



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de BEJAIA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie
Moléculaire et Médicale

Thème

**Etude des phénotypes de résistance aux
 β -lactamines des souches de *Serratia sp.* et
de *Stenotrophomonas maltophilia* isolées
du CHU Hussein Dey (Parnet, Alger)**

Réalisé par :

M^{lle} AIT HATRIT Saliha

M^{lle} IDIRI Chafia

Membres de jury :

Président : Dr TOUATI A.

Promotrice : M^{lle} YANAT B.

Examineurs : M^{me} GHAROUT A.

M^{me} ZENATI K.

Promotion 2013



Remerciements

Nous remercions tout d'abord notre Bon Dieu ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la patience pour mener à terme ce travail.

Nous tenons à remercier profondément notre promotrice M^{elle} YANAT B. pour nous avoir dirigée tout le long de notre stage sans relâche et aussi durant tout le cursus universitaire.

Nous remercions les membres de jury : Dr TOUATI, Mme GHAROUT et Mme ZENATI.

Nous remercions également le chef de service de l'hôpital d'AMIZOUR M^r ABDELLI pour sa gentillesse et son aide précieuse, ainsi que tout le personnel du laboratoire.

Nos reconnaissances à toute l'équipe de M^r TOUATI A. pour leurs conseils et leurs esprits scientifiques.



Dédicaces

*En ce moment charnière de ma vie,
Je tiens à dédier ce modeste travail :*

A mes très chers parents,

*Symbole de reconnaissance et de remerciement pour tout ce
qu'ils m'ont donné dans ma vie.*

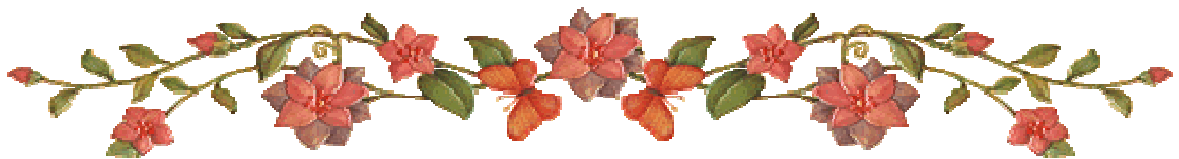
A mes très chers frères et sœurs

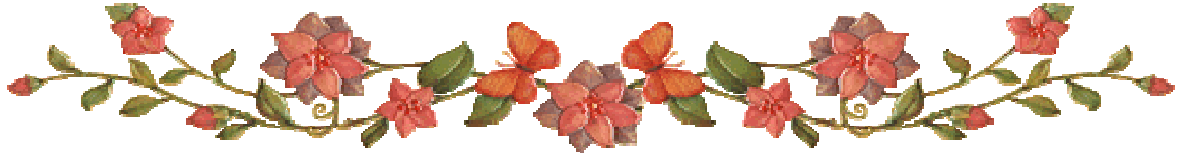
A toute ma famille

A ma promotrice

A tous mes amis et camarades

Saliha





Dédicaces

Je dédie ce travail

A

*Mes très chers parents, mes grands parents, mon mari et
mes beaux parents pour m'avoir encouragé et soutenu*

durant toutes mes études

Mes frères et sœurs adorés

Toute ma famille sans exception

Ma promotrice

Ainsi à tous mes amis.

Chafia



Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Problématique..... 01

Partie I : Matériel & méthodes

I.	Souches bactériennes	06
II.	Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	07
	II.1. Antibiogramme standard	07
	II.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	09
III.	Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines	10
	III.1. Recherche de BLSE	10
	III.1.1. Test de synergie (DD-Test).....	10
	III.1.2. Test de synergie sur gélose à la cloxacilline	11
	III.2. Recherche de carbapénèmases	11
	III.2.1. Test de Hodge	11
	III.2.2. Test à l'EDTA.....	12
	III.2.3. Détermination des CMI en présence de NaCl.....	14

Partie II : Résultats

I.	Souches bactériennes	15
II.	Tests de sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>Serratia sp.</i>	15
	II.1. Etude du profil de résistance des souches de <i>Serratia sp.</i> aux β -lactamines.....	
	II.1.1. résultats de l'antibiogramme standard	15
	II.1.2. Détermination des CMI.....	15

II.2. Sensibilité vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques.....	16
III. Détermination des phénotypes de résistances aux β -lactamines des souches de <i>Serratia sp</i>	16
IV. Tests de sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18
IV.1. Profil de résistance aux antibiotiques.....	18
IV.1. 1. La sensibilité aux β -lactamines	18
IV.1. 2. La sensibilité aux autres familles d'antibiotiques	18
V. Les phénotypes de résistance aux antibiotiques des souches <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20
V.1. Recherche de la production de BLSE	20
V.2. Recherche de la production de Carbapénémases.....	21
V.2.1. Recherche de la production de métallos β -lactamases (MBL)	21
V.2.1. Recherche de la production d'oxacillinases	22
Discussion.....	24
Conclusion et perspectives.....	27
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I.	Données concernant les souches bactériennes étudiées	06
II.	Antibiotiques testés	08
III.	Préparation de la gamme d'antibiotiques	09
IV.	Sensibilité des souches de <i>Serratia sp.</i> aux β -lactamines	15
V.	Sensibilité des souches de <i>Serratia sp.</i> à d'autres familles d'antibiotiques	16
VI.	Types de BLSE probables	17
VII.	Types de BLSE probable pour les souches de <i>Serratia sp.</i>	17
VIII.	Sensibilité des souches de <i>Stenotrophomonas maltophoilia</i> aux β -lactamines	18
IX.	Sensibilité des souches de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques	19
X.	Résultats de DD-test pour les souches de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20
XI.	Résultats des CMI de l'imipenème en présence et en absence de NaCl	22
XII.	Résultats d'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines	23

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Schéma de DD-test	10
02	Schéma de test de Hodge	12
03	Schéma de test de synergie à l'EDTA	12
04	Test des disques combinés	13
05	Image de synergie pour la souche SC13	17
06	Image de synergie entre ticarcilline et clavulanate pour la souche SC01	20
07	Résultats de DD-test pour la souche SC01 résistante à la CAZ	21
08	Test de Hodge positif pour les souches SC01 et SC02	22
09	Test de synergie à l'EDTA pour la souche SC05	22
10	Test des disques combinés pour la souche SC01	22

Liste des annexes

N°	Titre
I.	Procédure d'identification par la galerie API 20E
II.	Lecture de la galerie API 20E
III.	Composition des milieux de culture pour 1L d'eau distillée
IV.	Préparation de la solution étalon ($\text{BaCl}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$)
V.	Concentrations, diamètres critiques et règles d'interprétation pour les <i>Enterobacteriaceae</i> (CA-SFM, 2012)
VI.	Concentrations, diamètres critiques et règles d'interprétation pour <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (CA-SFM, 2012)
VII.	Résultats d'identification par la galerie Api 20E
VIII.	Résultats d'identification par la galerie API 20E selon le logiciel <i>Apident</i>
IX.	Schéma de Bush et Jacoby
X.	Schéma de la galerie API 20E

Liste des abréviations

ABC: *ATP-Binding Cassette*

Ak: Amikacine

AMC: Amoxicilline- acide clavulanique

AmpC: Céfalosporinases

AT: Aztréonam

BLSE: β -Lactamase à Spectre Etendu

BES: Brazilian extended spectrum

CA-SFM : Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

C1G : Céphalosporine de première génération

C2G : Céphalosporine de deuxième génération

C3G : Céphalosporine de troisième génération

C4G : Céphalosporine de quatrième génération

CAZ : Céftazidime

CIP : Ciprofloxacine

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CN : Gentamicine

COT: Cotrimoxazole

CT: Colistine

CTR: Céftriaxone

CTX: Céfotaxime

CTX-M: Céfotaximase

CX: Céfoxitine

CZ: Céfazoline

DD-test: Double Disque test

EDTA: Ethylene Diamine Tetra-acetic

FEP : Céfépime

I : Intermédiaire

IPM: Imipenème

KES : *Klebsiella, Enterobacter et Serratia*

MDR: Multi-Drug Resistance

MH: Mueller Hinton

M β L: Métallo β -lactamase

NaCl: Chlorure de Sodium

NAL: Acide nalidixique

OXA: Oxacilline

PCR: Polymerisation Chain Reaction.

PI: Pipéracilline

R: Résistante

RND: Resistance Nodulation cell Division

S: Sensible

SHV: Sulfhydrique Variable

TCC: Ticarcilline-clavulanate

TE: Tétracycline

TEM: Temoniera

TI: Ticarcilline

TOB: Tobramycine

TSA: Trypticase Soja Agar

VP: Voges-Proskauer

Problématique

Problématique

La résistance des bactéries aux antibiotiques reste un problème majeur de santé publique, plus particulièrement en milieu hospitalier. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante des antibiotiques et la diffusion épidémique des souches résistantes sont des facteurs principaux conditionnant cette évolution (**Regnier, 1996**).

Les bacilles à Gram négatif occupent une place très importante dans les infections nosocomiales. Parmi les germes qu'héberge le milieu hospitalier, on retrouve les souches de *Serratia sp.* et de *Stenotrophomonas maltophilia*. (**Berthelot et al., 2005 ; Ferrara, 2006**).

Serratia sp. sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et au groupe KES (*Klebsiella, Enterobacter, Serratia*), caractérisés par une réaction de Voges Proskauer (VP) positive, ils ont été considérés initialement comme saprophytes non pathogènes et relativement rares dans les systèmes de soins de santé. Cependant, ils sont de plus en plus considérés comme cause d'infections nosocomiales, notamment dans les unités de soins intensifs néonatales. Deux espèces sont les plus rencontrées en pathologie humaine, *Serratia marcescens* et *Serratia liquefaciens* (**Mahlen, 2011**).

Serratia marcescens, décrite pour la première fois en 1819 est autrefois nommée *Chromobacterium prodigiosum* (**Sleigh, 1983**), c'est un germe associé à des infections des voies respiratoires et urinaires, des septicémies, des méningites, des conjonctivites, des endocardites, et des infections des plaies (**Hejazi et Falkiner, 1997**).

Stenotrophomonas maltophilia est un bacille à Gram négatif, non fermentaire, aérobie strict, c'est une espèce ubiquitaire fréquemment isolée à partir du sol, de l'eau, des animaux et des végétaux. Ce germe a été isolé pour la première fois en 1943 et a été nommé *Bacterium bookeri*. Il a été ensuite classé dans le genre *Pseudomonas*, puis *Xanthomonas*, et finalement *Stenotrophomonas* en 1993 (**Denton et Kerr, 1998; Looney et al., 2009**).

Stenotrophomonas maltophilia est également un saprophyte de l'homme, colonisant le nez, la gorge et le tube digestif. Cette espèce est devenue l'une des bactéries les plus fréquemment impliquées dans les infections nosocomiales, atteignant préférentiellement les immunodéprimés et est responsable d'infections respiratoires, d'infections urinaire et de septicémies (**Falagas et al., 2009 ; Abbott et al., 2011**).

