeno della polenta porporina. *Bibl Ital G Lett Sci Art (Anno VIII)* 275-295.
27. **Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De MR, Rodriguez-Villalobos H, Struelens M, Glupczynski Y. 2007.** Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* **59**: 459-464.
28. **Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De CC, Viallard JL, Labia R, Sirot J. 2000.** A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3061-3068.
29. **Boulouis H-j ,Nadia Haddad et R.Maillard. 2001.** Techniques d'étude moléculaire des isolats: principes et fiabilité. *Epidemiologie et santé animale* **39**: 21-29.

30. **Bouzidi N, Aoun L, Dekhil M, Granier SA, Poirel L, Brisabois A, Nordmann P, Millemann Y. 2011.** Co-occurrence of aminoglycoside resistance gene armA in non-Typhi *Salmonella* isolates producing CTX-M-15 in Algeria. *J Antimicrob Chemother* **66**: 2180-2181.
31. **Boyd D, Taylor G, Fuller J, Bryce E, Embree J, Gravel D, Katz K, Kibsey P, Kuhn M, Langley J, Mataseje L, Mitchell R, Roscoe D, Simor A, Thomas E, Turgeon N, Mulvey M. 2015.** Complete Sequence of Four Multidrug-Resistant MOBQ1 Plasmids Harboring blaGES-5 Isolated from *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* Persisting in a Hospital in Canada. *Microb Drug Resist* **21**: 253-260.
32. **Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Vancanneyt M, Swings J, Coutinho T. 2008.** Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Syst Appl Microbiol* **31**: 447-460.
33. **Breed RS, Breed ME. 1924.** The Type Species of the Genus *Serratia*, Commonly Known as *Bacillus Prodigiosus*. *J Bacteriol* **9**: 545-557.
34. **Brenner, N.R.Krieg&J.R.Staley. 2005.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition .
35. **Bryant KA, Van Schooneveld TC, Thapa I, Bastola D, Williams LO, Safranek TJ, Hinrichs SH, Rupp ME, Fey PD. 2013.** KPC-4 Is encoded within a truncated Tn4401 in an IncL/M plasmid, pNE1280, isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 37-41.
36. **Bryskier A. 1999.** *Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques* , Ellipses
37. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1211-1233.
38. **Bush K, Pannell M, Lock JL, Queenan AM, Jorgensen JH, Lee RM, Lewis JS, Jarrett D. 2013.** Detection systems for carbapenemase gene identification should include the SME serine carbapenemase. *Int J Antimicrob Agents* **41**: 1-4.
39. **Byrne AH, Herra CM, Aucken H, Keane CT. 2001.** Rate of carriage of *Serratia marcescens* in patients with and without evidence of infection. *Scand J Infect Dis* **33**: 822-826.
40. **CAMBAU E. GT. 2012.** Antibactériens agissant sur la synthèse et la conformation des acides nucléiques. *Revue scientifique et technique de l'OIE*. Vol 31, N°1:65-76.

41. **Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. 2005.** Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**: 219-228.
42. **Carbonell GV, Della Colleta HH, Yano T, Darini AL, Levy CE, Fonseca BA. 2000.** Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**: 143-149.
43. **Carrer A, Poirel L, Pitout JD, Church D, Nordmann P. 2008.** Occurrence of an SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate in Canada. *Int J Antimicrob Agents* **31**: 181-182.
44. **Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P. 2010.** Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 1369-1373.
45. **Casolari C, Pecorari M, Della CE, Cattani S, Venturelli C, Fabio G, Tagliazucchi S, Serpini GF, Migaldi M, Marchegiano P, Rumpianesi F, Ferrari F. 2013.** *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: two long-term multiclonal outbreaks in a 10-year observational study. *New Microbiol* **36**: 373-383.
46. **Centron D, Roy PH. 2002.** Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1402-1409.
47. **Champion HM, Bennett PM, Lewis DA, Reeves DS. 1988.** Cloning and characterization of an AAC(6') gene from *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* **22**: 587-596.
48. **Changeur N. CM. 2009.** *Pharmacologie des aminosides (aminoglycosides)* .
49. **Chen L, Al LN, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. 2015.** First report of an OXA-48-producing multidrug-resistant *Proteus mirabilis* strain from Gaza, Palestine. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 4305-4307.
50. **Chen L, Peirano G, Lynch T, Chavda KD, Gregson DB, Church DL, Conly J, Kreiswirth BN, Pitout JD. 2015.** Molecular characterization using next generation sequencing of plasmids containing bla_{NDM-7} in *Enterobacteriaceae* from Calgary, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* .
51. **Chetoui H, Delhalle E, Melin P, Struelens MJ, De RR, Osterrieth P, De MP. 1998.** Typing of nosocomial strains of *Serratia marcescens*: comparison of pulsed-field gel electrophoresis

- of macrorestriction fragments with biotyping, esterase typing and ribotyping. *Res Microbiol* **149**: 137-143.
52. **Chiang PC, Wu TL, Kuo AJ, Huang YC, Chung TY, Lin CS, Leu HS, Su LH. 2013.** Outbreak of *Serratia marcescens* postsurgical bloodstream infection due to contaminated intravenous pain control fluids. *Int J Infect Dis* **17**: e718-e722.
53. **Christensen GD, Korones SB, Reed L, Bulley R, McLaughlin B, Bisno AL. 1982.** Epidemic *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: importance of the gastrointestinal tract as a reservoir. *Infect Control* **3**: 127-133.
54. **Christner M, Trusch M, Rohde H, Kwiatkowski M, Schluter H, Wolters M, Aepfelbacher M, Hentschke M. 2014.** Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One* **9**: e101924.
55. **Clewell DB. 1993.** *Bacterial conjugation*.
56. **Clive P Page. 1999.** *Pharmacologie intégrée*, De Boeck Supérieur.
57. **Coulthurst SJ, Williamson NR, Harris AK, Spring DR, Salmond GP. 2006.** Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens*: mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities. *Microbiology* **152**: 1899-1911.
58. **Courvalin, P,R.Leclercq, E.Bingen. 2006.** In: *Antibiogramme*. 142,227,263-162,246,277.
59. **Crivaro V, Bagattini M, Salza MF, Raimondi F, Rossano F, Triassi M, Zarrilli R. 2007.** Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* acquisition in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* **67**: 135-141.
60. **D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. 2011.** Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **477**: 457-461.
61. **da Silva KE, Cayo R, Carvalhaes CG, Correa de Sacchi FP, Rodrigues-Costa F, da Silva AC, Croda J, Gales AC, Simionatto S. 2015.** Co-production of KPC-2 and IMP-10 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolated from an outbreak in a Brazilian teaching hospital. *J Clin Microbiol*.

62. **Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. 2010.** Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 2666-2669.
63. **Davison J. 1999.** Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**: 73-91.
64. **de Boer MG, Brunsveld-Reinders AH, Salomons EM, Dijkshoorn L, Bernardts AT, van den Berg PC, van den Broek PJ. 2008.** Multifactorial origin of high incidence of *Serratia marcescens* in a cardio-thoracic ICU: analysis of risk factors and epidemiological characteristics. *J Infect* **56**: 446-453.
65. **Debabza manel mach. 2014.** prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase- producing *Enterobacteriaceae* isolated from hospital environments. *asian jr of microbiol biotech env sc* **16**: 19-27.
66. **de Vries JJ, Baas WH, van der Ploeg K, Heesink A, Degener JE, Arends JP. 2006.** Outbreak of *Serratia marcescens* colonization and infection traced to a healthcare worker with long-term carriage on the hands. *Infect Control Hosp Epidemiol* **27**: 1153-1158.
67. **De CC, Chanal C, Sirot D, Baraduc R, Romaszko JP, Bonnet R, Plaidy A, Boyer M, Carroy E, Gbadamassi MC, Laluque S, Oules O, Poupart MC, Villemain M, Sirot J. 2004.** Frequency and diversity of Class A extended-spectrum beta-lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother* **54**: 634-639.
68. **Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. 2006.** Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagn Microbiol Infect Dis* **56**: 367-372.
69. **Dessi A, Puddu M, Testa M, Marcialis MA, Pintus MC, Fanos V. 2009.** *Serratia marcescens* infections and outbreaks in neonatal intensive care units. *J Chemother* **21**: 493-499.
70. **Doi Y, Arakawa Y. 2007.** 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* **45**: 88-94.
71. **Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. 2004.** Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 491-496.

72. **Doi Y., B.-S.Lee, R.Iriye, S.Tabata, and K. Tateishi. 1998.** Dominantly growing bacteria in malodorless domestic sewage treatment tanks and their biochemical characteristics. *J Antibact Antifungal Agents (Japan)* 53-63.
73. **Dongyou Liu. 2011.** *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*, CRC Press.
74. **Dorsey G, Borneo HT, Sun SJ, Wells J, Steele L, Howland K, Perdreau-Remington F, Bangsberg DR. 2000.** A heterogeneous outbreak of *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* infections in a surgical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* **21**: 465-469.
75. **Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. 2008.** Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 1**: 90-103.
76. **Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. 2009.** Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem* **9**: 981-998.
77. **Dutta C, Pan A. 2002.** Horizontal gene transfer and bacterial diversity. *J Biosci* **27**: 27-33.
78. **Eberl L, Winson MK, Sternberg C, Stewart GS, Christiansen G, Chhabra SR, Bycroft B, Williams P, Molin S, Givskov M. 1996.** Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* **20**: 127-136.
79. **Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. 2003.** Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3724-3732.
80. **Ehrenkranz NJ, Bolyard EA, Wiener M, Cleary TJ. 1980.** Antibiotic-sensitive *Serratia marcescens* infections complicating cardiopulmonary operations: contaminated disinfectant as a reservoir. *Lancet* **2**: 1289-1292.
81. **Enciso-Moreno JA, Pernas-Buitron N, Ortiz-Herrera M, Coria-Jimenez R. 2004.** Identification of *Serratia marcescens* populations of nosocomial origin by RAPD-PCR. *Arch Med Res* **35**: 12-17.

82. Engel HJ, Collignon PJ, Whiting PT, Kennedy KJ. 2009. *Serratia sp.* bacteremia in Canberra, Australia: a population-based study over 10 years. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**: 821-824.
83. Ersoz G, Uguz M, Aslan G, Horasan ES, Kaya A. 2014. Outbreak of meningitis due to *Serratia marcescens* after spinal anaesthesia. *J Hosp Infect* **87**: 122-125.
84. Esel D, Doganay M, Bozdemir N, Yildiz O, Tezcaner T, Sumerkan B, Aygen B, Selcuklu A. 2002. Polymicrobial ventriculitis and evaluation of an outbreak in a surgical intensive care unit due to inadequate sterilization. *J Hosp Infect* **50**: 170-174.
85. Espinosa de los Monteros LE, Silva-Sanchez J, Jimenez LV, Rojas T, Garza-Ramos U, Valverde V. 2008. Outbreak of infection by extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Serratia marcescens* in a Mexican hospital. *J Chemother* **20**: 586-592.
86. Fluit AC, Schmitz FJ. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* **10**: 272-288.
87. Fujimaki K, Fujii T, Aoyama H, Sato K, Inoue Y, Inoue M, Mitsuhashi S. 1989. Quinolone resistance in clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 785-787.
88. Garza-Gonzalez E, Mendoza Ibarra SI, Llaca-Diaz JM, Gonzalez GM. 2011. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates at a tertiary-care centre in Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol* **60**: 84-90.
89. Gaughran ER. 1969. From superstition to science: the history of a bacterium. *Trans N Y Acad Sci* **31**: 3-24.
90. GAZENGEL Jean-Marie OA-M. 2013. *Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique*, 2nd.
91. Gianneli D, Tzelepi E, Tzouvelekis LS, Mentis AF, Nikolopoulou C. 1994. Dissemination of cephalosporin-resistant *Serratia marcescens* strains producing a plasmidic SHV type beta-lactamase in Greek hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**: 764-767.
92. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. 2015. Clonal distribution of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **81**: 264-268.

