

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Et des Sciences de la Terre et de l'Univers : SNV/STU

Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme
DE MASTER EN BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Option : MICROBIOLOGIE

Présenté par : M^{elle} LACHGUEUR Aouicha

Intitulé du Thème :

Etude de la colonisation des nouveaux nés par la flore à Gram positifs dans le service de néonatalogie de l'EHS de Tlemcen

Soutenu le : 29 septembre 2013

Devant le Jury composé de :

Dr. REBIAHI S. A.

Maitre de conférences B

Promoteur

Dr. BARKA S

Maitre de conférences B

Examineur

Dr. BADID N

Maitre de conférences B

Présidente

Année Universitaire : 2012-2013

Listes des figures

Figure 1. Image au microscope électronique de <i>S. aureus</i>	12
Figure 2: Organisation de l'identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figure 3 : Répartition des prélèvements.....	35
Figure 4: Répartition des souches isolées selon la coloration de Gram.....	36
Figure 5: répartition des souches des streptocoques isolées.....	38
Figure6: répartition des souches selon le test catalase.....	40
Figure 7 : répartition des espèces étudiés selon leur nature.....	41
Figure 8: répartition des souches de Staphylocoques identifiées par plaque API Staph.....	42
Figure 9: pourcentage de résistance des espèces étudiées vis-a-vis les antibiotiques testés...	45
Figure 10: la multirésistance des espèces étudiées vis-a-vis les antibiotiques testés.....	46

Liste des photos personnelles

Photo personnelle 1 : les étapes de préparation du Gélose au sang.....	33
Photo personnelle 2 : conservation des souches dans des tubes a épindorf.....	33
Photo personnelle 3 : formation d'un précipité noir (esculinase+).....	37
Photo personnel 4 : aspect des souches a culture (+).....	37
Photo personnel 5 : aspect des colonies sur gélose au sang frais.....	38
Photo personnelle 6 : aspect des colonies sur gélose chapman.....	39
Photo personnelle 7 : observation microscopique au microscope optique a l'immersion (objectif x100).....	39
Photo personnelle 8 : production de catalase par les cocci a Gram positif isolés.....	40
Photo personnelle 9 : observation du test coagulase libre.....	40
Photo personnelle 10 : identification de <i>S. aureus</i> (prélever d'aisselles) par galerie API Staph.....	41
Photo personnelle 11 : identification de <i>S. haemolyticus</i> (prélever de l'anus) par galerie API Staph.....	41
Photo personnelle 12 : effet disques d'antibiotique sur différentes souches : <i>S. lentus</i> (a), <i>S. haemolyticus</i> (b), <i>S. haemolyticus</i> (c).....	45

Liste des tableaux

Tableau 1: Répartition des germes selon leur fréquence d'apparition.....	13
(DJOUPOMB NJANANG, 2007)	
Tableau 2: Germes cultivés selon la période néonatale.....	13
(DJOUPOMB NJANANG, 2007)	
Tableau 3 : Répartition des germes selon leur pourcentage de sensibilité globale aux antibiotiques.....	14
(DJOUPOMB NJANANG, 2007)	
Tableau 4 : Répartition des germes selon leur pourcentage de sensibilité spécifique aux antibiotiques.....	15
(DJOUPOMB NJANANG, 2007)	
Tableau 5: concentration, diamètre critiques et règles de lecture interprétative (CA-SFM 2012)	26
Tableau 6: résultats des prélèvements effectués à l'ESH-Tlemcen.....	35
Tableau 7 : Caractéristique de la population étudiée.....	36
Tableau 8 : résultats d'antibiogramme pour 16 espèces appartenant au genre <i>Staphylococcus</i> isolées a partir de service de néonatalogie (EHS – Tlemcen).....	44

Liste des abréviations

°C : degré Celsius.

% : pour cent.

(APH-2''-AAC-6') : activités de phosphorylation et d'acétylation.