Les β -lactamines font partie des antibiotiques les plus utilisés pour le traitement des infections causées par ces germes. Bien qu'ils constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes (**Cavallo et al., 2004**), chez les bacilles à Gram négatif, la résistance à ces molécules a évolué et est liée principalement à des systèmes d'efflux, à l'imperméabilité membranaire et à la production de β -lactamases, ce dernier étant le mécanisme de résistance le plus fréquent (**Yong et al., 2012**).

Il existe deux types de classification des β -lactamases ; la classification moléculaire d'Ambler qui permet de diviser ces enzymes en quatre classes selon la séquence en acides aminés: la classe A (pénicillinases), la classe C (céphalosporinases codées par le gène AmpC) et la classe D (oxacillinases), ces enzymes sont dites à sérine, nécessitant ce dernier dans le site actif. La classe B regroupe les métallo- β -lactamases, dites enzymes à zinc (**Philippon et Arlet, 2006**). La classification fonctionnelle de Bush permet de grouper les β -lactamases selon la nature de l'enzyme, le substrat préférentiel et la sensibilité aux différents inhibiteurs (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam et EDTA) (**Bush et Jacoby, 2010**) (voir annexe IX).

Les β -lactamases à spectre étendu, faisant partie du groupe 2be et 2de de la classification de Bush, sont issues de plusieurs mutations ponctuelles au niveau du site enzymatique entraînant une meilleure affinité pour les β -lactamines, les BLSE appartenant au groupe 2be hydrolysent les pénicillines, les céphalosporines de première et de deuxième génération à l'exception des céphamycines et de façon variable les céphalosporines de troisième, de quatrième génération et les monobactames, mais sensibles aux inhibiteurs tel que l'acide clavulanique. Les BLSE appartenant au groupe 2de hydrolysent la cloxacilline ou l'oxacilline ainsi que les oxyimino β -lactamines mais avec une sensibilité variable aux inhibiteurs (**Philippon et Arlet, 2006 ; Bush et Jacoby, 2010**).

Les carbapénémases sont des β -lactamases qui hydrolysent les pénicillines, dans la plupart des cas les céphalosporines, et à divers degrés les carbapénèmes et les monobactames.

La grande majorité de carbapénémases sont les enzymes acquises, codées par des plasmides ou d'autres éléments génétiques mobiles. On y trouve, les carbapénémases de la classe A d'Ambler qui hydrolysent une variété de β -lactamines comprenant les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, et les monobactames, par contre les β -lactamases de classe B inhibées par l'EDTA, montrent un large spectre d'activité hydrolytique comprenant toutes les pénicillines, les céphalosporines, et les carbapénèmes, excepté de l'aztreonam. Les β -lactamases de la Classe D, également appelées oxacillinases sont caractérisées par le fait

qu'elles n'hydrolysent pas les céphalosporines de large spectre et sont varriablement inhibées par le NaCl (**Nordmann et al., 2012**).

Les souches de *Serratia sp.* appartiennent au groupe phénotypique 3, elles résistent naturellement aux β -lactamines par la production d'une céphalosporinase de bas niveau de type AmpC appartenant à la classe C d'Amber, cette enzyme est inductible par la pénicilline, l'ampicilline, la céfoxitine, l'imipénème et l'acide clavulanique (**Robin et al., 2012**). Elle confère une résistance aux aminopénicillines, à leur association aux inhibiteurs ainsi qu'aux céphalosporines de première et de deuxième génération (**Bush et Jacoby, 2010**). Ces bactéries sont plus résistantes aux céfuroxime qu'à la céfoxitine (**Robin et al., 2012**).

Chez ces espèces la production de céphalosporinases de haut niveau est généralement déterminée par l'hyperproduction constitutive d'AmpC suite à des mutations au niveau des gènes régulant la synthèse de ces enzymes (**Mammeri et al., 2004; Queenan et al., 2004**).

Les premières BLSE décrites chez *Serratia marcescens* sont de type TEM et SHV, et depuis, plusieurs travaux ont démontré la présence de BLSE parmi des souches de *S. marcescens*, il s'agit de CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-15 (**Yang et al., 2012**). Une BLSE désignée BES-1 a été détectée chez une souche de *S. marcescens* isolée au Brésil en 1996. Cet enzyme présente une forte activité d'hydrolyse pour le céfotaxime comme pour les CTX-M, cependant, BES-1 diffère de celles-ci par son hydrolyse de la céftazidime, une forte affinité pour l'aztréonam et une sensibilité inférieure au tazobactam que pour le clavulanate (**Bonnet et al., 2000**).

Des gènes AmpC plasmidiques portés en association avec les gènes codants pour les BLSE ont été également détectés tel que CMY-2 chez les souches de *Serratia marcescens* (**Iabadene et al., 2009**).

Les carbapénèmes étaient considérées comme efficaces pour le traitement des infections causées par les germes multirésistants producteurs de bêta-lactamases à spectre étendu ou d'AmpC. Chez *Serratia marcescens*, plusieurs carbapénémases ont été décrites, de classes A, groupe fonctionnel 2f, SME-1 a été détecté pour la première fois à Londres en 1982 (**Salimnia et al., 2011**), SME-2, IMI-1 et IMI-2 ont été également décrites, ces enzymes hydrolysent à divers degrés toutes les bêta-lactamines, d'autres de classe B ont été également décrites, notamment IMP-1, IMP-10, VIM-2, ces dernières hydrolysent toutes les bêta-lactamines à l'exception de l'aztreonam (**Nordman et Carrier, 2010**). Récemment Zhang et ces collaborateurs ont décrit trois isolats cliniques de *marcescens* résistants aux

carbapénèmes, isolés en 2006, qui produisent des enzymes de type KPC-2, il a été le premier rapport de détection d'une enzyme plasmidique qui hydrolyse des carbapénèmes chez *Serratia marcescens* (Zhang et al., 2007).

Un autre mécanisme de résistance aux β -lactamines chez *S. marcescens* est la pompe d'efflux SdeAB appartenant à la famille RND qui dans le cas d'une surexpression peut fortement diminuer la sensibilité des souches aux β -lactamines mais aussi aux fluoroquinolones et au chloramphénicol (Kumar et Worobec, 2005).

Les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* résistent naturellement à la quasi-totalité des β -lactamines tels que la ticarcilline, le céfotaxime et l'imipénème. Néanmoins, cette espèce est sensible aux associations ticarcilline-clavulanate, au latamoxef, à la ciprofloxacine, à la tétracycline et à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (Philippon, 2006).

La multirésistance aux β -lactamines est due au fait de la présence de deux β -lactamases chromosomiques inductibles (L1 et L2). La métallo- β -lactamase L1 confère une résistance à toutes β -lactamines à l'exception de l'aztreonam. Cette enzyme appartient à la classe B d'Ambler, elle est insensible à l'acide clavulanique mais sensible à l'acide dipolinique ou à l'EDTA. La β -lactamase L2 est une enzyme de classe A à serine à très large spectre, appartenant au groupe fonctionnel 2e sensible à l'acide clavulanique (Avison et al., 2001) qui hydrolyse les céphalosporines (Bush et Jacoby, 2010).

La production de ces deux enzymes est régulée par un activateur AmpR situé en amont du gène *bla_{L2}*, cependant en absence d'inducteur, AmpR joue le rôle d'activateur pour L1 et répresseur pour L2, par contre en état d'induction, il active les deux gènes. L1 exige plus d'activation par rapport à L2 (Okazaki et al., 2008).

Toutefois, les travaux d'Avison et ses collaborateurs en 2001 ont permis d'isoler un plasmide de 200 kb à partir de souches cliniques de *Stenotrophomonas maltophilia* qui portent les gènes codant pour les β -lactamases L1 et L2 (Avison et al., 2001).

L'imperméabilité membranaire ainsi que les mécanismes d'efflux MDR tels que AcrAB et MexABOprM sont aussi impliqués dans la multirésistance des souches *Stenotrophomonas maltophilia* incluant les β -lactamines, les tétracyclines, les fluoroquinolones ou encore les aminosides (Zhang et al., 2001).

Si l'existence de BLSE chromosomiques avait déjà été démontrée avec l'enzyme L2 chez *Stenotrophomonas maltophilia* (Philippon et Arlet, 2006), les premières BLSE de type

CTX-M ont été décrites chez *Stenotrophomonas maltophilia* isolées en 2004 à partir de prélèvements d'expectoration d'un patient atteint de mucoviscidose à Amsterdam. Il s'agissait de la variante CTX-M-1 (Al Naiemi et al., 2006). Plusieurs travaux ont permis d'identifier ISEcp1 comme élément transposable responsable de la dissémination des enzymes CTX-M à travers les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* (Eckert et al., 2006). D'autres β -lactamases de type TEM-2 localisées sur un transposant TnI-like constitutives et transposables ont été également rapportées (Avison et al., 2000).

L'émergence des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* et *Serratia sp.* multirésistantes aux antibiotiques, plus particulièrement aux β -lactamines semble être en augmentation et leur isolement en milieu hospitalier n'est plus aussi rare qu'avant (Neela et al., 2012 ; Wu et al., 2004).

Actuellement, très peu de travaux nationaux ont été publiés sur l'étude de la résistance aux bêta-lactamines chez ces souches, en particulier chez les souches cliniques de *Stenotrophomonas maltophilia*. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à l'étude des phénotypes de résistance aux bêta-lactamines des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* et de *Serratia sp.* isolées du milieu hospitalier (CHU Parnet d'Alger).

Afin de réaliser cette étude, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- ✓ Identification des souches.
- ✓ Evaluation de la sensibilité des souches aux β -lactamines par la méthode de diffusion et de dilution sur milieu solide.
- ✓ Etude de la sensibilité des souches à d'autres familles d'antibiotiques.
- ✓ Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines (Test de synergie, test de Hodge, test à l'EDTA et test à NaCl).

Partie I

Matériel & méthodes

I. Souches bactériennes

07 souches de *Serratia sp.* et 06 souches de *Stenotrophomonas maltophilia* issus d'origines diverses et isolées au niveau du CHU PARNET d'Alger en 2010 (voir tableau N°I) ont fait l'objet de notre étude qui s'est déroulée durant la période allant du 15 Mars au 30 Avril 2013 au sein du laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'université Abderrahmane Mira de BEJAIA.

Tableau N°I: Données concernant les souches bactériennes étudiées.