93. **Grimont PA, Grimont F. 1978.** Biotyping of *Serratia marcescens* and its use in epidemiological studies. *J Clin Microbiol* **8**: 73-83.
94. **Gruber TM, Gottig S, Mark L, Christ S, Kempf VA, Wichelhaus TA, Hamprecht A. 2015.** Pathogenicity of pan-drug-resistant *Serratia marcescens* harbouring blaNDM-1. *J Antimicrob Chemother* **70**: 1026-1030.
95. **Gulmez D, Woodford N, Palepou MF, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y, Kocagoz S, Uzun O, Hascelik G, Livermore DM. 2008.** Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* **31**: 523-526.
96. **Gunkel AG, Hechler U, Martin HH. 1991.** State of penicillin-binding proteins and requirements for their bactericidal interaction with beta-lactam antibiotics in *Serratia marcescens* highly resistant to extended-spectrum beta-lactams. *J Gen Microbiol* **137**: 243-252.
97. **Gupta N, Hocevar SN, Moulton-Meissner HA, Stevens KM, McIntyre MG, Jensen B, Kuhar DT, Noble-Wang JA, Schnatz RG, Becker SC, Kastango ES, Shehab N, Kallen AJ. 2014a.** Outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition prepared by a compounding pharmacy. *Clin Infect Dis* **59**: 1-8.
98. **Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, Rolain JM. 2014b.** ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 212-220.
99. **Haifei Yang Jun Cheng, Lifen Hu. 2012.** Mechanisms of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens*. *African Journal of Microbiology research* 4427-4437.
100. **Hamilton RL, Brown WJ. 1972.** Bacteriophage typing of clinically isolated *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol* **24**: 899-906.
101. **Hammoudi D, Ayoub MC, Aires J, Adaime A, Barakat A, Fayad N, Hakime N, Houmani M, Itani T, Najjar Z, Suleiman M, Sarraf R, Karam SD. 2014.** Countrywide spread of OXA-48 carbapenemase in Lebanon: surveillance and genetic characterization of carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in 10 hospitals over a one-year period. *Int J Infect Dis* **29**: 139-144.
102. **Hani S.Faidah Sami S.Ashgar,Abeer A.A.Barhameen,Hamdi M.El-Said1,Abdelrahman Elsayy. 2015.** *Serratia marcescens* as Opportunistic Pathogen and the Importance of

- Continuous Monitoring of Nosocomial Infection in Makah City, Saudi Arabia. *Open Journal of Medical Microbiology* 107-112.
103. **Hawe AJ, Hughes MH. 1954.** Bacterial endocarditis due to *Chromobacterium prodigiosum*; report of a case. *Br Med J* 1: 968-970.
104. **Hejazi A, Aucken HM, Falkiner FR. 2000.** Epidemiology and susceptibility of *serratia marcescens* in a large general hospital over an 8-year period. *J Hosp Infect* 45: 42-46.
105. **Hejazi A, Falkiner FR. 1997.** *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol* 46: 903-912.
106. **Hejazi A, Keane CT, Falkiner FR. 1997.** The use of RAPD-PCR as a typing method for *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol* 46: 913-919.
107. **Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, Prasad KN, Woodford N, Gonzalez-Zorn B. 2013.** Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother* 68: 1543-1550.
108. **Hiki M, Usui M, Akiyama T, Kawanishi M, Tsuyuki M, Imamura S, Sekiguchi H, Kojima A, Asai T. 2014.** Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. *Ir Vet J* 67: 14.
109. **Hines DA, Saurugger PN, Ihler GM, Benedik MJ. 1988.** Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 170: 4141-4146.
110. **Honisch C, Chen Y, Mortimer C, Arnold C, Schmidt O, van den Boom D, Cantor CR, Shah HN, Gharbia SE. 2007.** Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10649-10654.
111. **Horng YT, Deng SC, Daykin M, Soo PC, Wei JR, Luh KT, Ho SW, Swift S, Lai .HC, Williams P. 2002.** The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol* 45: 1655-1671.
112. **Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, Arlet G. 2009.** Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* in Algiers hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 34: 340-342.

113. **Ivady B, Szabo D, Damjanova I, Pataki M, Szabo M, Kenesei E. 2014.** Recurrent outbreaks of *Serratia marcescens* among neonates and infants at a pediatric department: an outbreak analysis. *Infection* **42**: 891-898.
114. **Ivanova D, Markovska R, Hadjieva N, Schneider I, Mitov I, Bauernfeind A. 2008.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* outbreak in a Bulgarian hospital. *J Hosp Infect* **70**: 60-65.
115. **Avril J-L, H.DABERNAT, F.DENIS, H.MONTEIL. 1992.** *Bactériologie clinique*, 2ème édition.
116. **Jean-Jacques Lefrere. 2000.** *Transfusion sanguine: une approche sécuritaire*, Montrouge, France: J. Libbey Eurotext.
117. **Jeannot K, Fournier D, Muller E, Cholley P, Plesiat P. 2013.** Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing extended-spectrum beta-lactamase SHV-2a. *J Clin Microbiol* **51**: 673-675.
118. **John G Holt. 1994.** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9 Edition.
119. **Jones RN. 2010.** Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis* **51 Suppl 1**: S81-S87.
120. **Kang HY, Kim KY, Kim J, Lee JC, Lee YC, Cho DT, Seol SY. 2008.** Distribution of conjugative-plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes among amikacin-resistant *Enterobacteriaceae* isolates collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a university hospital in South Korea and identification of conjugative plasmids mediating dissemination of 16S rRNA methylase. *J Clin Microbiol* **46**: 700-706.
121. **Kawecki D, Kwiatkowski A, Sawicka-Grzelak A, Durlik M, Paczek L, Chmura A, Mlynarczyk G, Rowinski W, Luczak M. 2011.** Urinary tract infections in the early posttransplant period after kidney transplantation: etiologic agents and their susceptibility. *Transplant Proc* **43**: 2991-2993.
122. **Khennouchi NC, Loucif L, Boutefnouchet N, Allag H, Rolain JM. 2015.** MALDI-TOF MS as a Tool To Detect a Nosocomial Outbreak of Extended-Spectrum-beta-Lactamase- and ArmA Methyltransferase-Producing *Enterobacter cloacae* Clinical Isolates in Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 6477-6483.

123. **Kim C, Heseck D, Zajicek J, Vakulenko SB, Mobashery S. 2006.** Characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme ANT(3'')-II/AAC(6')-IId from *Serratia marcescens*. *Biochemistry* **45**: 8368-8377.
124. **Kim J, Lim YM. 2005.** Prevalence of derepressed ampC mutants and extended-spectrum beta-lactamase producers among clinical isolates of *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, and *Serratia marcescens* in Korea: dissemination of CTX-M-3, TEM-52, and SHV-12. *J Clin Microbiol* **43**: 2452-2455.
125. **Kim JY, Park YJ, Kwon HJ, Han K, Kang MW, Woo GJ. 2008.** Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *J Antimicrob Chemother* **62**: 479-483.
126. **Kim SY, Park YJ, Yu JK, Kim YS, Han K. 2009.** Prevalence and characteristics of aac(6')-Ib-cr in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*: a multicenter study from Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* **63**: 314-318.
127. **Kiratisin P, Henprasert A. 2011.** Resistance phenotype-genotype correlation and molecular epidemiology of *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella* and *Serratia* that carry extended-spectrum beta-lactamases with or without plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **105**: 46-51.
128. **Knowles S, Herra C, Devitt E, O'Brien A, Mulvihill E, McCann SR, Browne P, Kennedy MJ, Keane CT. 2000.** An outbreak of multiply resistant *Serratia marcescens*: the importance of persistent carriage. *Bone Marrow Transplant* **25**: 873-877.
129. **Kraus-Haas M, Mielke M, Simon A. 2015.** [Update on outbreaks reported from neonatal intensive care units: *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa*]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **58**: 308-322.
130. **Krawczyk B, Naumiuk L, Lewandowski K, Baraniak A, Gniadkowski M, Samet A, Kur J. 2003.** Evaluation and comparison of random amplification of polymorphic DNA, pulsed-field gel electrophoresis and ADSRRS-fingerprinting for typing *Serratia marcescens* outbreaks. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**: 241-248.
131. **Krishnan PU, Pereira B, Macaden R. 1991.** Epidemiological study of an outbreak of *Serratia marcescens* in a haemodialysis unit. *J Hosp Infect* **18**: 57-61.

132. **Kruger T, Szabo D, Keddy KH, Deeley K, Marsh JW, Hujer AM, Bonomo RA, Paterson DL. 2004.** Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4263-4270.
133. **Ktari S, Mahjoubi F, Mnif B, Kallel H, Bouaziz M, Hammami A. 2010.** [Investigation of three nosocomial outbreaks of *Serratia marcescens* in an intensive care unit in Sfax-Tunisia]. *Tunis Med* **88**: 501-506.
134. **Kubo Y, Komatsu M, Tanimoto E, Sugimoto K, Tanaka S, Migita S, Kondo Y, Yano S, Maehara K, Murata R, Nakamura A, Fujita T, Kawata Y. 2015.** The spread of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* ST2 and ST246 in a hospital in Japan. *J Med Microbiol*.
135. **Labid Asma. 2015.** Etude fréquentielle des bactéries responsables des infections septicémiques chez les enfants dans la région d'Annaba, Université BADJI MOKHTAR ANNABA.
136. **Lahlaoui H, Ben Haj KA, Ben MM. 2014.** Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum beta-lactamase (ESBL). *Med Mal Infect* **44**: 400-404.
137. **LANCASTER LJ. 1962.** Role of *Serratia* species in urinary tract infections. *Arch Intern Med* **109**: 536-539.
138. **Lapenda JC, Silva PA, Vicalvi MC, Sena KX, Nascimento SC. 2015.** Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. *World J Microbiol Biotechnol* **31**: 399-406.
139. **Larose P, Picard B, Thibault M, Grimont F, Goulet P. 1990.** Nosocomial *Serratia marcescens* individualized by five typing methods in a regional hospital. *J Hosp Infect* **15**: 167-172.
140. **Larouche G. 2001.** Pharmacothérapie théorique. In: *Les quinolones : des années soixante à aujourd'hui. Pharmacothérapie théorique* . 34-40.
141. **Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. 2006.** In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1282-1286.
142. **Lasch P, Fleige C, Stammler M, Layer F, Nubel U, Witte W, Werner G. 2014.** Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. *J Microbiol Methods* **100**: 58-69.

143. **Laupland KB, Parkins MD, Gregson DB, Church DL, Ross T, Pitout JD. 2008.** Population-based laboratory surveillance for *Serratia* species isolates in a large Canadian health region. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**: 89-95.
144. **Liou BH, Duh RW, Lin YT, Lauderdale TL, Fung CP. 2014.** A multicenter surveillance of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens* in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* **47**: 387-393.
145. **Liu X, Jia J, Papat R, Ortori CA, Li J, Diggle SP, Gao K, Camara M. 2011.** Characterisation of two quorum sensing systems in the endophytic *Serratia plymuthica* strain G3: differential control of motility and biofilm formation according to life-style. *BMC Microbiol* **11**: 26.
146. **Livermore DM. 1995.** β -lactamase mediated resistance: past, present and future. 75-83.
147. **Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. 2001.** Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* **48 Suppl 1**: 87-102.
148. **Livermore DM, Woodford N. 2006.** The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* **14**: 413-420.
149. **Lodge J, Busby S, Piddock L. 1993.** Investigation of the *Pseudomonas aeruginosa* ampR gene and its role at the chromosomal ampC beta-lactamase promoter. *FEMS Microbiol Lett* **111**: 315-320.
150. **Madani TA, Alsaedi S, James L, Eldeek BS, Jiman-Fatani AA, Alawi MM, Marwan D, Cudal M, Macapagal M, Bahlas R, Farouq M. 2011.** *Serratia marcescens*-contaminated baby shampoo causing an outbreak among newborns at King Abdulaziz University Hospital, Jeddah, Saudi Arabia. *J Hosp Infect* **78**: 16-19.
151. **Mahillon J, Chandler M. 1998.** Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 725-774.
152. **Mahlen SD. 2011.** *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev* **24**: 755-791.
153. **Mahlen SD, Morrow SS, Abdalhamid B, Hanson ND. 2003.** Analyses of ampC gene expression in *Serratia marcescens* reveal new regulatory properties. *J Antimicrob Chemother* **51**: 791-802.
154. **Maiden MC. 2006.** Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 561-588.

155. **Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3140-3145.
156. **Marinella MA, Warwar R. 1998.** Endogenous endophthalmitis due to *Serratia marcescens*. *South Med J* **91**: 388-391.
157. **Markovska RD, Stoeva TJ, Bojkova KD, Mitov IG. 2014.** Epidemiology and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter spp.*, *Pantoea agglomerans*, and *Serratia marcescens* isolates from a Bulgarian hospital. *Microb Drug Resist* **20**: 131-137.
158. **Martha Embrey Paul Hunter, Jane Sellwood, Peter Wyn-Jones, Steven L. Percival, Rachel Chalmers. 2004.** *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*, Elsevier.
159. **Mata C, Miro E, Mirelis B, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F, Coll P, Navarro F. 2010.** In vivo transmission of a plasmid coharbouring bla and qnrB genes between *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol Lett* **308**: 24-28.
160. **Mataseje LF, Boyd DA, Delpont J, Hoang L, Imperial M, Lefebvre B, Kuhn M, Van CP, Willey BM, Mulvey MR. 2014.** *Serratia marcescens* harbouring SME-type class A carbapenemases in Canada and the presence of bla_{SME} on a novel genomic island, SmarGI1-1. *J Antimicrob Chemother* **69**: 1825-1829.
161. **Matsumoto K. 2004.** Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biol Chem* **385**: 1007-1016.
162. **Matsuo T, Chen J, Minato Y, Ogawa W, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. 2008.** SmdAB, a heterodimeric ABC-Type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **190**: 648-654.
163. **Melano R, Corso A, Petroni A, Centron D, Orman B, Pereyra A, Moreno N, Galas M. 2003.** Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother* **52**: 36-42.

164. **Merkier AK, Rodriguez MC, Togneri A, Brengi S, Osuna C, Pichel M, Cassini MH, Centron D. 2013.** Outbreak of a cluster with epidemic behavior due to *Serratia marcescens* after colistin administration in a hospital setting. *J Clin Microbiol* **51**: 2295-2302.
165. **Merlino CP. 1924.** Bartolomeo Bizio's Letter to the most Eminent Priest, Angelo Bellani, Concerning the Phenomenon of the Red Colored Polenta. *J Bacteriol* **9**: 527-543.
166. **Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. 1999.** Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 727-737.
167. **Mizunoe Y, Matsumoto T, Haraoka M, Sakumoto M, Kubo S, Kumazawa J. 1995.** Effect of pili of *Serratia marcescens* on superoxide production and phagocytosis of human polymorphonuclear leukocytes. *J Urol* **154**: 1227-1230.
168. **Mlynarczyk A, Mlynarczyk G, Pupek J, Bilewska A, Kawecki D, Luczak M, Gozdowska J, Durlik M, Paczek L, Chmura A, Rowinski W. 2007.** *Serratia marcescens* isolated in 2005 from clinical specimens from patients with diminished immunity. *Transplant Proc* **39**: 2879-2882.
169. **Mohamed Abbas ACCFSHJS. 2012.** Carbapénémases: implications cliniques et épidémiologiques pour la Suisse. *Rev Med Suisse* 882-889.
170. **Montagnani C, Cocchi P, Lega L, Campana S, Biermann KP, Braggion C, Pecile P, Chiappini E, de MM, Galli L. 2015.** *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit: crucial role of implementing hand hygiene among external consultants. *BMC Infect Dis* **15**: 11.
171. **Mostatabi N, Farshad S, Ranjbar R. 2013.** Molecular evaluations of extended spectrum beta-lactamase producing strains of *Serratia* isolated from blood samples of the patients in Namazi Hospital, Shiraz, Southern Iran. *Iran J Microbiol* **5**: 328-333.
172. **Moya-Torres A, Mulvey MR, Kumar A, Oresnik IJ, Brassinga AK. 2014.** The lack of OmpF, but not OmpC, contributes to increased antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Microbiology* **160**: 1882-1892.
173. **Mudd S, Mudd EB. 1924.** the penetration of bacteria through capillary spaces: iv. a kinetic mechanism in interfaces. *j exp med* **40**: 633-645.
174. **Muller M.P. 2004.** Resistance des bacteries Gram negatif due aux beta-lactamases, Toronto.Medical Laboratories and Mount Sinai Hospital.

175. **Muro S, Garza-Gonzalez E, Camacho-Ortiz A, Gonzalez GM, Llaca-Diaz JM, Bosques F, Rositas F. 2012.** Risk factors associated with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* nosocomial bloodstream infections in a tertiary care hospital: a clinical and molecular analysis. *Chemotherapy* **58**: 217-224.
176. **Muylaert A, Mainil JG. 2013.** Fluoroquinolones resistances: the current situation. *Annales de Médecine Vétérinaire* **Vol. 157** No: 15-26.
177. **Naas T, Bentchouala C, Cuzon G, Yaou S, Lezzar A, Smati F, Nordmann P. 2011.** Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* **38**: 135-139.
178. **Naas T, Vandell L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. 1994.** Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 1262-1270.
179. **Nagy E, Pragai Z, Koczian Z, Hajdu E, Fodor E. 1998.** Investigation of the presence of different broad-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Acta Microbiol Immunol Hung* **45**: 433-446.
180. **Nastro M, Monge R, Zintgraff J, Vaulet LG, Boutureira M, Famiglietti A, Rodriguez CH. 2013.** First nosocomial outbreak of VIM-16-producing *Serratia marcescens* in Argentina. *Clin Microbiol Infect* **19**: 617-619.
181. **Nasu M. 1981.** Bacteriocin (marcescin) typing of clinically isolated *Serratia marcescens*. *Tohoku J Exp Med* **133**: 33-43.
182. **Naumiuk L, Baraniak A, Gniadkowski M, Krawczyk B, Rybak B, Sadowy E, Samet A, Kur J. 2004.** Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in two hospitals in Gdansk, Poland, over a 5-year period. *J Clin Microbiol* **42**: 3108-3116.
183. **Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, Timinouni M. 2012.** Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Med Mal Infect* **42**: 20-29.
184. **Newire EA, Ahmed SF, House B, Valiente E, Pimentel G. 2013.** Detection of new SHV-12, SHV-5 and SHV-2a variants of extended spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Egypt. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **12**: 16.

185. **Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, Courcol R, Simonet M. 1999.** PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol* **150**: 317-322.
186. **Nordmann P, Cuzon G, Naas T. 2009.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* **9**: 228-236.
187. **Novais A, Sousa C, de Dios CJ, Fernandez-Olmos A, Lopes J, Ramos H, Coque TM, Canton R, Peixe L. 2014.** MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**: 1391-1399.
188. **Oxley D, Wilkinson SG. 1989.** Structures of neutral glycans isolated from the lipopolysaccharides of reference strains for *Serratia marcescens* serogroups O16 and O20. *Carbohydr Res* **193**: 241-248.
189. **Palomar J, Leranoz AM, Vinas M. 1995.** *Serratia marcescens* adherence: the effect of O-antigen presence. *Microbios* **81**: 107-113.
190. **Park YJ, Kim SY, Yu JK, Kim SI, Uh Y, Hong SG, Jongwook L, Kwak HS. 2009.** Spread of *Serratia marcescens* coharboring aac(6')-Ib-cr, bla CTX-M, armA, and bla OXA-1 carried by conjugative IncL/M type plasmid in Korean hospitals. *Microb Drug Resist* **15**: 97-102.
191. **Park YJ, Lee S, Yu JK, Woo GJ, Lee K, Arakawa Y. 2006.** Co-production of 16S rRNA methylases and extended-spectrum beta-lactamases in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* in Korea. *J Antimicrob Chemother* **58**: 907-908.
192. **Park YJ, Yu JK, Lee S, Oh EJ, Woo GJ. 2007.** Prevalence and diversity of qnr alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *J Antimicrob Chemother* **60**: 868-871.
193. **Parvaz P, Tille D, Meugnier H, Perraud M, Chevallier P, Ritter J, Fabry J, Sepetjan M. 2002.** A rapid and easy PCR-RFLP method for genotyping *Serratia marcescens* strains isolated in different hospital outbreaks and patient environments in the Lyon area, France. *J Hosp Infect* **51**: 96-105.
194. **Passaro DJ, Waring L, Armstrong R, Bolding F, Bouvier B, Rosenberg J, Reingold AW, McQuitty M, Philpott SM, Jarvis WR, Werner SB, Tompkins LS, Vugia DJ. 1997.**

- Postoperative *Serratia marcescens* wound infections traced to an out-of-hospital source. *J Infect Dis* **175**: 992-995.
195. **Patton TG, Katz S, Sobieski RJ, Crupper SS. 2001.** Genotyping of clinical *Serratia marcescens* isolates: a comparison of PCR-based methods. *FEMS Microbiol Lett* **194**: 19-25.
196. **Peng CF, Lee MF, Fu HT, Chen YJ, Hsu HJ. 2007.** Characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in CTX-M-3-producing *Serratia marcescens* isolates from southern Taiwan. *Jpn J Infect Dis* **60**: 250-256.
197. **Perilli M, Celenza G, De SF, Pellegrini C, Forcella C, Rossolini GM, Stefani S, Amicosante G. 2008.** E240V substitution increases catalytic efficiency toward ceftazidime in a new natural TEM-type extended-spectrum beta-lactamase, TEM-149, from *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 915-919.
198. **Perilli M, Felici A, Franceschini N, De SA, Pagani L, Luzzaro F, Oratore A, Rossolini GM, Knox JR, Amicosante G. 1997.** Characterization of a new TEM-derived beta-lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2374-2382.
199. **Pinna A, Usai D, Sechi LA, Carta A, Zanetti S. 2011.** Detection of virulence factors in *Serratia* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. *Acta Ophthalmol* **89**: 382-387.
200. **Pitt TL. 1982.** State of the art: typing of *Serratia marcescens*. *J Hosp Infect* **3**: 9-14.
201. **Platonov AE, Shipulin GA, Platonova OV. 2000.** [Multilocus sequencing--a new method of genotyping bacteria and first results of its use]. *Genetika* **36**: 597-605.
202. **Plough H. 1945.** Penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and its clinical implications. *Am J Clin Pathol* **15**: 446-451.
203. **Ploy MC, Lambert T, Couty JP, Denis F. 2000.** Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med* **38**: 483-487.
204. **Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. 2004.** Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 15-22.
205. **Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. 2007.** Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* **2**: 501-512.

206. **Queenan AM, Bush K. 2007.** Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* **20**: 440-58.
207. **Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D, Couto E, Gutkind G. 2003.** Extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2864-2867.
208. **Rasheed JK, Anderson GJ, Queenan AM, Biddle JW, Oliver A, Jacoby GA, Bush K, Tenover FC. 2002.** TEM-71, a novel plasmid-encoded, extended-spectrum beta-lactamase produced by a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2000-2003.
209. **Reid G, Sobel JD. 1987.** Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infection: a review. *Rev Infect Dis* **9**: 470-487.
210. **Richter SS, Sercia L, Branda JA, Burnham CA, Bythrow M, Ferraro MJ, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R, Lewinski MA, Manji R, Mochon AB, Rychert JA, Westblade LF, Procop GW. 2013.** Identification of *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **32**: 1571-1578.
211. **Rieber H, Frontzek A, Pfeifer Y. 2012.** Emergence of metallo-beta-lactamase GIM-1 in a clinical isolate of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 4945-4947.
212. **Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. 2006.** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* **12**: 83-88.
213. **Rodrigues AP, Holanda AR, Lustosa GP, Nobrega SM, Santana WJ, Souza LB, Coutinho HD. 2006.** Virulence factors and resistance mechanisms of *Serratia marcescens*. A short review. *Acta Microbiol Immunol Hung* **53**: 89-93.
214. **Rolain JM, Canton R, Cornaglia G. 2012.** Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm. *Clin Microbiol Infect* **18**: 615-616.
215. **Rubin JE, Peirano G, Peer AK, Govind CN, Pitout JD. 2014.** NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* from South Africa: moving towards endemicity? *Diagn Microbiol Infect Dis* **79**: 378-380.