Code du laboratoire	Code	Espèce	Service	Type de prélèvement
360A	SC01	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Néphrologie	Selle
360B	SC02	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Néphrologie	Selle
1/11/B	SC03	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Hôpital du jour	Crachat
18/03/10	SC04	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Externe	Urine
04/05/10A	SC05	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Néphrologie	Urine
04/05/10B	SC06	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	pédiatrie	Sang
774	SC07	<i>Serratia liquefaciens</i>	Néonatalogie	Sang
572	SC08	<i>Serratia marcescens</i>	Pédiatrie	Sang
115	SC09	<i>Serratia marcescens</i>	Pédiatrie	Sang
219B	SC10	<i>Serratia marcescens</i>	Chirurgie	Pus
13/04/10	SC11	<i>Serratia marcescens</i>	Néonatalogie	Sang
24/04/10	SC12	<i>Serratia marcescens</i>	Néonatalogie	Sang
1/11A	SC13	<i>Serratia marcescens</i>	Néonatalogie	Sang

A partir des tubes de conservation, les souches bactériennes ont été repiquées sur gélose Trypticase Soja (TSA), puis ré-identifiées au moyen d'une coloration de Gram, un test d'oxydase et une galerie API 20E (Biomérieux, France). La procédure d'identification par la galerie API 20E et la lecture des résultats sont présentés en annexes I et II.

La composition de tous les milieux de culture utilisés est indiquée en annexe III.

II. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

II.1. Antibiogramme standard

Les souches ont été testées vis-à-vis de 20 antibiotiques (voir Tableau N°II) par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**CA-SFM 2012**).

➤ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture fraîche de 18 à 24 H sur milieu TSA, une suspension bactérienne d'environ 10^8 UFC/ml est préparée en faisant dissoudre 3 à 4 colonies dans 5 ml d'eau physiologique, et est comparée avec le trouble obtenu à partir d'une solution étalon ($\text{Ba Cl}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$) équivalente à 0.5 Mc Farland (voir annexe IV).

➤ Ensemencement

Les boîtes de Pétri préalablement coulées par le milieu Mueller Hinton à une épaisseur d'environ 4 mm, sont ensemencées par écouvillonnage.

Après avoir déposé les disques d'antibiotiques, les boîtes sont incubées à 37°C.

L'antibiogramme des aminosides des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* est incubé à 30°C pendant 24h.

➤ Lecture et interprétation

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse et l'interprétation en catégories sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) est effectuée selon les critères définis par le **CA-SFM 2012** (Annexe V et VI).

Tableau N°II : Antibiotiques testés

Antibiotique	Fabriquant	Abréviation	Charge du disque	Famille/groupe	
Amoxicilline/ac. Clavulanique	OXOID [®]	AMC	20-10 µg	Aminopénicillines	β-lactamines
Ticarcilline	HIMEDIA [®]	TI	75 µg	Carboxypénicillines	
Ticarcilline/Ac. clavulanique.	HIMEDIA [®]	TCC	75-10 µg	Carboxypénicillines	
Pipéracilline	HIMEDIA [®]	PI	100 µg	Uréidopénicillines	
Céfazoline	BIOANALYSE [®]	CZ	30 µg	Céphalosporine de 1 ^{ère} génération (C1G)	
Céfoxitine	HIMEDIA [®]	CX	30 µg	Céphamycines	
Céftazidime	HIMEDIA [®]	CAZ	30 µg	Céphalosporine de 3 ^{ème} génération (C3G)	
Céfotaxime	BIOANALYSE [®]	CTX	30 µg	Céphalosporine de 3 ^{ème} génération (C3G)	
Céftriaxone	HIMEDIA [®]	CTR	30 µg	Céphalosporine de 3 ^{ème} génération (C3G)	
Céfépime	OXOID [®]	FEP	30 µg	Céphalosporine de 4 ^{ème} génération (C4G)	
Imipénème	OXOID [®]	IPM	10 µg	Carbapénèmes	
Aztréonam	HIMEDIA [®]	AT	30 µg	Monobactams	
Tobramycine	HIMEDIA [®]	TOB	10 µg	Aminosides	
Amikacine	BIORAD [®]	AN	30 µg	Aminosides	
Gentamicine	BIORAD [®]	GN	10 µg	Aminosides	
Acide nalidixique	BIOANALYSE [®]	NAL	30 µg	Quinolones	
Ciprofloxacine	OXOID [®]	CIP	05 µg	Fluoroquinolones	
Tétracycline	HIMEDIA [®]	TE	30 µg	Tétracyclines	
Colistine	OXOID [®]	CT	50 µg	Polypéptides	
Cotrimoxazole	HIMEDIA [®]	COT	25 µg	Sulfamides	

II.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a été réalisée selon la méthode des dilutions en milieu solide (EUCAST 2000 ; CA-SFM 2012).

Deux solutions d'antibiotique ont été utilisées : la céftazidime à 9000 µg/ml et l'imipénème à 10000 µg/ml.

Les CMI de la céftazidime ont été déterminées pour toutes les souches, tandis que les CMI d'imipénème ont été déterminées pour les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* uniquement.

La souche *Escherichia coli* ATCC 25922 est utilisée comme témoin négatif dans chaque cas.

➤ Préparation de la gamme d'antibiotiques

A partir de la solution mère, une dilution à été effectuée pour obtenir une concentration de 5120 µg/ml. Par la suite, des concentrations décroissantes de 1/2 sont obtenues en réalisant des dilutions successives (voir tableau N°III).

Tableau N°III: Préparation de la gamme d'antibiotiques.

Concentration initiale de l'ATB (µg/ml)	Volume de la solution (ml)	Volume de diluant (ml) (eau distillée) (ml)	Volume d'ATB dans la boîte (ml)	Concentration finale (µg/ml) dans 19ml de MH
5120	2	0	1	256
2560	2	1	1	128
1280	2	1	1	64
640	2	1	1	32
320	2	1	1	16
160	2	1	1	8
80	2	1	1	4
40	2	1	1	2

➤ **Préparation des boîtes**

Dans chaque boîte, 1ml de chaque concentration d'ATB est ajouté à un volume de 19 ml de Mueller Hinton en surfusion (à 45°C environ). Après homogénéisation, les boîtes sont séchées à l'étuve pendant 30 minutes.

Une boîte Mueller Hinton sans antibiotique est utilisée comme témoin.

➤ **Ensemencement**

Une suspension bactérienne d'environ 10^8 UFC/ml (équivalente à 0,5 Mc Farland) est diluée à 10^{-2} . 10 μ l de cette dilution sont déposés sur le milieu sous forme de spot et en trois répétitions (environ 10^4 UFC par spot).

➤ **Lecture**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique dans laquelle il n'y a pas de croissance. La présence d'un léger film bactérien ou de quelques colonies n'est pas prise en considération (CA-SFM 2012).

III. Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines

III.1. Recherche de β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

III.1.1. Test de synergie (DD-Test) (Jarlier et *al.*, 1988 cité par Touati et *al.*, 2012)

Le test de synergie permet de mettre en évidence la production de β -lactamase à spectre étendu (BLSE). Le test consiste à placer des disques de céfotaxime, céftazidime, céfépime et d'aztréonam à une distance de 20 mm centre à centre d'un disque d'augmentin (amoxicilline-clavulanate), ce dernier contient l'acide clavulanique, un inhibiteur de BLSE (Figure 01).

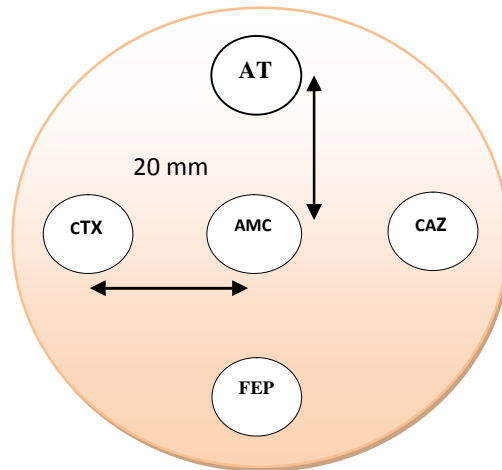


Figure 01 : Schéma de DD-test.

➤ **Lecture**

La production de β -lactamases à spectre étendu est indiquée par l'apparition d'une image de synergie qui correspond à la distorsion de la zone d'inhibition entre le disque d'amoxicilline-clavulanate et les disques de C3G et/ou de C4G et/ ou l'aztréonam (CA-SFM 2012).

III.1.2. DD-Test sur gélose à la cloxacilline (CA-SFM 2012)

Les souches de *Serratia sp.* sont naturellement productrices de céphalosporinase chromosomique, la présence d'une BLSE peut être masquée par l'hyperproduction de cette enzyme en présence d'acide clavulanique.

Le DD-Test est effectué sur gélose MH additionnée de cloxacilline à une concentration finale de 250 $\mu\text{g/ml}$ afin d'inhiber l'activité céphalosporinasique.

III.2. Recherche de carbapénèmases

III.2.1. Test de Hodge (Hodge et al., 1978)

Les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sont naturellement résistantes à l'imipénème. Le test de Hodge a été réalisé afin de mettre en évidence la production de carbapénèmases.

➤ **Matériel utilisé**

- ✓ Une souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922.
- ✓ Un témoin positif : une souche d'*Acinetobacter baumannii* productrice de carbapénémase.
- ✓ Un témoin négatif : une souche de *Proteus mirabilis* sensible à l'imipénème.
- ✓ Gélose Mac Conkey.

➤ **Ensemencement**

Une suspension d'*Escherichia coli* ATCC 25922 d'environ 10^8 UFC/ml est diluée à 10^{-1} puis ensemencée par la méthode d'écouvillonnage sur milieu Mac Conkey.

Après avoir déposé le disque d'imipénème au centre de la boîte, chaque souche à tester est ensemencée sur la gélose sous forme d'une strie à partir du disque d'imipénème jusqu'à la périphérie de la boîte (figure 02).

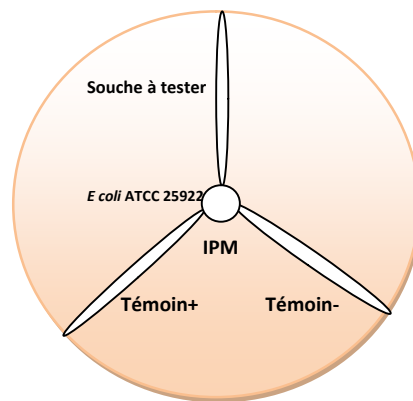


Figure 02: Schéma de test de Hodge

➤ **Lecture**

Après incubation 18 à 24 h à 37°C, la production de carbapénémases se traduit par la déformation de la zone d'inhibition au niveau de l'intersection entre la strie et la culture d'*Escherichia coli*.

III.2.2. Test à l'EDTA (Pandya et al., 2011)

Afin de mettre en évidence la production de métallo β -lactamase (MBL) parmi les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* résistantes à l'imipénème, deux tests à l'EDTA ont été réalisés (test de synergie et test des disques combinés).

L'EDTA (0,5 M à PH 8) jouant le rôle d'inhibiteur de métallo β -lactamases.

❖ **Test de synergie**

Sur une boîte de Mueller Hinton préalablement ensemencée avec la souche à tester, un disque d'imipénème (10 µg) et de céftazidime (30 µg) sont déposés à une distance de 20 mm centre à centre d'un disque d'EDTA contenant 10 µl. (figure 03).