216. **Ruiz N, Montero T, Hernandez-Borrell J, Vinas M. 2003.** The role of *Serratia marcescens* porins in antibiotic resistance. *Microb Drug Resist* **9**: 257-264.
217. **S.Houari, M.Chemsi, M.Ouhadous, M.Lehlimi, K.Zerouali, A.Habzi, S.Benommar. 2014.** Epidémie à *Serratia Marcescens* en unité de néonatalogie: description et investigations. In: *Congrès des Sociétés de Pédiatrie, Lyon, 22-24.* 619.
218. **Sabtcheva S, Saga T, Kantardjiev T, Ivanova M, Ishii Y, Kaku M. 2008.** Nosocomial spread of armA-mediated high-level aminoglycoside resistance in *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-3 beta-lactamase in a cancer hospital in Bulgaria. *J Chemother* **20**: 593-599.
219. **Sachse S, Bresan S, Erhard M, Edel B, Pfister W, Saupe A, Rodel J. 2014.** Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of beta-lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* **80**: 267-271.
220. **Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. 2014.** Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents* **43**: 328-334.
221. **Samonis G, Vouloumanou EK, Christofaki M, Dimopoulou D, Maraki S, Triantafyllou E, Kofteridis DP, Falagas ME. 2011.** *Serratia* infections in a general hospital: characteristics and outcomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **30**: 653-660.
222. **Sanchez L, Ruiz N, Leranoz S, Vinas M, Puig M. 1997.** The role of outer membrane in *Serratia marcescens* intrinsic resistance to antibiotics. *Microbiologia* **13**: 315-320.
223. **Sanders CC, Watanakunakorn C. 1986.** Emergence of resistance to beta-lactams, aminoglycosides, and quinolones during combination therapy for infection due to *Serratia marcescens*. *J Infect Dis* **153**: 617-619.
224. **Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T, Ciccaglione D, Romano L, Fiori B, Nicoletti G, Zanetti S, Fadda G. 2003.** Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum beta-lactamase detection method. *J Clin Microbiol* **41**: 1463-1468.
225. **Schaumann R, Knoop N, Genzel GH, Losensky K, Rosenkranz C, Stingu CS, Schellenberger W, Rodloff AC, Eschrich K. 2013.** Discrimination of *Enterobacteriaceae*

- and Non-fermenting Gram Negative Bacilli by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Open Microbiol J* **7**: 118-122.
226. **Schulz-Stubner S, Zimmer P, Leonards P, Knipp U, Michels H, Kunitz O, Thomas W. 2015.** [Colonization-outbreak of two clonally different strains of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **58**: 190-196.
227. **Sefraoui I, Berrazeg M, Drissi M, Rolain JM. 2014.** Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microb Drug Resist* **20**: 156-161.
228. **Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La SB, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. 2009.** Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* **49**: 543-551.
229. **Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La SB, Drancourt M, Raoult D. 2010.** MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* **5**: 1733-1754.
230. **Seo J, Shin D, Oh SH, Lee JH, Chung KY, Lee MG, Kim DS. 2015.** Cutaneous *Serratia marcescens* infections in Korea: A retrospective analysis of 13 patients. *J Dermatol*.
231. **Shanks RM, Stella NA, Kalivoda EJ, Doe MR, O'Dee DM, Lathrop KL, Guo FL, Nau GJ. 2007.** A *Serratia marcescens* OxyR homolog mediates surface attachment and biofilm formation. *J Bacteriol* **189**: 7262-7272.
232. **Shaw KJ, Rather PN, Sabatelli FJ, Mann P, Munayyer H, Mierzwa R, Petrikos GL, Hare RS, Miller GH, Bennett P, . 1992.** Characterization of the chromosomal aac(6')-Ic gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 1447-1455.
233. **Shimuta K, Ohnishi M, Iyoda S, Gotoh N, Koizumi N, Watanabe H. 2009.** The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on lysophospholipid production by PhlA. *BMC Microbiol* **9**: 261.
234. **Sibanarayan Rath, Rabindra N. Padhy. 2015.** Surveillance of acute community acquired urinary tract bacterial infections. *Journal of Acute Disease*. Volume 4, Issue 3:186–195. doi:10.1016/j.joad.2015.06.001.
235. **Silva KE, Cayo R, Carvalhaes CG, Patussi Correia SF, Rodrigues-Costa F, Ramos da Silva AC, Croda J, Gales AC, Simionatto S. 2015.** Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in

- Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Isolates from an Outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. *J Clin Microbiol* **53**: 2324-2328.
236. **Singleton P WJ. 2005.** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies..
237. **Skerman VBDVMapHAS. 1980.** Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 225-420.
238. **Sleigh JD. 1983.** Antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Br Med J (Clin Res Ed)* **287**: 1651-1653.
239. **Soussy. 2006.** Bases de la catégorisation clinique. In: *Antibiogramme*. ESKA ed. 35-41.
240. **Stephen M, Lalitha MK. 1993.** An outbreak of *Serratia marcescens* infection among obstetric patients. *Indian J Med Res* **97**: 202-205.
241. **Stock I, Burak S, Sherwood KJ, Gruger T, Wiedemann B. 2003a.** Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*. *J Antimicrob Chemother* **51**: 865-885.
242. **Stock I, Grueger T, Wiedemann B. 2003b.** Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens sensu stricto*, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 35-47.
243. **Stokes HW, Hall RM. 1989.** A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* **3**: 1669-1683.
244. **Su LH, Ou JT, Leu HS, Chiang PC, Chiu YP, Chia JH, Kuo AJ, Chiu CH, Chu C, Wu TL, Sun CF, Riley TV, Chang BJ. 2003.** Extended epidemic of nosocomial urinary tract infections caused by *Serratia marcescens*. *J Clin Microbiol* **41**: 4726-4732.
245. **Suh B, Bae IK, Kim J, Jeong SH, Yong D, Lee K. 2010.** Outbreak of meropenem-resistant *Serratia marcescens* mediated by chromosomal AmpC beta-lactamase overproduction and outer membrane protein loss. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 5057-5061.
246. **Szekely E, Damjanova I, Janvari L, Vas KE, Molnar S, Bilca DV, Lorinczi LK, Toth A. 2013.** First description of bla(NDM-1), bla(OXA-48), bla(OXA-181) producing *Enterobacteriaceae* strains in Romania. *Int J Med Microbiol* **303**: 697-700.

247. **Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Dahal RK, Mishra SK, Ohara H, Kirikae T, Pokhrel BM. 2015.** A Novel 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase, AAC(6')-Ial, from a Clinical Isolate of *Serratia marcescens*. *Microb Drug Resist*.
248. **Tamang MD, Seol SY, Oh JY, Kang HY, Lee JC, Lee YC, Cho DT, Kim J. 2008.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnrA, qnrB, and qnrS among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in a Korean hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 4159-4162.
249. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725-2729.
250. **Tanaka T, Takahashi H, Kobayashi JM, Ohyama T, Okabe N. 2004.** A nosocomial outbreak of febrile bloodstream infection caused by heparinized-saline contaminated with *Serratia marcescens*, Tokyo, 2002. *Jpn J Infect Dis* **57**: 189-192.
251. **Thomson NR, Crow MA, McGowan SJ, Cox A, Salmond GP. 2000.** Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol* **36**: 539-556.
252. **Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, De CC. 2006.** First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* **27**: 397-402.
253. **Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Gharout A, Madoux J, De CC. 2008.** First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* **60**: 287-290.
254. **Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. 2005.** Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 118-125.
255. **Ulu-Kilic A, Parkan O, Ersoy S, Koc D, Percin D, Onal O, Metan G, Alp E. 2013.** Outbreak of postoperative empyema caused by *Serratia marcescens* in a thoracic surgery unit. *J Hosp Infect* **85**: 226-229.
256. **Van HR, Givskov M, Michiels CW. 2007.** Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 407-424.

257. **Velasco C, Rodriguez-Martinez JM, Briaies A, Diaz de AP, Calvo J, Pascual A. 2010.** Smaqnr, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* **65**: 239-242.
258. **Vetter L, Schuepfer G, Kuster SP, Rossi M. 2016.** A Hospital-wide Outbreak of *Serratia marcescens*, and Ishikawa's "Fishbone" Analysis to Support Outbreak Control. *Qual Manag Health Care* **25**: 1-7.
259. **Vilacoba E, Quiroga C, Pistorio M, Famiglietti A, Rodriguez H, Kovensky J, Deraspe M, Raymond F, Roy PH, Centron D. 2014.** A blaVIM-2 plasmid disseminating in extensively drug-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 7017-7018.
260. **Vladana Milisavljevic FWELDRBRLMDPD-LaLS. 2004.** Molecular Epidemiology of *Serratia marcescens* Outbreaks in Two Neonatal Intensive Care Units. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **25**: 719-722.
261. **Vogel L, Jones G, Triep S, Koek A, Dijkshoorn L. 1999.** RAPD typing of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates using standardized reagents. *Clin Microbiol Infect* **5**: 270-276.
262. **Wachino J, Yoshida H, Yamane K, Suzuki S, Matsui M, Yamagishi T, Tsutsui A, Konda T, Shibayama K, Arakawa Y. 2011.** SMB-1, a novel subclass B3 metallo-beta-lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 5143-5149.
263. **Walsh TR. 2008.** Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis* **21**: 367-371.
264. **Washington C.Winn, Stephen D.Allen, Stephen Allen, William M Janda, Elmer W.Koneman. 2005.** *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6 ed., Lippincott Williams & Wilkins.
265. **Wei JR, Tsai YH, Horng YT, Soo PC, Hsieh SC, Hsueh PR, Horng JT, Williams P, Lai HC. 2006.** A mobile quorum-sensing system in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **188**: 1518-1525.
266. **Weindorf H, Schmidt H, Martin HH. 1998.** Contribution of overproduced chromosomal beta-lactamase and defective outer membrane porins to resistance to extended-spectrum beta-lactam antibiotics in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* **41**: 189-195.

267. **Wendel AF, Brodner AH, Wydra S, Ressina S, Henrich B, Pfeiffer K, Toleman MA, Mackenzie CR. 2013.** Genetic characterization and emergence of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Pseudomonas spp.* and *Enterobacteriaceae* during a long-term outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 5162-5165.
268. **Winslow CE, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH. 1920.** The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *J Bacteriol* **5**: 191-229.
269. **Wong-Beringer A, Hindler J, Loeloff M, Queenan AM, Lee N, Pegues DA, Quinn JP, Bush K. 2002.** Molecular correlation for the treatment outcomes in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to ceftazidime. *Clin Infect Dis* **34**: 135-146.
270. **Wu LT, Tsou MF, Wu HJ, Chen HE, Chuang YC, Yu WL. 2004.** Survey of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) among cefotaxime-resistant *Serratia marcescens* at a medical center in middle Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* **49**: 125-129.
271. **Wu YM, Hsu PC, Yang CC, Chang HJ, Ye JJ, Huang CT, Lee MH. 2013.** *Serratia marcescens* meningitis: epidemiology, prognostic factors and treatment outcomes. *J Microbiol Immunol Infect* **46**: 259-265.
272. **Xavier Anglaret, Emmanuel Mortier. 2002.** *Maladies infectieuses*, 3e éd, Paris.
273. **Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. 2000.** A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 53-56.
274. **Yamamoto T, Ariyoshi A, Amako K. 1985.** Fimbria-mediated adherence of *Serratia marcescens* strain US5 to human urinary bladder surface. *Microbiol Immunol* **29**: 677-681.
275. **Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishio H, Satoh K, Washidu R, Kinoshita S, Aihara M. 2003.** Production of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase and IMP-1 metallo beta-lactamase by five Gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J Antimicrob Chemother* **51**: 631-638.
276. **Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Chuang CL, Wu HM, Lu YJ, Li JD. 2004.** Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in

- Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother* **54**: 1007-1012.
277. **Yang HF, Cheng J, Hu LF, Ye Y, Li JB. 2012.** Plasmid-mediated quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* in China. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 4529-4531.
278. **Yang HF, Cheng J, Zhou X, Zhu YL, Liu YY, Hu LF, Ye Y, Li JB. 2013.** 16S rRNA methylase gene, together with quinolone resistance determinant aac(6)-Ib-cr, in a *Serratia marcescens* isolate from China. *Diagn Microbiol Infect Dis* **76**: 123-124.
279. **Yatsuyanagi J, Saito S, Konno T, Harata S, Suzuki N, Kato J, Amano K. 2006.** Nosocomial outbreak of ceftazidime-resistant *Serratia marcescens* strains that produce a chromosomal AmpC variant with N235K substitution. *Jpn J Infect Dis* **59**: 153-159.
280. **Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009.** Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 5046-5054.
281. **Yoon HJ, Choi JY, Park YS, Kim CO, Kim JM, Yong DE, Lee KW, Song YG. 2005.** Outbreaks of *Serratia marcescens* bacteriuria in a neurosurgical intensive care unit of a tertiary care teaching hospital: a clinical, epidemiologic, and laboratory perspective. *Am J Infect Control* **33**: 595-601.
282. **Yu WL, Wu LT, Pfaller MA, Winokur PL, Jones RN. 2003.** Confirmation of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens*: preliminary report from Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* **45**: 221-224.
283. **Zowawi HM, Harris PN, Roberts MJ, Tambyah PA, Schembri MA, Pezzani MD, Williamson DA, Paterson DL. 2015.** The emerging threat of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in urology. *Nat Rev Urol* **12**: 570-584.

RESUMES

RESUME

L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram-négatif, particulièrement les entérobactéries, représentent un problème majeur de santé publique au niveau mondial.

Cette étude a pour objectifs d'étudier la résistance et le support génétique de la résistance aux antibiotiques de 54 souches de *Serratia marcescens* collectées de Décembre 2011 jusqu'au Aout 2013 visant des souches d'origine hospitalière et communautaire de l'Est algérien.

Les 54 isolats ont été identifiés par la spectrométrie de masse MALDI-TOF et la galerie API 20E, les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été effectués par les méthodes de diffusion de disque et E-test. Les gènes de résistance aux antibiotiques ont été détectés par PCR et séquençage. Le transfert génétique de la résistance aux antibiotiques a été effectué par conjugaison. L'analyse de la clonalité de nos isolats a été vérifiée sur la base d'un arbre phylogénétique construit en utilisant des séquences partielles de quatre gènes codant pour des protéines (*gyrB*, *rpoB*, *infB* et *atpD*) comparée au MALDI-TOF MS clustering. Trente-cinq sur 54 isolats hébergent les gènes de la BLSE: *blaCTX-M-15* (n = 32), *blaTEM -1* (n = 26), *blaTEM-71* (n = 1), *blaSHV-1a* (n = 1) et *blaPER-2* (n = 12). Parmi ces isolats, nous avons pu identifier un groupe de 15 isolats provenant de l'unité d'urologie qui co-héberge les BLSE et la méthyltransférase ARNr 16S armA. La conjugaison des cinq souches sélectionnées montre la transférabilité du plasmide; ces plasmides appartiennent au groupe d'incompatibilité L/M. L'Analyse de la clonalité ainsi que le regroupement MALDI-TOF montrent une épidémie soupçonnée dans l'unité de chirurgie urologique. Nous rapportons ici pour la première fois en Algérie, la co-occurrence de armA méthyltransférase avec BLSE dans les isolats de *S. marcescens* clinique en Algérie.

Finalement la surveillance de la résistance aux antibiotiques et la consommation d'antibiotiques est si nécessaire en toute urgence en Algérie pour éviter la propagation de ces bactéries multirésistantes surtout celles qui sont résistantes aux carbapénèmes.

Mots clés: *Serratia marcescens*, résistance aux antibiotiques, BLSE, 16S ARNr méthyltransférase (armA), clonalité,

Abstract

The spread and the dissémination of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria, especially *Enterobacteriaceae*, is a major public health problem worldwide.

The aim of this study was to evaluate and characterize the genetic support of antibiotic resistance of 54 isolates of *Serratia marcescens* collected from December 2011 to August 2013 from hospital and community strains in Eastern Algeria

The 54 isolates were identified by MALDI-TOF mass spectrometry and API 20E, antibiotic susceptibility testing was performed by disc diffusion and E-test. The antibiotic resistance genes were detected by PCR and sequencing. Gene transfer of antibiotic resistance was carried out by conjugation. The analysis of clonality of our isolates was verified on the basis of a phylogenetic tree constructed using partial sequences of four genes encoding proteins (*gyrB*, *rpoB*, *infB* and *atpD*) and then compared to MALDI-TOF MS clustering. Thirty-five of the 54 isolates yielded a β -lactamase extended spectrum (ESBL) phenotype: *bla**CTX-M-15* (*n* = 32), *bla**TEM-1* (*n* = 26), *bla**TEM-71* (*n* = 1), *bla**SHV-1a* (*n* = 1) and *bla**PER-2* (*n* = 12). Among these isolates, we identified a group of 15 isolates from the urology unit which co-harbored ESBL and 16S rRNA methyltransferase *armA*. The conjugation of five selected strains demonstrates the transferability of the plasmid; these plasmids belong to the incompatibility group L / M. The Clonality Analysis and the MALDI-TOF clustering show a suspected outbreak in the urinary unit. We report for the first time in Algeria, the co-occurrence of *armA* methyltransferase with ESBL in isolates of *S. marcescens* clinical Algeria.

Finally the monitoring of antibiotic resistance and antibiotic consumption is so urgently required in Algeria to prevent the spread of multidrug resistant bacteria especially those resistant to carbapenems

Keywords: *Serratia marcescens*, antibiotic resistance, ESBL, 16S rRNA methyltransferase (*armA*), clonality

ملخص

انتشار المقاومة للمضادات الحيوية في البكتيريا سالبة الجرام، وخاصة المعوية، هي مشكلة صحية عامة رئيسية في جميع أنحاء العالم.

تهدف هذه الدراسة الى تقييم و تمييز الدعم الوراثية لمقاومة المضادات الحيوية للسلاسل السراتية الذابلل 54 سلالة تمّ جمعها من ديسمبر 2011 إلى أغسطس 2013 من المستشفيات والمخابر الخاصة شرق الجزائر.

في البداية تمّ تحديد 54 سلالة من العصيات السراتية الذابلة بواسطة API20E وكذلك عن طريق قياس الطيف الكتلي (MALDI-TOF) وقد اجري اختبار المضادات الحيوية عن طريق قرص الاجار و تحديد الحد الادنى للتركيزات المثبطة بواسطة (E-TEST) و التعرف على الجينات المسؤولة عن المقاومة الحيوية عن طريق البيولوجيا الجزيئية (PCR,Séquençage), بالإضافة الى ذلك تمّ اختبار نقل محددات المقاومة من خلال تجارب اقتران كسلالة متنقلة و اخيرا تمت دراسة العلاقة بين السلالات متعددة المقاومة عن طريق استخدام اربع جينات (gyrB, rpoB infB atpD) ثمّ تمت مقارنتها مع (MALDI .TOF clustering) 35 سلالة من اصل 54 عينة تحمل BLSE وهي:

blaCTX-M-15(n = 32), *blaTEM -1*(n = 26), *blaTEM-71*(n = 1), *blaSHV-1a* (n = 1) و *blaPER-2* (n = 12).

من بين هذه العينات استطعنا تحديد 15 عينة من قسم الجراحة البولية تحمل BLSE و 16S armA. تجارب النقل لخمس عينات اوضحت امكانية نقل البلاسميد. هذه البلاسميدات تنتمي الى المجموعة L/M, تجارب دراسة امكانية انتقال السلالات و MALDI-TOF clustering اوضحت امكانية حصول وباء مستشفيات في وحدة الجراحة البولية ومنه نجد وفي اول مرة في الجزائر تواجد BLSE و 16SarmA في سلالات السراتية الذابلة.

اخيرا وضع سياسة مراقبة للمقاومة للمضادات الحيوية و استهلاكها امر ضروري في الجزائر من اجل تفادي انتشار البكتيريا متعددة المقاومة و خاصة تلك المقاومة ل carbapénèmes

الكلمات المفتاحية: السراتية الذابلة, المقاومة للمضادات الحيوية, (armA), 16SARNr méthylases, BLSE, قابلية التنسيل.

ANNEXES

Annexe1: Tableau récapitulatif sur l'ensemble des résultats obtenus des 35 souches multirésistantes de *S. marcescens*.

Sources	Code	Date d'isolement	Sexe/Age	Service	Origine	Phénotype de résistance aux β-lactamines (a)	gènes détectés	Phénotype de résistance aux aminoglycosides (b)	gènes détectés	Phénotype de résistance aux fluoroquinolone (c)	gènes détectés
EHS/ C n=25	C1	Octobre2011	H/83	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1	CN.TOB	aac61b-cr	CIP.OFX.AN	qnrB42
	C2	Novembre2011	H/30m*	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1,PER-2	CN.TOB.AK	aadA2,armA	-	-
	C3	Décembre.2011	H/1m*	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP	CTX-M-15,TEM-1,PER-2	CN.AK.TOB	aadA2,armA	-	-
	C4	Janvier2012	H/39	Urologie	Urine	ATM.CTX..CRO.FOX .FEP	CTX-M-15,TEM-1	CN.AK .TOB	aadA2,armA	CIP.OFX.AN	-
	C5	Janvier2012	F/35	Urologie	Pus	ATM.CTX.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2,armA	CIP.OFX.AN	-
	C6	Avril2012	H/67	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1	CN.AK.TOB.	aadA2,armA	OFX.AN	-
	C7	Septembre2012	H/75	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP	TEM-71,PER-2	CN.TOB	-	OFX .AN	-
	C8	Septembre2012	H/75	Urologie	Pus	CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1,	CN.AK.TOB	aadA2,armA	CIP.OFX.AN	-
	C9	Septembre2012	F/72	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX .FEP	CTX-M-15,TEM-1	CN.TOB	-	CIP.OFX .AN	-
	C10	Septembre2012	F/68	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX .FEP	CTX-M-15,TEM-1	CN.TOB.AK	aadA2,armA	CIP.OFX.AN	-
	C11	Octobre.2012	H/58	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1	CN.TOB.AK	armA	CIP.OFX.AN	-
	C12	Octobre.2012	H/72	Urologie	Urine	CTX.FOX .FEP	CTX-M-15	TOB	aadA2	OFX .AN	-
	C13	Octobre2012	H/33	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX FEP	CTX-M-15	TOB	-	CIP.OFX .AN	-
	C14	Novembre2012	H/36	Urologie	Urine	CTX.CRO.FOX	TEM-1,PER-2,SHVa2	CN.TOB.AK	-	OFX .AN	-
	C15	Novembre2012	H/26	Urologie	Urine	CTX.FOX	CTX-M-15,PER-2	CN.TOB	aadA1	CIP.OFX.AN	-
	C16	Novembre2012	H/34	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1	CN.TOB	-	CIP.OFX.AN	-
	C17	Novembre2012	F/28	Urologie	Urine	ATM.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1	CN.TOB.AK	armA	CIP.OFX.AN	-
	C18	Novembre2012	F/62	Urologie	Urine	ATM.CTX.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1	TOB	aadA2	CIP.OFX .AN	-
	C19	Novembre2012	H/55	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX	TEM-1,PER-2	CN.AK.TOB	aph(3')VIb	CIP.OFX.AN	qnrA6
C20	Decembre2012	H/5	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO .FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1,	CN.AK.TOB	aadA2,armA	CIP.OFX.AN	-	
C21	Decembre2012	H/12	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2,armA	CIP.OFX.AN	-	
C22	Decembre2012	H/4	Urologie	Pus	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX.FEP	CTX-M-15,TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2,armA	CIP.OFX.AN	qnrB6	
C23	Decembre2012	F/5	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP	CTX-M-15,TEM-1,PER-2	CN.AK.TOB	aadA2,armA	-	-	
C24	Avril2013	H/64	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15,TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2,armA	CIP.OFX.AN	-	
C25	Mai2012	F/4	Urologie	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15,TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2,armA	CIP.OFX.AN	-	
EHP/ S n=3	S1	Février.2013	H/2	Néonatalogie	Pus	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15,TEM-1,PER-2	CN.AK.TOB	aadA2,armA	-	-
	S2	Février 2013	H/2	Néonatalogie	Pus	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15,TEM-1,PER-2	CN.AK.TOB	aadA2,armA	-	-
	S3	Février2013	H/2m*	Néonatalogie	Pus	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15	CN.TOB	aac61b-cr	CIP.OFX.AN	qnrB42
Communautaire A n=7	A1	Mars2012	H/58	Communautaire	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15,PER-2	CN.TOB	aac61b-cr	CIP .AN	-
	A2	Mars2012	H/60	Communautaire	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FEP.FOX	CTX-M-15,TEM-1,PER-2	CN.TOB	aac61b-cr,aadA1	-	-
	A3	Juin2012	F/50	Communautaire	Urine	ATM.CTX.CRO..FEP.FOX	CTX-M-15,TEM-1	CN.AK.TOB	-	-	-
	A4	Aout2012	H/66	Communautaire	Urine	ATM.CTX.CRO..FEP.FOX	CTX-M-15,PER-2	CN.AK.TOB	-	CIP.OFX.AN	-
	A5	Janvier2013	F/45	Communautaire	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX	CTX-M-15,	CN.TOB	aac61b-cr	CIP.OFX.AN	qnrB42
	A6	Mars2013	F/40	Communautaire	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX	CTX-M-15	CN.AK.TOB	aadA2,ArmA	OFX .AN	-
	A7	Avril2013	F/65	Communautaire	Urine	ATM.CTX.CAZ.CRO.FOX	CTX-M-15,TEM-1	CN.AK.TOB	aac61b-cr,ArmA	CIP.OFX.AN	-

(a):CTX:Cefotaxime,CAZ:Ceftazidime, ATM :Aztreonam, CRO:Ceftriaxone, (b) :CN :Gentamicine,AK :Amikacine ,TOB :Tobramycine,(c) :CIP:Ciprofloxacine, OFX:Ofloxacine

m*: Mois, F: Femme, H: Homme, EHS : établissement hospitalier spécialisé, EHP : établissement hospitalier public.