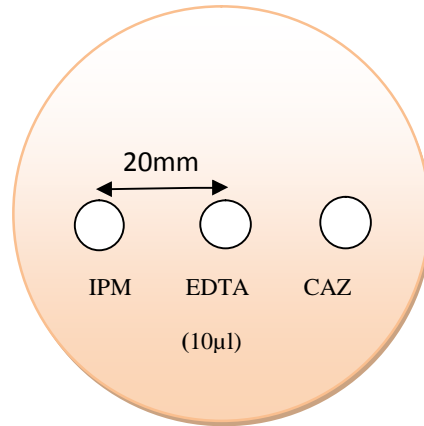


Figure 03 : Schéma de test de synergie à l'EDTA

➤ **Lecture**

La présence d'une image de synergie entre les disques d'EDTA et d'imipénème et/ou de céftazidime indique la production d'une MβL.

❖ **Test des disques combinés**

Sur une boîte de Mueller Hinton préalablement ensemencée par la souche à tester, trois disques sont déposés à distance: deux disques d'imipénème (10 µg) dont l'un est imbibé de 04µl d'EDTA et un disque contenant uniquement 04µl d'EDTA (Figure 04).

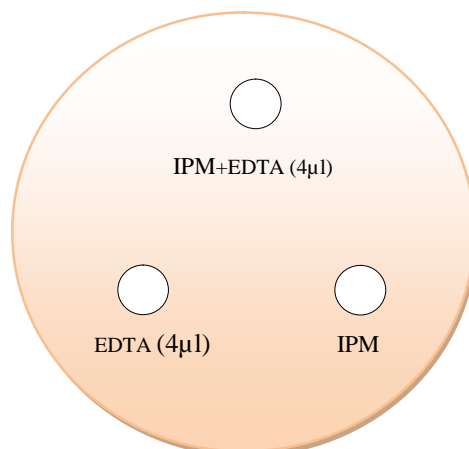


Figure 04 : Test des disques combinés.

➤ **Lecture**

Si le diamètre obtenu autour du disque contenant l'imipénème-EDTA est ≥ 7 mm de celui obtenu avec l'imipénème seul, la souche est considérée comme M β L positive.

III.2.2. Détermination des CMI's d'imipénème en présence de NaCl

(Pournaras et al., 2006)

Le NaCl est un inhibiteur d'oxacillinases. Afin de rechercher la production de ces enzymes, les CMI's de l'imipénème ont été réalisées par la même procédure décrite précédemment en ajoutant à la gélose Mueller Hinton le NaCl à une concentration finale de 200 mM.

Une souche d'*Acinetobacter baumannii* productrice d'oxacillinase a été utilisée comme témoin positif et *E coli* ATCC 25922 comme témoin négatif.

➤ **Lecture**

L'observation d'une diminution des CMI's en présence de NaCl par rapport aux CMI's obtenus avec l'imipénème seul indique que la souche produit probablement des carbapénémases de type oxacillinases.

Partie II

Résultats

I. Souches bactériennes

Au total 13 souches ont été identifiées, 6 souches de *Stenotrophomonas maltophilia*, 6 souches de *Serratia marcescens* et 1 souche de *Serratia liquefaciens*.

Les résultats d'identification par la galerie Api 20E sont présentés en annexe VII et VIII.

II. Tests de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Serratia sp.*

II.1. Etude du profil de résistance des souches de *Serratia sp.* aux β-lactamines

II.1.1. Résultats de l'antibiogramme standard

Le tableau N°IV montre le profil de résistance et les diamètres obtenus à partir de l'antibiogramme standard.

Tableau N°IV: Sensibilité des souches de *Serratia sp.* aux β-lactamines.

Code	AMC		TI		TCC		PI		CZ		CX		CTX		CTR		CAZ		FEP		AT		IPM	
SC07	R	12	R	7	R	10	R	8	R	9	I	17	R	6	R	11	S	26	R	16	I	23	S	28
SC08	R	11	R	7	R	7	R	6	R	7	I	18	R	6	R	06	R	14	R	14	R	15	S	26
SC09	R	14	R	6	R	12	R	6	R	6	S	28	R	6	R	06	R	11	R	12	R	16	S	25
SC10	R	10	R	6	R	6	R	6	R	6	S	22	R	6	R	06	R	13	R	13	R	16	S	28
SC11	R	15	S	27	S	26	S	26	R	7	I	19	S	24	S	30	S	30	S	34	S	30	S	31
SC12	R	13	R	9	R	12	R	7	R	7	S	22	R	6	R	06	R	14	R	14	R	16	S	26
SC13	R	11	R	7	R	18	R	11	R	8	S	22	R	6	R	06	R	14	R	14	R	17	S	28

R: Résistante, **S :** Sensible, **I :** Intermédiaire

Les 07 souches de *Serratia sp.* ont montré une résistance vis-à-vis des aminopénicillines et des C1G. 06 d'entre-elles sont résistantes aux carboxy-pénicillines, à leurs association aux inhibiteurs, au céfépime et à l'aztréonam. Alors que la résistance à la céftazidime n'est observée que chez 05 souches.

La résistance à la céfoxitine reste faible et n'est observée que chez 03 souches. Cependant, l'imipenème est la seule β-lactamine au quelle toutes les souches sont sensibles.

II.1.2. Détermination des CMI

Les CMI obtenues pour la céftazidime expliquent un niveau de résistance variable selon les souches. Des CMI ≤ 2 µg/ml ont été rapportées pour les souches sensibles (SC07 et SC11). Tandis que pour les souches résistantes, elles varient de 8 µg/ml (SC10 et SC13) à 16µg/ml (SC08, SC09et SC12).

II.2. Sensibilité vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques

Le tableau N°V montre le profil de résistance et les diamètres obtenus avec d'autres familles d'antibiotiques.

Tableau N°V : Sensibilité des souches de *Serratia sp.* Vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques.

Code	GN		TOB		AN		NAL		CIP		CT		TE		COT	
SC07	R	08	S	19	S	23	S	25	S	30	R	15	R	11	S	32
SC08	R	06	R	06	R	06	S	25	S	30	R	15	S	23	R	06
SC09	R	06	R	06	R	06	S	24	S	33	R	15	R	16	R	06
SC10	R	06	R	06	R	06	S	23	S	26	R	13	S	18	R	06
SC11	S	28	S	22	S	22	S	22	S	27	R	15	R	9	S	34
SC12	R	06	R	06	R	06	S	24	S	30	R	14	S	19	R	06
SC13	R	06	R	06	R	06	S	26	S	26	R	15	R	9	R	06

R : Résistante, **S :** Sensible, **I :** Intermédiaire

Toutes les souches de *Serratia sp.* sont sensibles aux quinolones (acide nalidixique et ciprofloxacine). Par contre, des résistances aux aminosides, à la tétracycline et au cotrimoxazole sont observées pour certaines souches (SC09 et SC13). Pour ce qui est de la colistine, toutes souches de *Serratia sp.* sont naturellement résistantes à cette molécule.

III. Détermination des phénotypes de résistances aux β -lactamines des souches de *Serratia sp.*

➤ Résultat de DD-test

Le DD-test a montré une image de synergie pour 6/7 des souches de *Serratia sp.* dont 1 souche de *Serratia liquefaciens* et 5 souches de *Serratia marcescens*. Il s'agit des souches SC07, SC08 SC09 SC10, SC12 et SC13. L'image de synergie est traduite par l'augmentation de diamètres des zones d'inhibition autour des disques de céphalosporines de 3ème et 4ème génération ainsi que l'aztréonam situés à proximité d'un disque contenant l'acide clavulanique qui inhibe la BLSE produite par les souches résistantes (Figure 05).

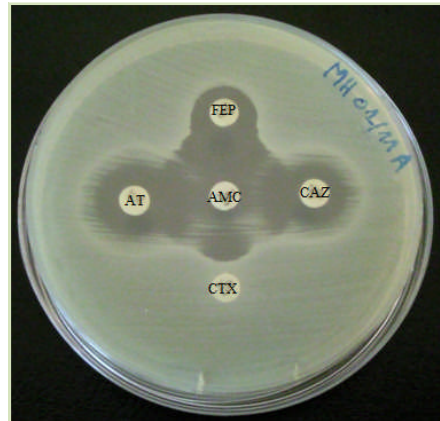


Figure 05 : Image de synergie pour la souche SC13.

Le type de BLSE probable à été déterminé en se basant sur la résistance aux C3G et C4G, selon le tableau N° VI.

Tableau N° VI: Types de BLSE probables (Philippon et Arlet., 2006)

CTX	CAZ	FEP	synergie	Types de BLSE probables
R	R	R	présence	CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-23, CTX-M-32
R	S	R	présence	CTX-M autres que CTX-M-15
R	R	S	présence	Autre que CTX-M

Les Phénotypes de résistance probables pour les souches de *Serratia sp.* sont illustrés dans le tableau N°VII.

Tableau N°VII : Phénotypes de résistance probables pour les souches de *Serratia sp.*

Code	AMC		AT		CTX		CAZ		FEP		Synergie	Phénotypes probables
SC07	12	R	23	I	6	R	26	S	16	R	présence	BLSE type CTX-M
SC08	11	R	15	R	6	R	14	R	14	R	présence	BLSE type CTX-M
SC09	14	R	16	R	6	R	11	R	12	R	présence	BLSE type CTX-M
SC10	10	R	16	R	6	R	13	R	13	R	présence	BLSE type CTX-M
SC11	15	R	30	S	24	S	30	S	34	S	absence	Phénotype sensible
SC12	13	R	16	R	6	R	14	R	14	R	présence	BLSE type CTX-M
SC13	11	R	17	R	6	R	14	R	14	R	présence	BLSE type CTX-M

IV. Tests de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Stenotrophomonas maltophilia*.

IV.1. Profil de résistance aux antibiotiques

IV. 1. 1. La sensibilité aux β -lactamines

Le tableau N°VIII montre les résultats obtenus pour le test de sensibilité aux β -lactamines des souches de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Tableau N°VIII: Sensibilité des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* aux β -lactamines.

Code	AMC		TI		TCC		PI		AT		CTX		CTR		CAZ		FEP		IPM	
SC01	R	06	R	12	R	13	R	13	R	16	R	06	R	06	R	08	R	14	R	06
SC02	R	06	R	12	R	13	R	09	R	18	R	06	R	06	R	08	R	14	R	06
SC03	S	34	S	23	S	26	S	22	S	34	R	06	R	15	S	26	S	32	I	17
SC04	R	06	R	16	S	24	R	10	R	20	R	06	R	08	R	09	R	18	R	06
SC05	R	09	R	17	S	28	R	15	S	30	R	06	R	13	S	24	S	30	R	06
SC06	R	07	R	16	S	25	R	13	S	26	R	06	R	12	S	21	S	24	R	06

R: Résistante, **S :** Sensible, **I :** Intermédiaire

Selon les résultats du tableau, on constate une résistance vis-à-vis la majorité des β -lactamines y compris l'imipénème, associée à une sensibilité plus au moins prédominante pour l'association ticarcilline-clavulanate. Une grande sensibilité a été observée pour une souche SC03.