ANNEXE 2

Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing armA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria.

Batah Rima, Loucif Lotfi, Olaitan Abiola Olumuyiwa, Boutefnouchet Nafissa, Allag Hamoudi, and Rolain Jean-Marc. Microbial Drug Resistance. August 2015, 21(4): 470-476. doi:10.1089/mdr.2014.0240.

Published in Volume: 21 Issue 4: July 22, 2015

Online Ahead of Print: April 17, 2015

Nom du journal : **Microbial Drug Resistance**

Pays du journal: **Etats-Unis**

Latest Impact Factor* is 2.490

*2014 Journal Citation Reports® published by Thomson Reuters, 2015

Editor: Alexander Tomasz, PhD ISSN: 1076-6294 • Published Bimonthly • Online ISSN: 1931-8448 Published Bimonthly

Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria

Rima Batah,^{1,2} Lotfi Loucif,^{1,3} Abiola Olumuyiwa Olaitan,¹ Nafissa Boutefnouchet,² Hamoudi Allag,⁴ and Jean-Marc Rolain¹

Serratia marcescens is one of the most important pathogens responsible for nosocomial infections worldwide. Here, we have investigated the molecular support of antibiotic resistance and genetic relationships in a series of 54 *S. marcescens* clinical isolates collected from Eastern Algeria between December 2011 and July 2013. The 54 isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS). Antibiotic susceptibility testing was performed by disc diffusion and *E*-test methods. Antibiotic resistance genes were detected by polymerase chain reaction (PCR). The genetic transfer of antibiotic resistance was performed by conjugation using azide-resistant *Escherichia coli* J53 as the recipient strain, and plasmid analysis was done by PCR-based replicon typing. The relatedness of our isolates was determined by phylogenetic analysis based on partial sequences of four protein-encoding genes (*gyrB*, *rpoB*, *infB*, and *atpD*) and then compared to MALDI-TOF MS clustering. Thirty-five out of 54 isolates yielded an extended-spectrum β -lactamase (ESBL) phenotype and carried *bla*_{CTX-M-15} ($n=32$), *bla*_{TEM-1} ($n=26$), *bla*_{TEM-71} ($n=1$), *bla*_{SHV-1a} ($n=1$), and *bla*_{PER-2} ($n=12$). Among these isolates, we identified a cluster of 15 isolates from a urology unit that harbored ESBL and the 16S rRNA methyltransferase *armA*. Conjugation was successful for five selected strains, demonstrating the transferability of a conjugative plasmid of incompatibility group *incL/M* type. Phylogenetic analysis along with MALDI-TOF clustering likely suggested an outbreak of such isolates in the urology unit. In this study, we report for the first time the co-occurrence of *armA* methyltransferase with ESBL in *S. marcescens* clinical isolates in Eastern Algeria.

Introduction

SERRATIA MARCESCENS is a gram-negative rod-shaped bacterium that belongs to the Enterobacteriaceae family. Some strains of *S. marcescens* produce a red to dark pink pigmentation called prodigiosin that can easily facilitate identification.¹⁵ While *S. marcescens* was once considered as a harmless saprophyte,¹⁸ it is now recognized as an important emerging opportunistic pathogen associated with nosocomial infections, including wound infections, urinary tract infections, respiratory tract infections, and bacteremia.^{23,42} The infections have been reported with increasing frequency, especially in the intensive care units.⁴² The first report of detection of nosocomial infections caused by this organism was in 1951 at the Stanford University Hospital.⁴³ Outbreaks can be attributed to

different sources, including contamination of disinfectant solutions, soaps, mechanical respirators, hand-to-hand transmission,^{4,11} and cystoscopes.³⁰

S. marcescens often exhibits multiple mechanisms of resistance.^{23,37,39} Moreover, carbapenemase-encoding genes have recently been described, including class A β -lactamases (KPC and SME) and class B β -lactamases (IMP and VIM).¹⁷ β -Lactams are usually used for treating severe infections in association with aminoglycosides.⁴⁵ Recently, the increased frequency of resistance of Enterobacteriaceae to aminoglycosides, mediated by the production of enzymes that modify the antibiotics by adenylation, phosphorylation, or acetylation, has been described worldwide.⁹ Methylation of the 16S ribosomal RNA (rRNA) has emerged as a resistance mechanism to aminoglycosides in Enterobacteriaceae, including *S. marcescens*.¹²

¹Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE), UM 63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1905, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de la Méditerranée, Marseille, France.

²Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée, Département de Biochimie, Université Badji Mokhtar Annaba, Annaba, Algeria.

³Laboratoire de Biotechnologie des Molécules Bioactives et de la Physiopathologie Cellulaire, Université El Hadj Lakhdar, Batna, Algeria.

⁴Laboratoire de Bactériologie, Clinique Rénale Daksi Constantine, Constantine, Algeria.

Several cases of outbreaks due to this bacterium and these mechanisms of resistance have been described worldwide.^{6,7,17,28} However, in Algeria, only one study reported an outbreak involving extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). This incident was caused by 14 *S. marcescens* infections in the urology ward: 12 isolates contained *bla*_{CTX-M}, and the remaining 2 isolates carried both *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM}.³⁰ Furthermore, there has been only one recent report describing an *armA* methyltransferase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Algeria.¹ *S. marcescens* has a natural resistance to many antibiotics, including colistin.³⁸ The prevention of the emergence of this pathogen and the optimization of the consumption of colistin should be taken into consideration to prevent the spread and selection of this organism.

S. marcescens infection can cause mortality, especially following the use of colistin as the last therapeutic option to treat infection caused by organisms producing carbapenemases, such as *Acinetobacter baumannii*.²⁷ In the present study, our aim was to investigate the molecular mechanism of antibiotic resistance and a possible outbreak involving *S. marcescens* clinical isolates from Eastern Algeria.

Materials and Methods

Bacterial strains and identification

Between December 2011 and July 2013, a total of 54 consecutive and nonduplicate clinical isolates of *S. marcescens* were recovered from Eastern Algeria. All isolates were grown on MacConkey agar (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated at 37°C for 18–24 hr. Strains were identified using the API 20E system (Biomerieux) and confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) performed with a Bruker Daltonics Microflex using 96 spot polished-steel targets.²

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing was performed by the disc diffusion method on Mueller-Hinton agar (Biomerieux) as recommended by the committee of the French Society for Microbiology (CA-SFM) 2013 Guidelines. Sixteen antibiotics were used: amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ceftriaxone, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, aztreonam, imipenem, amikacin, tobramycin, gentamicin, ciprofloxacin, ofloxacin, colistin, and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a reference strain. The ESBL phenotype was detected by using the double disc synergy test as previously described.²⁵ Minimum inhibitory concentrations (MICs) for cefotaxime, ceftazidime, amikacin, and ciprofloxacin were determined using the *E*-test.

Screening for antibiotic resistance encoding genes

DNA was extracted using the EZ1 Advanced XL Extractor, DNA Bacteria Card, and the EZ1[®] DNA Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was conducted to detect ESBL-encoding genes targeting *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV},^{13,21,44} *bla*_{PER}, *bla*_{GES}, and *bla*_{VEB},²⁶ as well as aminoglycoside-modifying enzyme-encoding genes, including *aac(3)-Ia*, *aac(6)-Ib*, *aph(3')VI*,³¹ *ant(2'')-I*,²⁰ *aadA*,¹ genes coding for 16S rRNA methyltransferase *armA*,²⁰ and fluoroquinolones *qnrA* and *qnrB*.⁴¹ The cycling parameters

included 15 min of denaturation at 95°C, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 55°C for 50 sec, and extension at 72°C for 1 min and 30 sec before ending with a final extension period of 72°C for 7 min. The PCR products were examined under UV light after electrophoresis in a 1.5% agarose gel.

PCR products were purified and sequenced using BigDye terminator chemistry on an automated ABI 3130 Sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA) based on the Sanger's sequencing method. Analysis of the obtained sequences was performed using Sequencher Aligner 4.1.4. The antibiotic resistance genes (ARGs) were blasted against ARG-ANNOT database.¹⁶

Conjugation experiment and plasmid analysis

Conjugation was conducted to verify the transferability of a putative plasmid of *S. marcescens*. Five isolates producing *armA* were chosen as donors. The *E. coli* J53 azide-resistant strain was used as the recipient strain.¹ Both donor and recipient strains were cultivated in tubes containing 9 ml of Trypticase Soy Broth (Becton Dickinson and Company, Pont de Claix, France). At the exponential growth phase, 1 ml of the donor strain was transferred to the recipient strain and incubated for 24 hr. Transconjugated clones were selected after cultivation on Luria-Bertani agar (Becton Dickinson and Company) containing ceftriaxone (20 μ g/ml) and azide (100 μ g/ml) and then identified using MALDI-TOF MS. An *E*-test was performed to determine the MICs of the transconjugants before verification of the presence of antimicrobial resistance genes by PCR amplification as described above.

To characterize the plasmids transferred to the transconjugants, total DNA was extracted from transconjugants and the plasmids were identified based on their incompatibility group using the PCR replicon typing method as previously described.⁵

Phylogenetic analysis

Due to the unavailability of a standard *S. marcescens* multi-locus sequencing typing scheme, in this study, we selected four housekeeping genes (*gyrB*, *rpoB*, *infB*, and *atpD*) to determine the relationships between our isolates; amplification and sequencing were performed using primers retrieved from a previous study on multilocus sequencing analysis as described.³ The obtained sequences were concatenated, aligned with ClustalW, and then a phylogenetic tree was constructed using MEGA6 software.⁴⁰ The generated phylogenetic clustering tree was then compared to the MSP dendrogram constructed using MALDI-TOF spectra of *S. marcescens* isolates through Biotyper 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Results

Bacterial strains and identification

The 54 strains collected during this study between December 2011 and July 2013 were correctly identified by MALDI-TOF MS, with scores ranging from 1.9 to 2.3 (Fig. 1). *S. marcescens* isolates were collected from hospitals and private laboratories, including 87% collected from urine samples and 13% from pus. A total of 30 out of 54 strains produced a dark red pigmentation (prodigiosin). The distribution of *S. marcescens* according to patient sex, age, ward, and hospital is presented in Table 1.

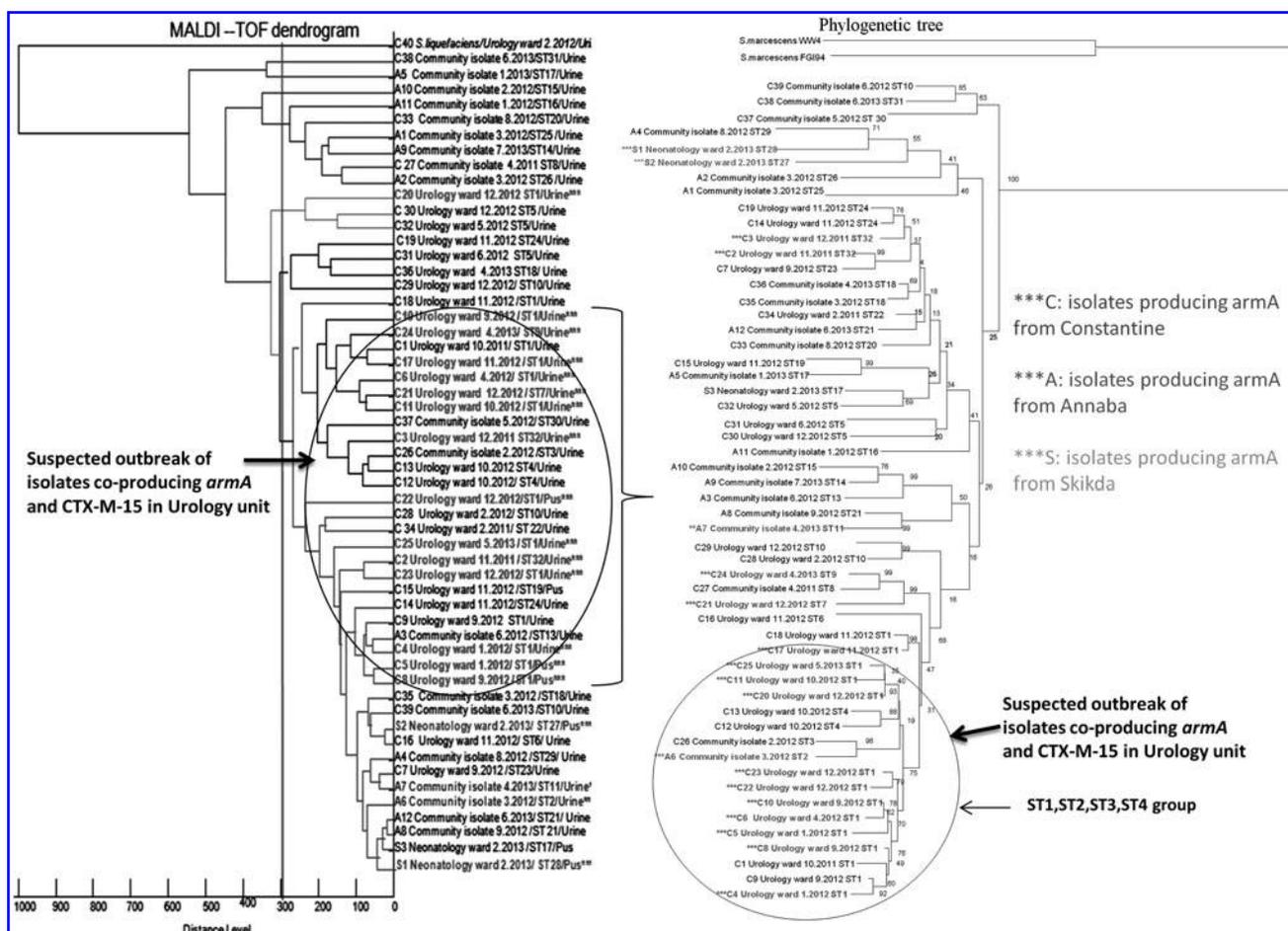


FIG. 1. MALDI-TOF dendrogram and phylogenetic tree of phylogenetic analysis of 54 isolates of *Serratia marcescens*. MSP dendrogram (left panel) was constructed using MALDI-TOF spectra of *S. marcescens* isolates through Biotyper 3.0 software and an arbitrary distance value of 300 was considered for clustering isolates. Phylogenetic tree of concatenated sequences of the multilocus sequence typing analysis (right panel) was constructed using MEGA6 software with bootstrap values of 1,000 replicates. **isolates harboring *armA*. MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight.

Antimicrobial susceptibility testing

A total of 35 out of 54 isolates of *S. marcescens* were resistant to antibiotics (65%), especially amoxicillin/clavulanic acid (100%), cefotaxime (67%), and ceftazidime (57%). MICs for ceftazidime and cefotaxime ranged from 4 to 32 $\mu\text{g/ml}$ and from 12 to 256 $\mu\text{g/ml}$, respectively. High levels of resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides were detected: 61% for gentamicin and 39% for amikacin. Twenty-four isolates were resistant to fluoroquinolones (44%), with MICs ranging from 1 to 256 $\mu\text{g/ml}$. Twenty-one pigmented isolates (39%) presented a multidrug resistance phenotype. None of the strains was resistant to imipenem (Table 2).

Screening of resistance genes

We found that 35 out of 54 resistant isolates harbored *bla*_{CTX-M-15} ($n=32$), *bla*_{TEM-1} ($n=26$), *bla*_{TEM-71} ($n=1$), *bla*_{SHV-1a} ($n=1$), and *bla*_{PER-2} ($n=12$). None of the isolates harbored *bla*_{VEB} or *bla*_{GES}. Twenty-eight isolates presented at least one gene for resistance to aminoglycosides, including *aadA2* ($n=18$), *aadA1* ($n=2$), *armA* ($n=19$), *aa-*

c6Ib-cr ($n=6$), and *aph(3')**VIIb* ($n=1$). Finally, five isolates contained *qnr* genes: *qnrB42* ($n=3$), *qnrB6* ($n=1$), and *qnrA6* ($n=1$). Resistance profiles and ARGs of the *S. marcescens* isolates are summarized in Table 1.

Transferability and plasmid analysis

Conjugation was successful for five pigmented microbial drug resistant isolates. The antibiotic resistance profile of transconjugants corresponded to the profile of the donor. MICs of transconjugants for amikacin, gentamicin, and cefotaxime were $>256 \mu\text{g/ml}$. The presence of ARGs was verified for all transconjugants by PCR amplification as described above. As expected, the isolates contained *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1}, *aadA2*, and *armA*.

All the transconjugants tested positive for *incL/M* plasmid type indicating that cephalosporin and aminoglycoside resistance genes were localized on *incL/M* plasmid.

Phylogenetic analysis and MALDI-TOF MS clustering

A phylogenetic tree was constructed to determine relatedness between isolates based on the concatenated sequence

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF ESBL-PRODUCING AMINOGLYCOSIDE-MODIFYING ENZYMES AND QUINOLONE IN *SERRATIA MARCESCENS*

Sources	Code	Date of isolation	Sex/age	Department	Sample origin	β -Lactamase resistance pattern	bla Genes detected	Aminoglycoside resistance pattern	Aminoglycoside genes detected	Fluoroquinolone resistance pattern	Quinolone genes detected	
Hospital C (n=25)	C1	October 2011	M/83	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.TOB	aac61b-cr	CIP.OFX	qnrB42	
	C2	November 2011	M/30 months	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1, PER-2	CN.TOB, AK	aadA2, armA	—	—	
	C3	December 2011	M/1 month	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1, PER-2	CN.AK.TOB	aadA2, armA	—	—	
	C4	January 2012	M/39	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CRO	CTX-M-15, TEM-1	TOB.AK.TOB	aadA2, armA	CIP.OFX	—	
	C5	January 2012	F/35	Urology	Pus	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2, armA	CIP.OFX	—	
	C6 ^a	April 2012	M/67	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.AK.TOB, CN.TOB	—	—	—	—
	C7	September 2012	M/75	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	TEM-71, PER-2	CN.TOB	—	—	—	—
	C8 ^a	September 2012	F/75	Urology	Pus	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2, armA	CIP.OFX	—	—
	C9	September 2012	F/72	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.TOB	—	—	—	—
	C10	September 2012	F/68	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.TOB.AK	aadA2, armA	CIP.OFX	—	—
	C11	October 2012	M/58	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.TOB.AK	armA	CIP.OFX	—	—
	C12	October 2012	M/72	Urology	Urine	AMC.CTX	CTX-M-15	TOB	aadA2	OFX	—	—
	C13	October 2012	M/33	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15	TOB	—	—	—	—
	C14	November 2012	M/36	Urology	Urine	AMC.CTX.ATM.CRO	TEM-1, PER-2, SHV _{a2}	CN.TOB.AK	—	—	—	—
	C15	November 2012	M/26	Urology	Urine	AMC.CTX	CTX-M-15, PER-2	CN.TOB	aadA1	CIP.OFX	—	—
	C16	November 2012	M/34	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.TOB	—	—	—	—
	C17	November 2012	F/28	Urology	Urine	CTX.CAZ.ATM.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.TOB.AK	armA	CIP.OFX	—	—
	C18	November 2012	F/62	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CRO	CTX-M-15, TEM-1	TOB	aadA2	CIP.OFX	—	—
	C19	November 2012	M/55	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	TEM-1, PER-2	CN.AK.TOB	aph(3')VIIb	CIP.OFX	qnrA6	—
	C20 ^a	December 2012	M/5	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2, armA	CIP.OFX	—	—
	C21 ^a	December 2012	M/12	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2, armA	CIP.OFX	—	—
	C22	December 2012	M/4	Urology	Pus	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2, armA	CIP.OFX	—	—
	C23	December 2012	F/5	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1, PER-2	CN.AK.TOB	aadA2, armA	CIP.OFX	—	—
	C24 ^a	April 2013	M/64	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2, armA	CIP.OFX	—	—
	C25	May 2012	F/4	Urology	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.AK.TOB	aadA2, armA	CIP.OFX	—	—
Hospital S (n=3)	S1	February 2013	M/2	Neonatology	Pus	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1, PER-2	CN.AK.TOB	aadA2, armA	—	—	
	S2	February 2013	M/2	Neonatology	Pus	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1, PER-2	CN.AK.TOB	aadA2, armA	—	—	
	S3	February 2013	M/2 months	Neonatology	Pus	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15	CN.TOB	aac61b-cr	CIP.OFX	qnrB42	
Community isolates A (n=7)	A1	March 2012	M/58	Private laboratory	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, PER-2	CN.TOB	aac61b-cr	CIP	—	
	A2	March 2012	M/60	Private laboratory	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1, PER-2	CN.TOB	aac61b-cr, aadA1	—	—	
	A3	June 2012	F/50	Private laboratory	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.AK.TOB	—	—	—	
	A4	August 2012	M/66	Private laboratory	Urine	AMC.ATM.CTX.CRO	CTX-M-15, PER-2	CN.AK.TOB	—	—	—	
	A5	January 2013	F/45	Private laboratory	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15	CN.TOB	aac61b-cr	CIP.OFX	qnrB42	
	A6	March 2013	F/40	Private laboratory	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15	CN.AK.TOB	aadA2, ArmA	OFX	—	
	A7	April 2013	F/65	Private laboratory	Urine	AMC.ATM.CTX.CAZ.CRO	CTX-M-15, TEM-1	CN.AK.TOB	aac61b-cr, ArmA	CIP.OFX	—	

AK, amikacin; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; CRO, ceftriaxone; CTX, cefotaxime; CN, gentamicin; ESBL, extended-spectrum β -lactamase; F, female; M, male; OFX, ofloxacin; TOB, tobramycin.

^aIsolates that have been conjugated in *Escherichia coli* J53.

TABLE 2. RESISTANCE RATES OF 54 ISOLATES OF *SERRATIA MARCESCENS*

Antimicrobial agent	Resistance rate (%)		
	Hospital Constantine	Hospital Skikda	Community isolates
	n=39	n=3	n=12
Amoxicillin/clavulanic acid	100	100	100
Aztreonam	77	100	100
Cefotaxime	64.1	100	58.3
Ceftazidime	59	100	58.3
Cefepime	56.4	100	58.3
Ceftriaxone	61.5	100	58.3
Gentamicin	53.8	100	58.3
Tobramycin	64.1	100	58.3
Amikacin	38.5	66.7	41.7
Ciprofloxacin	51.3	33.3	33.3
Ofloxacin	53.8	33.3	33.3
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	64.1	100	50
Colistin	100	100	100
Imipinem	0	0	0

of the four housekeeping genes (*gyrB*, *atpD*, *rpoB*, and *infB*) (Fig. 1). We found 32 different groups, one of these refers to a group with a single locus different among isolates being associated with isolates harboring *armA* in the urology unit from Constantine between October 2011 and March 2013. Interestingly, this group corresponds to a cluster obtained in the MALDI-TOF dendrogram at the arbitrary distance value of 300 (Fig. 1).