➤ **Détermination des CMI**

Les CMI de la céftazidime montrent un niveau de résistance élevé de 256, 128 et 64 $\mu\text{g/ml}$ pour les souches SC01, SC02 et SC04 respectivement. Cette résistance est peu élevée pour la souche SC05 avec une CMI de 8 $\mu\text{g/ml}$. Par contre, les souches CS03 et SC06 restent sensibles avec des CMI ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$.

Les CMI à l'imipénème montrent que toutes les souches sont résistantes à haut niveau (CMI de 256 $\mu\text{g/ml}$) à l'exception de la souche SC03 intermédiaire à l'imipénème qui présente une CMI de 4 $\mu\text{g/ml}$.

IV.1.2. La sensibilité aux autres familles d'antibiotiques

Le tableau N°IX indique les résultats de l'antibiogramme pour les autres familles d'antibiotiques.

Tableau N°IX : sensibilité des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques.

Code	CN		TOB		AK		CIP		CT		TE		COT	
SC01	S	19	S	25	S	14	S	24	S	19	S	28	S	29
SC02	S	21	S	24	S	17	S	27	S	21	S	31	S	31
SC03	R	06	R	13	R	06	S	26	S	18	S	27	S	29
SC04	R	10	R	14	R	06	S	30	S	22	S	27	S	30
SC05	R	06	R	12	R	06	S	28	S	17	S	28	S	28
SC06	R	06	R	15	R	06	S	27	S	23	S	22	S	30

R: Résistante, **S :** Sensible, **I :** Intermédiaire

La résistance aux aminosides est observée chez quatre souches. Alors que toutes les souches restent sensibles vis-à-vis la ciprofloxacine, la colistine, la tétracycline et le cotrimoxazole.

V. Les phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches *Stenotrophomonas maltophilia*

Selon (Philippon, 2006), la résistance aux β -lactamines des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* (tableau N°VI) a permis de différencier quatre phénotypes différents :

- Un phénotype sensible à l'association ticarcilline-clavulanate : ce phénotype est observé chez 3 souches (SC04, SC05 et SC06). Il se caractérise par une sensibilité à l'association ticarcilline-clavulanate, mais par une résistance à l'amoxicilline-clavulanate, les C3G, et l'aztréonam, Deux sous-types sont observés :
 - Phénotype résistant à la céftazidime (SC04).
 - Phénotype sensible à la céftazidime (SC05 et SC06).
- Un phénotype caractérisé par une résistance à l'association Ticarcilline-clavulanate ainsi que toutes les autres β -lactamines testées, ce phénotype est observé chez deux souches (SC01 et SC02). Une image de synergie entre le ticarcilline et le clavulanate est observée (Figure 06).

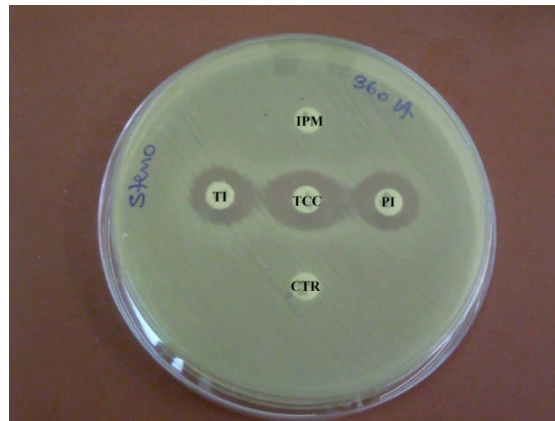


Figure 06 : Image de synergie entre le ticarcilline et le clavulanate pour la souche SC01

V.1. Recherche de la BLSE

Le tableau N°X présente les résultats de DD-test pour les souches de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Tableau N°X: Résultats de DD-test pour les souches de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Code	CAZ		CTX		FEP		AMC		AT		Synergie
SC01	8	R	6	R	14	R	6	R	16	R	Présence
SC02	8	R	6	R	14	R	6	R	18	R	Présence
SC03	26	S	6	R	32	S	34	S	34	S	Absence
SC04	9	R	6	R	18	S	6	R	20	R	Présence
SC05	24	S	6	R	30	S	9	R	30	S	Absence
SC06	21	S	6	R	24	S	7	R	26	S	Absence

R: Résistante, **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire

Selon le tableau N°X, 3/6 souches de *Stenotrophomonas maltophilia* résistantes à la céftazidime (SC01, SC02 et SC04) ont présenté une image de synergie entre les C3G, C4G et l'amoxicilline-clavulanate associée à une image d'antagonisme avec l'aztréonam (Figure 07), contrairement aux trois autres souches sensibles (SC03, SC05 et SC06).

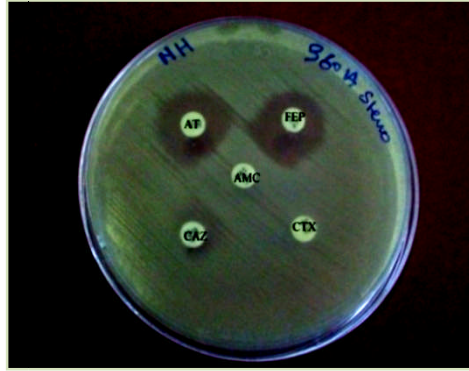


Figure 07: Résultat de DD-test pour la souche SC01 résistante à la CAZ.

V.2. Recherche de la production de carbapénémases

Le test de Hodge a permis de mettre en évidence la production de carbapénémases chez toutes des souches et ce par l'observation d'une déformation de la zone d'inhibition entre les stries des souches et la culture de *E. coli* (Figure 08).

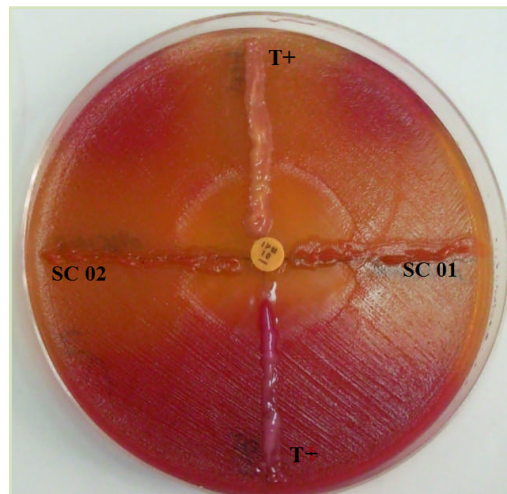


Figure 08 : Test de Hodge positif pour les souches SC01 et SC02

V.2.1. Recherche de la production de métallobéta-lactamases (MβL)

Le test de synergie a montré une image de synergie pour toutes les souches entre le disque d'EDTA (10μl) et celui de céftazidime et absence de synergie avec le disque d'imipénème (Figure 09).

Le test des disques combinés a permis d'observer une différence (≤ 7 mm) entre les diamètres obtenus autour du disque d'imipénème et celui de l'imipénème + EDTA pour toutes les souches (Figure 10).

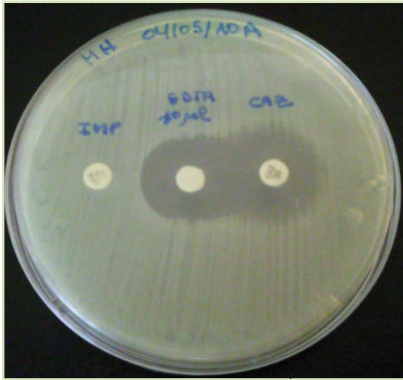


Figure 09: Test de synergie à l'EDTA pour la souche SC05

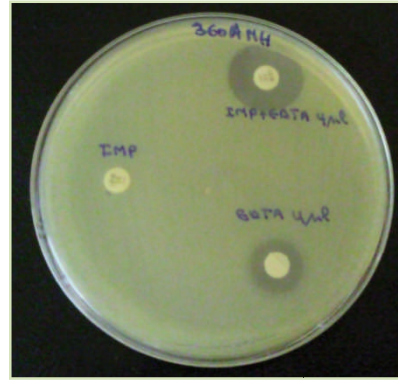


Figure 10: Test des disques combiné positif pour la souche SC01

V.2.2. Recherche de la production d'oxacillinases

Le tableau N°XI montre les CMI's de l'imipénème obtenus en présence et en absence de NaCl.

Tableau N°XI : Résultats des CMI's de l'imipénème en présence et en absence de NaCl.

Souche	CMI's (µg/ml)	
	IMP	IMP+NaCl
SC01	256	128
SC02	256	64
SC04	256	128
SC05	256	256
SC06	256	128

Parmi les 5 souches résistantes à l'imipénème, 4 ont montrées une diminution des CMI's de l'imipénème en présence de NaCl. Il s'agit des souches SC01, SC02, SC04 et SC06, indiquant une production probable de carbapénèmases de type OXA sensibles à NaCl.

Le tableau N°XII résume les différents phénotypes de résistance aux β -lactamines probables obtenus pour les souches de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Tableau N°XII : Résultats d'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines chez les souches de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Code	DD-test	Test de Hodge	Test à l'EDTA	Test à NaCl	Phénotypes probables
SC01	+	+	+	+	BLSE+M β L+OXA
SC02	+	+	+	+	BLSE+M β L+OXA
SC03	-	+	+	NT	M β L
SC04	+	+	+	+	BLSE+M β L+OXA
SC05	-	+	+	-	M β L
SC06	-	+	+	+	M β L + OXA

NT : Non testée ; + : test positif ; - : test négatif

Partie III

Discussion

Discussion

Durant notre étude basée sur des souches d'origine clinique isolées à partir de différents prélèvements pathologiques au niveau du CHU PARNET (Hussein Day, Alger), six souches de *Stenotrophomonas maltophilia*, 6 souches de *Serratia marcescens* et une souche de *Serratia liquefaciens* ont été identifiées.

Le test de sensibilité aux β -lactamines pour les souches de *Serratia sp* a montré que 5/6 souches de *S. marcescens* (SC08, SC09, SC10, SC12 et SC13) ont présenté une résistance aux carboxypénicillines (ticarcilline et ticarcilline-acide clavlanique), aux uréidopénicillines (pipéracilline), aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime, céftriaxone, céftazidime) et de 4^{ème} génération (céfépime) ainsi qu'à l'aztréonam. Quant à la souche de *Serratia liquefaciens*, elle était résistante aux mêmes antibiotiques cités précédemment à l'exception de la céftazidime. L'imipénème reste la seule β -lactamine à laquelle toutes les souches de *Serratia sp* sont sensibles.

Une résistance croisée a été constatée entre les β -lactamines, les aminosides et les sulfamides pour cinq souches de *Serratia marcescens*. Toutes les souches restent, cependant, sensibles aux quinolones et aux fluoroquinolones.

Cinq souches de *Serratia marcescens* ont présenté une image de synergie avec le céfotaxime, la céftazidime, le céfépime et l'aztréonam révélant ainsi la présence de BLSE parmi ces souches. Il pourrait s'agir de BLSE de type CTX-M-15 car ce dernier est le plus fréquemment retrouvé en Algérie chez les entérobactéries (**Iabadene et al., 2009**). Concernant la souche de *Serratia liquefaciens*, elle est également productrice de BLSE avec toutefois une sensibilité à la céftazidime suggérant ainsi la présence probable de BLSE de type CTX-M-1 ou CTX-M-3 qui ont été décrits comme étant les plus prédominants lors d'études effectuées sur des souches cliniques de *Serratia sp.* isolées en Algérie (**Nedjai et al., 2012**), en Corée du sud (**Park et al., 2005**), en Bulgarie (**Ivanova et al., 2008**) et en Chine (**Zhou et al., 2013**). Les BLSE dérivées du type SHV (SHV-5 et SHV-12) et TEM ont été également rapportées parmi des souches de *Serratia sp.* (**Wu et al., 2004 ; Su et al., 2010**).

Toutes les souches ont présenté une sensibilité à l'imipénème, par ailleurs, la résistance à cet antibiotique a été déjà rapportée (**Kao et al., 2010**).

En comparant les profils de résistances aux antibiotiques et la production de BLSE des souches de *Serratia sp*, deux différents couples peuvent être distingués: le premier renfermant les deux souches SC09 et SC13 isolées à partir du service de pédiatrie et de néonatalogie respectivement et le deuxième incluant les deux souches SC10 et SC12 isolées à partir du service de chirurgie et de néonatalogie. Il serait donc probable que les souches ayant présentées le même profil de résistance soient issues d'un même clone.

De même, un cas de diffusion de souches épidémiques a été rapporté par Ktari et al. lors d'une étude réalisée sur 46 souches de *Serratia marcescens* isolées entre 2003 et 2004 au niveau du service de réanimation de l'hôpital de Sfax (Tunisie) et a permis de distinguer trois différents clones en utilisant la PFGE comme marqueur épidémiologique. L'apparition de ces souches épidémiques seraient attribuées au problème du non respect des mesures d'hygiène dans ce service (Ktari et al., 2010).

Les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sont naturellement multirésistantes aux β -lactamines, et selon la sensibilité à l'imipénème, à la céftazidime et à l'association ticarcilline-clavulanate, on peut les classer en quatre phénotypes.

Le phénotype hypersensible été retrouvé chez une seule souche SC03, ce dernier étant un phénotype assez rare (Mérens et al. 2012). Par contre le phénotype sensible a été le prédominant, retrouvé chez trois souches (SC04, SC05 et SC06). La sensibilité à la céftazidime peut être expliquée par l'expression variable de la β -lactamase L2 (Philippon, 2006).

Autre phénotype observé chez les deux souches SC01 et SC02 caractérisé par une résistance à l'association ticarcilline-clavulanate. Ce phénotype est probablement lié à une imperméabilité et/ou un efflux ainsi qu'à des hyperproductions variables de L1 et L2.

Les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sont considérés sensibles à la ticarcilline-clavulanate, cependant la résistance à cette molécule devienne de plus en plus fréquente ces dernières années (Hu et al., 2011).

Toutes les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* ont donné des résultats positifs pour le test de Hodge avec une légère déformation de la zone d'inhibition au niveau de

l'intersection entre la souche d'*E. coli* ATCC 25922 et la souches testée, suggérant la production de carbapénèmases.

La comparaison entre les CMI de l'imipénème avec et sans NaCl (200mM) a permis de constater que sur les cinq souches de *Stenotrophomonas maltophilia* résistantes l'imipénème quatre ont présenté une diminution des CMI de 256 à 128 µg/ml pour les souches SC01, SC 04 et SC06 et de 256 à 64 µg/ml pour la souche SC02. Le NaCl étant un inhibiteur des oxacillinases et plus précisément les OXA-58 (Nordman et al., 2012), la présence de ce type d'enzymes est donc probable. Toutes fois, à ce jour, aucune carbapénémase de type OXA n'a été décrites chez *Stenotrophomonas maltophilia* (Mérens et al., 2012 ; Lavigne et al., 2008).

Les tests phénotypique réalisés dans notre étude ne permettent pas, réellement, de mettre en évidence la résistance acquise vu la nature multirésistante des souches *Stenotrophomonas maltophilia*. Néanmoins, des BLSE de type CTX-M et notamment CTX-M-1 et CTX-M-15 ont été décrites chez des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* d'origine clinique isolées au Pays-Bas et en France respectivement (Al Naiemi et al., 2006 ; Lavigne et al., 2008). D'autres β-lactamases de type TEM et SHV tel que TEM-2 et SHV-12 ont également été rapportées (Avison et al., 2000 ; Al Naiemi et al., 2006).

Concernant la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques, la ciprofloxacine, le cotrimoxazole, la tétracycline et la colistine semblent être assez actives chez toutes les souches de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Depuis longtemps, le cotrimoxazole était considéré comme un moyen efficace pour le traitement des infections à *Stenotrophomonas maltophilia* (Smit et al., 1994), cependant ces dernières années, plusieurs études ont rapporté des taux de résistance élevés pour cette molécules (Neela et al., 2012 ; Chang et al., 2012).

La résistance à la tétracycline a été également décrite chez des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* (Abbassi et al ., 2009 ; Chung et al., 2012).

Conclusion

Conclusion et perspectives

Cette étude a été effectuée au niveau du laboratoire d'écologie microbienne dans la période allant du 15 Mars au 30 Mai 2013, et a été basée sur 07 souches de *Serratia sp.* et 06 souches de *Stenotrophomonas maltophilia* d'origine clinique isolées du CHU Parnet d'Alger.

Les résultats du DD-test ont montré que 6/7 des souches de *Serratia sp.* étaient productrices de BLSE ce qui implique l'émergence de ces enzymes en milieu hospitalier parmi les souches de *Serratia sp.* Ces souches ont présenté une résistance vis-à-vis du cotrimoxazole et des aminosides ce qui peut considérablement réduire la liste d'antibiotiques utilisée à l'échelle thérapeutique.

En ce qui concerne les souches de *Stenotrophomonas maltophilia*, quatre phénotypes de résistance aux β -lactamines ont été observés incluant : un phénotype hypersensible chez une souche, un phénotype sensible chez trois souches (une souche de phénotype CAZ^R et deux souches de phénotype CAZ^S) et un phénotype autre retrouvé chez deux souches. Toutes les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* étaient productrices de métallo- β -lactamases. Une inhibition des carbapénémases par le NaCl a été observée par diminution des CMI de l'imipénème de 256 à 64 $\mu\text{g/ml}$ chez une souche et de 256 à 128 $\mu\text{g/ml}$ pour trois autres souches.

Les tests phénotypiques ont l'avantage d'être peu coûteux et disponibles dans les laboratoires de routine. En vu de l'étude des phénotypes de résistance aux β -lactamines, il sera intéressant de:

- ✓ Augmenter le nombre de souches dans le but de mieux caractériser les phénotypes de résistance.
- ✓ Réaliser une conjugaison afin de déterminer l'origine plasmidique de la résistance.
- ✓ Et enfin utiliser les techniques de biologie moléculaire (PFGE) qui s'avère être utile pour déterminer les mécanismes impliqués dans cette résistance du fait de la multirésistance des souches, plus particulièrement celles de *Stenotrophomonas maltophilia*.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

Abbassi MS, Touati A, Achour W, Cherif A, Jabnoun S, Khrouf N, Ben Hassen A. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia* responsible for respiratory infections in neonatal intensive care unit: Antibiotic susceptibility and molecular typing. *Pathologie Biologie*. **57**, 363–367.

Abbott I J, Slavin MA, Turnidge JD, Thursky KA, et Worth LJ. (2011) *Stenotrophomonas maltophilia*: emerging disease patterns and challenges for treatment. *Expert Review Antimicrobial Infections Therapy*. **9**, 471-88.

Al Naiemi N, Duim B et Bart A. (2006). A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *A Journal of Medical Microbiology*. **55**, 1607-1608.

Avison M B, Von Heldreich CJ, Higgins C, Bennett P M, et Walsh T R. (2001). Plasmid location and molecular heterogeneity of L1 and L2 β -Lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. **15**, 413-419.

Avison M B, Von Heldreich C J, Higgins C, Bennett P M et Walsh T R (2000). A TEM-2 β -lactamase encoded on an active TnI-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **46**, 879-884.

B

Berthelot P, Grattard F, Mallaval FO, Ros A, Lucht F, et Pozzetto B. (2005). Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathologie Biologie*. **53**, 341–348.

Bonnet R, Sampaio JL M, Chanal C, Sirot D, DE Champs C, Viallard J. L. Labia R, et Sirot J. (2000). A Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* Isolated in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**, 3061-3068.

BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY: Methods for antimicrobialsusceptibility testing. (Version Janvier 2006).

Bush K. and Jacoby GA. (2010). Updated Functional Classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54**, 969–976.

C

Cavallo J D, Fabre F, Rapp J C, Garrabé E. (2004). Bêta-lactamines. EMC-Maladies Infectieuses. **1**,129–202.

Chang YT, Lin CY, Lu PL, Lai CC, Chen TC, Chen CY, Wu D C, Wang TP, Lin CM, Lin WR, et Chen YH. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia* bloodstream infection: Comparison between community-onset and hospital-acquired infections. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. **XX**, 1-8.

Chung HS, Hong S G, Lee Y, Kim M,1 Yong D, Jeong S H, Chung HS, Hong S G, Lee Y, Kim M, Yong D, Jeong SH. (2012).Antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from a Korean Tertiary Care hospital. International Journal of Infectious Diseases.**16**, 603-607.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie : recommandation 2012. (Edition Janvier 2012).

D

Denton M, Kerr KG. (1998). Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clinical Microbiology Review. **11**, 57.

E

Eckert C, Gautier V et Arlet G. (2006). DNA sequence analysis of the genetic environment of various bla CTX-M genes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **57**, 14–23.

European commity for antimicrobial Susceptibility testing (ECAST) of the European Society of Clinical Microbiology and infectious diseases (ESCMID). (2000). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution.

F

Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK, et Dimopoulos G. (2009). Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review European Journal Clinical of Microbiological Infection Diseases. **28**,719-730.

Ferrara A M. (2006). Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. International Journal of Antimicrobial Agents. **27**, 183–195.

H

Hejazi A, et Falkiner FR. (1997). *Serratia Marcescens*. Journal Méditerranéen de Microbiologie. **46**, 903-912.

Hodge W, Ciak J, et Tramont EC. (1978). Simple Method for Detection of Penicillinase-Producing *Neisseria gonorrhoeae*. Journal of Clinical Microbiology. **7**, 102-103.