Discussion

Dissemination of natural and acquired resistance to antibiotics in *S. marcescens* strains, especially combined resistance to ESBL and aminoglycosides, has become a remarkable concern worldwide.^{25,29,30} Fifty-four *S. marcescens* isolates from private laboratories and clinical isolates were recovered between December 2011 and July 2013 and used in an epidemiological study. We found a high percentage of resistance to β -lactams and aminoglycosides, mainly due to the presence of ESBL and aminoglycoside-modifying enzyme-encoding genes. Twenty-eight out of 54 isolates (52%) from urine samples exhibited the ESBL phenotype, in agreement with previous studies showing a relationship between ESBL and urinary tract infections.^{14,30} This percentage was higher than the results previously reported in Algeria by Nedjai *et al.*,³⁰ who showed a prevalence of *bla*_{CTX-M} (7%) and *bla*_{TEM} (1%) in clinical isolates from a urology ward at Annaba in 2009 due to urinary tract infections.³⁰

In our study, we confirmed that the resistance to β -lactams was mainly due to the presence of *bla*_{CTX-M-15}, a resistance gene previously reported in Algeria in *S. marcescens*.³⁰ In our study, we report the detection of the *bla*_{PER-2}-encoding gene, conferring the ESBL phenotype for the first time in Algeria and Africa. We identified the *bla*_{TEM-71} gene that was detected for the first time in *S. marcescens* and was previously reported in *K. pneumoniae* in Spain.³⁵

To the best of our knowledge, we report for the first time the presence of *armA* in *S. marcescens* in Algeria; this gene had only been previously reported in *K. pneumoniae* in Algeria¹ and was associated with ESBL-encoding genes

localized on a transferable plasmid, described in *S. marcescens* isolates in Japan and Korea.^{12,33,34} All transconjugants were found to be positive for *incL/M* plasmid type indicating that cephalosporin and aminoglycoside resistance genes were localized on *incL/M* plasmid, as already observed by Park *et al.* in Korea.³³ In addition to *armA* found in our study, we detected other aminoglycoside resistance genes: *aadA2* (*n*=18), *aadA1* (*n*=2), *aac6Ib-cr* (*n*=6), and *aph(3')VIIb* (*n*=1). However, seven strains were resistant to aminoglycosides without resistance genes detected and that will require further investigation.

Although the phylogenetic techniques used in this study are not validated in this genus, concordance between the cluster found by MALDI-TOF and phylogenetic analysis likely suggests the occurrence of a possible outbreak in the urology unit in Constantine between October 2011 and March 2013, as demonstrated by the two typing methods. However, one of the limitations of this study is the absence of a validated tool such as pulsed-field gel electrophoresis to eventually confirm the suspected outbreak. Besides this, several outbreaks of *S. marcescens* infections have been reported worldwide, including Italy, Japan, the United States, and Argentina.^{6,12,24,27}

MALDI-TOF MS is increasingly used as the main tool for species identification.^{2,10} Currently, some studies are focused on whether it is possible to use MALDI-TOF MS as a discriminatory tool for typing.^{8,32,36} We believe the possible outbreak that occurred in this urology unit could be due to either patient-to-patient transmission or to the contamination of equipments such as the cystoscope, as previously reported in another study in Algeria.³⁰

This correlation suggests that MALDI-TOF MS can represent a promising tool for genotyping *S. marcescens* clinical isolates in real time and for infection control of outbreaks within hospitals, as has been confirmed for many other isolates, such as *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, and *K. pneumoniae*.^{2,8,19,32} In contrast, some studies have reported a lack of correlation between MALDI-TOF MS and genotyping for some bacterial strains.^{22,36} This discrepancy may be based on differences in the principle of each technique.²

In conclusion, we report for the first time the co-occurrence of armA methyltransferase with ESBL in *S. marcescens* clinical isolates linked to a suspected outbreak in the urology unit in Eastern Algeria.

Acknowledgments

We are very grateful to Linda Hadjadj for technical assistance. We thank the Journal for the English language assistance.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Belbel, Z., H. Chettibi, M. Dekhil, A. Ladjama, S. Nedjai, and J.M. Rolain. 2014. Outbreak of an armA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital. *Microb. Drug Resist.* **20**:310–315.
2. Berrazeg, M., S.M. Diene, M. Drissi, M. Kempf, H. Richet, L. Landraud, and J.M. Rolain. 2013. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One* **8**:e61428.
3. Brady, C., I. Cleenwerck, S. Venter, M. Vancanneyt, J. Swings, and T. Coutinho. 2008. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Syst. Appl. Microbiol.* **31**:447–460.
4. Buffet-Bataillon, S., V. Rabier, P. Betremieux, A. Beuchee, M. Bauer, P. Pladys, G.E. Le, M. Cormier, and A. Jolivet-Gougeon. 2009. Outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: contaminated unmedicated liquid soap and risk factors. *J. Hosp. Infect.* **72**:17–22.
5. Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K.L. Hopkins, and E.J. Threlfall. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* **63**: 219–228.
6. Casolari, C., M. Pecorari, C.E. Della, S. Cattani, C. Venturelli, G. Fabio, S. Tagliazucchi, G.F. Serpini, M. Migaldi, P. Marchegiano, F. Rumpianesi, and F. Ferrari. 2013. *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: two long-term multiclonal outbreaks in a 10-year observational study. *New Microbiol.* **36**:373–383.
7. Chiang, P.C., T.L. Wu, A.J. Kuo, Y.C. Huang, T.Y. Chung, C.S. Lin, H.S. Leu, and L.H. Su. 2013. Outbreak of *Serratia marcescens* postsurgical bloodstream infection due to contaminated intravenous pain control fluids. *Int. J. Infect. Dis.* **17**:e718–e722.
8. Christner, M., M. Trusch, H. Rohde, M. Kwiatkowski, H. Schluter, M. Wolters, M. Aepfelbacher, and M. Hentschke. 2014. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*. *PLoS One* **9**:e101924.
9. Davis, M.A., K.N. Baker, L.H. Orfe, D.H. Shah, T.E. Besser, and D.R. Call. 2010. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2666–2669.
10. Dieckmann, R., R. Helmuth, M. Erhard, and B. Malorny. 2008. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:7767–7778.
11. Dodson, W.H. 1968. *Serratia marcescens* septicemia. *Arch. Intern. Med.* **121**:145–150.
12. Doi, Y., K. Yokoyama, K. Yamane, J. Wachino, N. Shibata, T. Yagi, K. Shibayama, H. Kato, and Y. Arakawa. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:491–496.
13. Edelstein, M., M. Pimkin, I. Palagin, I. Edelstein, and L. Stratchounski. 2003. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3724–3732.
14. Essack, S.Y. 2000. Laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs)—the need for a reliable, reproducible method. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **37**: 293–295.
15. Giri, A.V., N. Anandkumar, G. Muthukumar, and G. Pennathur. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol.* **4**:11.
16. Gupta, S.K., B.R. Padmanabhan, S.M. Diene, R. Lopez-Rojas, M. Kempf, L. Landraud, and J.M. Rolain. 2014. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**:212–220.
17. Haifei Yang, J. Cheng, Y. Zhul, J. Lil, and L. Hul. 2012. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens*. *Afr. J. Microbiol. Res.* **6**:4427–4437.
18. Hejazi, A., H.M. Aucken, and F.R. Falkiner. 2000. Epidemiology and susceptibility of *Serratia marcescens* in a large general hospital over an 8-year period. *J. Hosp. Infect.* **45**:42–46.
19. Honisch, C., Y. Chen, C. Mortimer, C. Arnold, O. Schmidt, D. van den Boom, C.R. Cantor, H.N. Shah, and S.E. Gharbia. 2007. Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:10649–10654.
20. Kim, J.Y., Y.J. Park, H.J. Kwon, K. Han, M.W. Kang, and G.J. Woo. 2008. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**:479–483.
21. Kruger, T., D. Szabo, K.H. Keddy, K. Deeley, J.W. Marsh, A.M. Hujer, R.A. Bonomo, and D.L. Paterson. 2004. Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4263–4270.
22. Lasch, P., C. Fleige, M. Stammler, F. Layer, U. Nubel, W. Witte, and G. Werner. 2014. Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Microbiol. Methods* **100**:58–69.
23. Mahlen, S.D. 2011. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**: 755–791.
24. Maragakis, L.L., A. Winkler, M.G. Tucker, S.E. Cosgrove, T. Ross, E. Lawson, K.C. Carroll, and T.M. Perl. 2008. Outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens*

- infection in a neonatal intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**:418–423.
25. Markovska, R.D., T.J. Stoeva, K.D. Bojkova, and I.G. Mitov. 2014. Epidemiology and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* spp., *Pantoea agglomerans*, and *Serratia marcescens* isolates from a Bulgarian hospital. *Microb. Drug Resist.* **20**:131–137.
 26. Melano, R., A. Corso, A. Petroni, D. Centron, B. Orman, A. Pereyra, N. Moreno, and M. Galas. 2003. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:36–42.
 27. Merkier, A.K., M.C. Rodriguez, A. Togneri, S. Brengi, C. Osuna, M. Pichel, M.H. Cassini, and D. Centron. 2013. Outbreak of a cluster with epidemic behavior due to *Serratia marcescens* after colistin administration in a hospital setting. *J. Clin. Microbiol.* **51**:2295–2302.
 28. Nastro, M., R. Monge, J. Zintgraff, L.G. Vaulet, M. Boutureira, A. Famiglietti, and C.H. Rodriguez. 2013. First nosocomial outbreak of VIM-16-producing *Serratia marcescens* in Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**:617–619.
 29. Naumiuk, L., A. Baraniak, M. Gniadkowski, B. Krawczyk, B. Rybak, E. Sadowy, A. Samet, and J. Kur. 2004. Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in two hospitals in Gdansk, Poland, over a 5-year period. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3108–3116.
 30. Nedjai, S., A. Barguigua, N. Djahmi, L. Jamali, K. Zerouali, M. Dekhil, and M. Timinouni. 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Med. Mal. Infect.* **42**:20–29.
 31. Noppe-Leclercq, I., F. Wallet, S. Haentjens, R. Courcol, and M. Simonet. 1999. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res. Microbiol.* **150**:317–322.
 32. Novais, A., C. Sousa, C.J. de Dios, A. Fernandez-Olmos, J. Lopes, H. Ramos, T.M. Coque, R. Canton, and L. Peixe. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**:1391–1399.
 33. Park, Y.J., S.Y. Kim, J.K. Yu, S.I. Kim, Y. Uh, S.G. Hong, L. Jongwook, and H.S. Kwak. 2009. Spread of *Serratia marcescens* cohabiting aac(6′)-Ib-cr, bla CTX-M, armA, and bla OXA-1 carried by conjugative IncL/M type plasmid in Korean hospitals. *Microb. Drug Resist.* **15**:97–102.
 34. Park, Y.J., S. Lee, J.K. Yu, G.J. Woo, K. Lee, and Y. Arakawa. 2006. Co-production of 16S rRNA methylases and extended-spectrum beta-lactamases in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:907–908.
 35. Rasheed, J.K., G.J. Anderson, A.M. Queenan, J.W. Biddle, A. Oliver, G.A. Jacoby, K. Bush, and F.C. Tenover. 2002. TEM-71, a novel plasmid-encoded, extended-spectrum beta-lactamase produced by a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2000–2003.
 36. Sachse, S., S. Bresan, M. Erhard, B. Edel, W. Pfister, A. Saupe, and J. Rodel. 2014. Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of beta-lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **80**:267–271.
 37. Sleight, J.D. 1983. Antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)* **287**:1651–1653.
 38. Stock, I., T. Grueger, and B. Wiedemann. 2003. Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens* sensu stricto, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:35–47.
 39. Su, P.A., L.T. Wu, K.C. Cheng, W.C. Ko, Y.C. Chuang, and W.L. Yu. 2010. Screening extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* using antibiogram-based methods. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **43**:26–34.
 40. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipksi, and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**:2725–2729.
 41. Touati, A., L. Brasse, S. Benallaoua, A. Gharout, J. Madoux, and C.C. De. 2008. First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **60**:287–290.
 42. Ulu-Kilic, A., O. Parkan, S. Ersoy, D. Koc, D. Percin, O. Onal, G. Metan, and E. Alp. 2013. Outbreak of post-operative empyema caused by *Serratia marcescens* in a thoracic surgery unit. *J. Hosp. Infect.* **85**:226–229.
 43. Wheat, R.P., A. Zuckerman, and L.A. Rantz. 1951. Infection due to chromobacteria; report of 11 cases. *AMA Arch. Intern. Med.* **88**:461–466.
 44. Yagi, T., H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, and Y. Arakawa. 2000. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**:53–56.
 45. Yang, H.F., J. Cheng, X. Zhou, Y.L. Zhu, Y.Y. Liu, L.F. Hu, Y. Ye, and J.B. Li. 2013. 16S rRNA methylase gene, together with quinolone resistance determinant aac(6′)-Ib-cr, in a *Serratia marcescens* isolate from China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **76**:123–124.

Address correspondence to:

Jean-Marc Rolain, PharmD, PhD

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et
Tropicales Emergentes (URMITE)

UM 63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1905

IHU Méditerranée Infection

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Université de la Méditerranée

27 Bd J Moulin

Marseille 13005

France

E-mail: jean-marc.rolain@univ-amu.fr