Hu L F, Chang X, Ye Y, Wang Z X , Shao YB , Wei S, Li Xu , et Li JB. (2011). *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class integron. International Journal of Antimicrobial Agents. **37**, 230–234.

J

Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, et Arlet G. (2009) Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among *Enterobacteriaceae* in Algiers hospitals. International Journal of Antimicrobial Agents. **34**, 340–342.

Ivanova D, Markovska R, Hadjieva N, SchneideI, Mitov I, et Bauernfeind A.(2008). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Serratia marcescens* outbreak in a Bulgarian hospital. Journal of Hospital Infection. **70**, 60-65.

K

Kao CC, Liu M F , Lin C F, Huang YC, Liu P Y, Chang C W, et Shi Z Y.(2010). Antimicrobial Susceptibility and Multiplex PCR Screening of *AmpC* Genes from Isolates of *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. **43**, 180–187.

Ktari S, Mahjoubi F, Mnif B, Kallel H, Bouaziz M, et Hammami A. (2010). Investigation de trois épidémies d'infections nosocomiales à *Serratia marcescens* survenues dans le service de réanimation-CHU de Sfax, Tunisie. Journal de Société Tunisienne des Science Médicales. **88**,501 – 506.

Kumar A, et Worobec E A. (2005). Cloning, Sequencing, and Characterization of the SdeAB Multidrug Efflux Pump of *Serratia marcescens*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**49**, 1495-1501.

L

Lavigne J P, Gaillard J B, Bourg G, Tichit C, Lecaillon E, et Sotto A. (2008). Étude de souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sécrétrices de BLSE : détection de CTX-M et étude de la virulence. Pathologie Biologie. **56**, 447–453.

Looney WJ, Narita M, et Mühlemann K. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infection Diseases*. **9**, 312-323.

M

Mahlen S D. (2011). *Serratia* Infections: from Military Experiments to Current Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, **24**, 755–791.

Mammeri H, Poirel L, Bemer P, Drugeon H, et Nordmann P. (2004). Resistance to Cefepime and Cefpirome Due to a 4-Amino-Acid Deletion in the Chromosome-Encoded AmpC β -Lactamase of a *Serratia marcescens* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48**, 716–720.

Mérens A, Janvier F, Vu-Thien H, Cavallo J D, et Jeannot K. (2012). Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*. *Revue Francophone des Laboratoires*.

N

Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, et Timinouni M. (2012). Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Médecine et maladies infectieuses*. **42**, 20-29.

Neela V, Rankouhi SZR, Belkum A Goering RV, et Awang R. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia* in Malaysia: molecular epidemiology and trimethoprim–sulfamethoxazole resistance. *International Journal of Infectious Diseases*. **16**, 603-607.

Nordmann P, Dortet L, et Poirel L. (2012), Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*. **18**, 263-272.

Nordmann P, et Carrer A. (2010). Les carbapénèmases des entérobactéries. *Archives de Pédiatrie* .**17**, 154-162.

O

Okazaki A, et Avison M B. (2008). Induction of L1 and L2 β -Lactamase Production in *Stenotrophomonas maltophilia* Is Dependent on an AmpR-Type Regulator *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **52**, 1525-1528.

P

Pandya N P, Prajapati S B, Mehta S J, Kikani KM, et Joshi PJ. (2011). Evaluation of various methods for detection of metallo- β -lactamase (MBL) production in gram negative bacilli. *International Journal of Biological & Medical Research*. **2**, 775-777.

Références bibliographiques

Park YJ, Park SY, Oh EJ, Park J, Lee KY, Woo GJ, et Lee K. (2005). Occurrence of extended-spectrum β -lactamases among chromosomal AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* in Korea and investigation of screening criteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **51**, 265–269.

Philippon A. (2006). β -lactamines et bacilles à Gram négatif non fermentaires. In Courvalin P, Leclerc R et Bingen E. (Eds), *Antibiogramme*. ESKA, Paris. 187-190.

Philippon A, et Arlet G. (2006). β -lactamases de bacille à gram négatif : le mouvement perpétuel. *Ann Biol clin*. **64**, 37-51.

Poirel L, Nordmann P. (2006). Résistance aux β -lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. *Antibiotiques*. **8**, 100-107. Masson, Paris.

Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis A. N, Legakis NJ, et Tsakris A. (2006). Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **57**, 557–561.

Q

Queenan A M, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K Bush K, et Quinn J. (2006). SME-3, a Novel Member of the *Serratia marcescens* SME Family of Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**, 3485–3487.

R

Regnier B. (1996). Les bactéries multirésistantes aux antibiotiques en réanimation : Contexte épidémiologique et stratégies de maîtrise. *Pathologie et biologie*. **44**, 113-123.

Robin F, Gibold L, et Bonnet R. (2012). Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue francophone des laboratoires*.

S

Salimnia T, Mitchell R.A, Alangaden G, et Salimnia H. (2011). Detection of 2 SME-1 carbapenemase-producing *Serratia marcescens* in Detroit. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **71**, 325-326.

Sleigh JD. (1983). Antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *British Medical Journal*. **287**, 1651 -1653.

Smit WJ, Boquest AL, Geddes JE, et Tosolini FA. (1994). The antibiotic susceptibilities of *Xanthomonas maltophilia* and their relation to clinical management. *Pathology*. **26**, 321-324.

Su PA, Wu LT, Cheng KC, Ko WC, Chuang YC, et Yu WL. (2010). Screening Extended-spectrum b-Lactamase Production in *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* Using Antibiogram-based Methods. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. **43**, 26–34.

T

Touati A, Medboua C, Touati D, Denine, et Brasme L. and de Champs C. (2012). CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria). *International Research Journal of Microbiology*. **3**, 181-185.

W

Wu LT, Tsou M F, Wu H J, Chen H E, Chuang YC, et 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.

Yang H, Cheng J, Hu L, Zhu Y, et Li J, (2012), Mechanisms of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens*. *African Journal of Microbiology Research*. **6**, 4427-4437.

Z

Zhang L, Li X Z, et Poole K. (2001). Fluoroquinolone susceptibilities of efflux-mediated multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **48**, 549-552.

Zhang R, Zhou HW, Cai JC, et Chen GX. (2007). Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Zhou T, Zhang X, Guo M , Jianbo Ye , Yamin Lu, Bao Q, et Chi W. (2013). Phenotypic and Molecular Characteristics of Carbapenem-Non-Susceptible *Enterobacteriaceae* from a Teaching Hospital in Wenzhou, Southern China. *Journal of infection diseases. Infect. Dis.* **66**, 96-102.

Annexes

ANNEXE I

Procédure d'identification par la galerie API 20E.

➤ Préparation de la galerie

Après avoir réunis fond et couvercle, on répartit de l'eau physiologique dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide puis on dépose la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ Inoculum

On prépare une suspension bactérienne en faisant dissoudre quelques colonies dans 5 ml d'eau physiologique.

➤ Ensemencement.

L'ensemencement de la galerie se fait en introduisant la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette pasteur tout en évitant la formation des bulles d'air.

- ✓ Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir les tubes et les cupules.
- ✓ Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes et non les cupules.
- ✓ Pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, créer une anaérobiose en ajoutant de l'huile de vaseline.

➤ Incubation





















L'incubation de la galerie est faite à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

➤ Lecture

La lecture s'effectue directement ou indirectement, après l'ajout des différents réactifs.

ANNEXE II

Lecture de la galerie API 20E

Test	Caractère recherché	Lecture	Résultat +	Résultat -
ONPG	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	<ul style="list-style-type: none"> • Arginine dihydrolase. • Lysine décarboxylase. • Ornithine décarboxylase. 	Lecture directe		
CIT	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H2S	Production d'H2S	Lecture directe		
URE	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte (ajouter le réactif de TDA)		
IND	Production d'indole	Lecture indirecte (ajouter le réactif Kovacs)		
VP	Production d'acétoïne	Lecture indirect (ajouter les réactifs VP1 et VP2)		
GEL	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		

ANNEXE III

Composition des milieux de culture pour 1L d'eau distillée

Gélose Mueller Hinton (CANDA PRONADISA)

Infusion de viande de bœuf	300	g
Hydrolysat de caséine	17,5	g
Amidon	1,5	g
Agar	17	g

PH: 7, 4

Gélose Mac Conkey (FLUKA®)

Peptone	20	g
Lactose	10	g
Sels biliaires	1,5	g
Chlorure de sodium	5	g
Rouge neutre	0,075	g
Cristal violet	0,001	g
Agar	13, 5	g

PH: 7, 2

Gélose Trypticase soja (FLUKA®)

Peptone de caséine	15	g
Peptone papainique de soja	5	g
Chlorure de Sodium	5	g
Agar	15	g

PH : 7, 3

ANNEXE IV

Préparation de la solution étalon ($\text{BaCl}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$)

On verse 40 μl de la solution BaCl_2 dans un tube à hémolyse puis on complète avec la solution H_2SO_4 jusqu'à obtenir 10 ml, puis on mesure la densité optique à 550nm.

La densité optique doit être égale 0,1.

ANNEXE V

Concentrations, diamètres critiques et règles d'interprétation pour les *Enterobacteriaceae* (CA-SFM, 2012).

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Amoxicilline/ac. clavulanique	20/10 µg	≤ 4/2	> 8/2	≥ 21	< 16
Ticarcilline	75 µg	≤ 16	> 64	≥ 22	< 18
Ticarcilline/ac. Clavulanique.	75/10 µg	≤ 16/2	> 64/2	≥ 22	< 18
Pipéracilline	75 µg	≤ 16	> 64	≥ 18	< 12
Aztréonam	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 27	< 21
Imipénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17
Céfaloine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
céfoxitine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 22	< 15
Céfotaxime	30 µg	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
Ceftriaxone	30 µg	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
Ceftazidime	30 µg	≤ 1	> 4	≥ 26	< 21
Céfépime	30 µg	≤ 1	> 4	≥ 24	< 21
Cefpirome	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 24	< 17
Tobramycine	10 µg	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
Amikacine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
Gentamicine	15 µg (10 UI)	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
Tétracycline	30 UI	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Colistine	50 µg	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15
Acide nalidixique	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 20	< 15
Ciprofloxacine	30 µg	≤ 1	> 1	≥ 22	< 22
Triméthoprime/sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	≤ 2/38	> 4/76	≥ 16	< 13

ANNEXE VI

Concentrations, diamètres critiques et règles d'interprétation pour *Stenotrophomonas maltophilia* (CA-SFM, 2012).

Antibiotique	Charge du disque	Concentration critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Amoxicilline/ac. clavulanique	20/10 µg	≤ 2/2	> 8/2	≥ 23	< 16
Ticarcilline	75 µg	≤ 16	> 64	≥ 22	< 18
Ticarcilline/ac. Clavulanique.	75/10 µg	≤ 16/2	> 64/2	≥ 22	< 18
Pipéracilline	75 µg	≤ 16	> 64	≥ 18	< 12
Imipénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17
Céftazidime	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 21	≥ 16
Céfépime	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 21	≥ 17
Céfprome	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 21	≥ 16
Tobramycine	10 µg	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16
Amikacine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
Gentamicine	15 µg (10 UI)	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16
Tétracycline	30 UI	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Colistine	50 µg	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15
Ciprofloxacine	30 µg	≤ 1	> 1	≥ 22	< 22
Triméthoprime/sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	≤ 4/76	> 4/76	≥ 13	< 13

Remarque : l'aztreonam n'a pas été mentionné dans le communiqué de CA-SFM pour les souches de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Pour interpréter les diamètres des zones d'inhibition de cet antibiotique, on s'est référé au communiqué du BSAC (BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY) : Methods for antimicrobial susceptibility testing ; (Version Janvier 2006).

17

Table 6: MIC and zone breakpoints for Enterobacteriaceae (including *Salmonella* and *Shigella* spp.) and *Acinetobacter* spp.

Antibiotic	MIC breakpoint (mg/L)			Disc content (μ g)	Interpretation of zone diameters (mm)		
	R >	I	S \leq		R \leq	I	S \geq
Amikacin	16	16	8	30	15	16-18	19
Amoxicillin ¹	16	16	8	10	11	12-14	15
Ampicillin ¹	16	16	8	10	11	12-14	15
Aztreonam ²	1	-	1	30	23	-	24
Cefaclor	1	-	1	30	34	-	35
Cefamandole ^{3,4}	8	-	8	30	19	-	20
Cefepime	1	-	1	30	31	-	32
Cefixime	1	-	1	5	19	-	20
Cefoperazone ³	4	-	4	30	24	-	25
Cefotaxime	1	-	1	30	29	-	30
Cefotetan ³	4	-	4	30	23	-	24
Cefoxitin ⁴	8	-	8	30	19	-	20
Cefpirome	1	-	1	20	24	-	25
Cefpodoxime ^{5,6}	1	-	1	10	19	-	20
Ceftazidime	2	-	2	30	27	-	28
Ceftazidime ⁷	2	-	2	30	21	-	22
<i>E. coli</i> & <i>Klebsiella</i> spp.							
Ceftibuten	1	-	1	10	27	-	28
Ceftizoxime	1	-	1	30	29	-	30
Ceftriaxone	1	-	1	30	27	-	28
Cefuroxime (axetil)	1	-	1	30	24	-	25
Cefuroxime (parenteral)	8	-	8	30	19	-	20
Cefalothin ⁴	8	-	8	30	26	-	27
Cefradine ⁴	8	-	8	30	11	-	12
Chloramphenicol	8	-	8	30	20	-	21
Ciprofloxacin ^{8,9}	1	1	0.5	1	16	17-19	20
Co-amoxiclav ¹	16	16	8	20/10	11	12-14	15
Collistin ¹⁰	4	-	4	25	14	-	15
Co-trimoxazole ^{11,12}	32	-	32	25	15	-	16
Doxycycline	1	-	1	30	28	-	29
Ertapenem	2	-	2	10	27	-	28
Gatifloxacin	1	-	1	2	19	-	20
Gemifloxacin	0.25	-	0.25	1	19	-	20
Gentamicin ¹³	4	4	2	10	16	17-19	20
Imipenem ¹⁴	4	-	4	10	22	-	23
Levofloxacin	2	2	1	1	13	14-16	17
Meropenem	4	-	4	10	22	-	23
Mezlocillin	16	-	16	75	21	-	22
Moxifloxacin	1	1	0.5	1	16	17-19	20
Ofloxacin	1	1	0.5	5	25	26-28	29
Piperacillin	16	-	16	75/10	21	-	22
/Tazobactam							
Piperacillin	16	-	16	75	23	-	24
Streptomycin ³	8	-	8	10	12	-	13
Sulfamethoxazole	32	-	32	100	13	-	14
Timentin	16	-	16	85	20	-	21
Tobramycin ¹³	4	4	2	10	17	18-20	21
Trimethoprim	2	1-2	0.5	2.5	14	15-19	20

ANNEXE VII

Résultats d'identification par la galerie Api 20E

Code	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	Urée	TDA	Indol	VP	GEL	GLU	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mel	Amy	ARA
SC01	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC02	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC03	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC04	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC05	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC06	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC07	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
SC08	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
SC09	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
SC10	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
SC11	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
SC12	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
SC13	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-

+ : Test positif ; - : Test négatif

ANNEXE VIII

Résultats d'identification par la galerie API 20E selon le logiciel *Apident*.

Code de laboratoire	Notre code	N° d'identification	% d'identification
360A	SC01	5202000	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (95,1%)
360B	SC02	5202000	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (95,1%)
1/11B	SC03	5202000	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (95,1%)
18/03/10	SC04	1202000	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (79,8%)
04/05/10A	SC05	5202000	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (95,1%)
04/05/10B	SC06	1202000	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (79,8%)
774	SC07	7307763	<i>Serratia liquefaciens</i> (75,5%)
572	SC08	7307761	<i>Serratia marcescens</i> (97,7%)
115	SC09	7317721	<i>Serratia marcescens</i> (99,7%)
219B	SC10	5317721	<i>Serratia marcescens</i> (99,7%)
16/11/03	SC11	5317761	<i>Serratia marcescens</i> (99,6%)
24/04/10	SC12	5317721	<i>Serratia marcescens</i> (99,7%)
1/11A	SC13	7317721	<i>Serratia marcescens</i> (99,7%)

ANNEXE IX

Schéma de Bush et Jacoby (Bush et Jacoby, 2010)

Groupe de Bush-Jacoby 2009	Groupe de Bush-Jacoby-Medeiros 1995	Classe Moléculaire (sous-groupe)	Substrat distinctif (s)	Inhibé par		Caractéristiques (s)	Enzyme représentative (s)
				AC ou TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Céphalosporines	Non	Non	Hydrolyse beaucoup plus les céphalosporines que les benzylpenicillines; Hydrolyse les céphamycines	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Céphalosporines	Non	Non	Hydrolyse de céftazidime et souvent d'autres oxyimino β -lactamines	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillines	Oui	Non	Hydrolyse beaucoup plus les benzylpenicillines que les céphalosporines	PC1
2b	2b	A	Pénicillines, hautement les céphalosporines	Oui	Non	Hydrolyse similaire de benzylpenicillines et des céphalosporines	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cephalosporines à large spectre, monobactames	Oui	Non	Hydrolyse majoré pour les oxyimino β -lactamines (céfotaxime, céftazidime, céftriaxone, céfépime, aztréonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillines	Non	Non	Résistance à l'acide clavulanique, sulbactam, et tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cephalosporines de large spectre, monobactames	Non	Non	Hydrolyse majeure de oxyimino β -lactamines combine avec la résistance à l'acid clavulanique, sulbactam et tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbénicillines	Oui	Non	Hydrolyse majeure des Carbénicillines	PSE-1, CARB-3

2ce	NI	A	Carbénicillines, céfépime	Oui	Non	Hydrolyse majeure de Carbénicillines, céfépime, et céfpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilline	Variable	Non	Hydrolyse majeure de la cloxacilline ou l'oxacilline	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cephalosporines à large spectre,	Variable	Non	Hydrolyse majeure de la cloxacilline ou l'oxacilline et les oxyimino- β -lactamines	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapénèmes	Variable	Non	Hydrolysent la cloxacilline ou l'oxacilline et les carbapénèmes	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cephalosporines à large spectre,	Oui	Non	Hydrolysent les céphalosporines. Inhibée par l'acide clavulanique mais non aztréonam	CepA
2f	2f	A	Carbapénèmes	Variable	Non	Hydrolyse majeure de carbapénèmes, oxyimino- β -lactamines et cephamycines	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B3) B (B1)	Carbapénèmes	Non	Oui	Hydrolyse à spectre étendu incluant les carbapénèmes mais pas les monobactames	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapénèmes	Non	Oui	Hydrolyse préférentielle des carbapénèmes	CphA, Sfh-1
NI	4	inconnu					

a AC, acide clavulanique; TZB, tazobactam. *b* NI, non inclus.

Résumé

L'objectif de la présente étude était de caractériser les phénotypes de résistances aux β -lactamines chez 13 souches cliniques de *Serratia sp* et de *Stenotrophomonas maltophilia* isolées du CHU Parnet (Alger).

Les souches bactériennes ont été identifiées par galerie API20E puis testées vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques par la méthode de l'antibiogramme et de la détermination des CMI (céftazidime). Certaines de ces souches ont fait l'objet du : D-D test, test de Hodge, test à l'EDTA et des CMI à l'imipénème avec et sans NaCl, afin de pouvoir déterminer les différents phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Sur les 13 souches étudiées, 05 souches de *Serratia sp* sont révélées probablement productrices de BLSE du type CTX-M. Tandis que, chez les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* différents phénotypes ont été observés: un phénotype hypersensible chez une souche, un phénotype sensible retrouvés chez trois souches (de type CAZ^R chez une souche et CAZ^S chez deux autres). Et enfin phénotype autre observé chez les deux autres souches . Dans le cas de *Stenotrophomonas maltophilia*, le test de Hodge été positif pour toute les souches et le test à l'EDTA a indiqué qu'il s'agissait de carbapénémases de type M β L, caractérisant ces souches. Quant au test à le NaCl, 04 souches seulement ont montrées une diminution des CMI à l'imipénème.

L'émergence des BLSE chez les souches de *Serratia sp* devienne de plus en plus inquiétante. En raison de la multi-résistance des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* l'étude phénotypique semble être difficile à réalisée.

Mots clés : *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia sp*, CTX-M, β -lactamines, BLSE.

Summary

The aim of this study was to characterize the different phenotypes of β -lactams resistance in 13 clinical strains of *Serratia spp* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from UHC Parnet (Algiers).

The bacterial strains were identified by API20E gallery. Then, they were tested toward different antibiotics families by antibiograms and by determination of MICs (ceftazidime). Some of these strains were subjected for: DD test, Hodge test, EDTA test and MICs of imipenem with and without NaCl in order to determine the different phenotypes of β -lactams resistance.

From the 13 strains studied, 05 strains of *Serratia sp* have been probably CTX-M producers. While, among *Stenotrophomonas maltophilia* strains, several phenotypes were obtained: an hypersensitive phenotype in one strain, a sensitive phenotype in three strains (CAZ^R type in one strain and CAZ^S type in two strains) and finally, another phenotype in two strains. All strains of *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to imipenem were positif for Hodge test. The EDTA test indicated that these strains produced metallo- β -lactamases as carbapenemases that characterize this strain. For the NaCl test, 04 strains had shown a decreasing in imipenem MICs.

The emergence of ESBL *Serratia sp* strains makes infections difficult to trait especially in the context of nosocomial infections. Concerning *Stenotrophomonas maltophilia* strains, the study of resistance phenotypes become difficult because of the natural multidrug-resistance.

Key words: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia sp*, β -lactams, CTX-M, ESBL.