BN : Bouillon nutritif

BHIB : Bouillon cœur cervelle (BHIB)

BEAA : Gélose Bile Esculine Azide Agar

BMR : bactéries multi résistantes

BGN : bactéries à Gram négative

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

CMI : concentration maximale inhibitrice.

DI : densité d'incidence.

DIS : densité d'incidence spécifique.

EHS : l'établissement hospitalier spécialisé mère-enfant.

Fox : Céfoxitine

GISA : staphylocoques dorés intermédiaires aux glycopeptides .

GN : Gélose nutritive

GN : Gentamicin

INB : infection nosocomiale bactériennes.

INN : infections nosocomiales néonatale.

K : Kanamycin

KTVO : cathéter veineux ombilical.

KTVC : cathéter veineux central.

MH : Mueller Hinton

MRSCN : multi résistance du staphylocoque a coagulase négative

MLS : Les macrolides, lincosamides et streptogramines.

OMS : organisation mondiale de santé.

OX : Oxacilin

PLP : protéines de liaison à la pénicilline.

RA : Rifampin

Réaped : réanimation pédiatrique.

SA : *Staphylococcus aureus*.

SCN : les staphylocoques à coagulase négative.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

TC : Tétracyclin

VA : Vancomycine

VRE : entérocoques résistants à la vancomycine.

Remerciements

Je tiens à remercier monsieur Sid Ahmed REBIAHI maitres de conférences classe B au département de biologie moléculaire et cellulaire

d'avoir accepté de diriger ce travail.

Mes remerciements vont également à Ma demoiselle BADID NAIMA maitre de conférence classe B à l'université de Tlemcen, de m'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie monsieur BARKA Salah docteur maître de conférences classe B à l'université de Tlemcen de m'avoir fait l'honneur d'examiner le travail.

Je remercie aussi tous les membres de service de néonatalogie en particulier docteur GEMBAZA et tous les personnels du laboratoire de LAMAABE.

En fin nous tenant à exprimer notre profonde sympathie à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de nos études et tout particulièrement aux enseignants de la spécialité.

Dédicace

*Avec l'aide du tout Puissant, j'ai pu réaliser ce
modeste travail que je dédie :*

*A mes chers parents sur qui j'ai pu compter et me
ressourcer d'affection et de bénédictions durant
toute ma vie.*

A mes sœurs :Amina, Imane, Marwa, Safaa.

*A mes frères : Kamal, Sofiane, Abderrahmane, Djilali, Salim,
Zakaria, Tahaa.*

A ma tante Saliha et ma belle-mère Zohra

A toutes les personnes que j'aime...

*A tous les membres de l'Union Générale Estudiantine Libre-
branche des sciences qui m'ont beaucoup soutenue et encouragée*

A toute la promotion de Microbiologie .Tlemcen

2012.2013

Awicha

Introduction

Les infections nosocomiales représentent un enjeu important en termes de santé publique. Elles sont responsables d'une augmentation de la morbidité et occasionnent un coût important pour la collectivité. Une surveillance épidémiologique est instaurée au sein des services de gynécologie obstétrique et maternité, elle a pour but d'établir le taux d'infections nosocomiales et les facteurs de risque associés à leur survenue.

Ces infections occupent toujours une place importante dans les services de néonatalogie en raison des taux élevés et de morbidité dont elles sont favorisées par la présence de bactéries multirésistantes. La prise en charge des nouveaux nés et leur hospitalisation comporte un risque élevé de complication Malgré les progrès réalisés. (Ahoyo et al., 2006).

Chez la mère, une infection nosocomiale se définit comme une infection acquise en cours de séjour à la maternité alors que cette infection n'était ni présente à l'entrée, ni en phase d'incubation, avec un intervalle libre d'au moins 48 heures (Rouzic et al., 2008).

Dans le service néonatalogie, considéré comme une unité de très haut risque, les nouveau-nés sont traités comme des patients à haut risque d'infection nosocomiale corrélée surtout à l'âge gestationnel et le poids, plus sévères chez les prématurés dont la survie est largement associée à de longues périodes d'hospitalisation, l'utilisation de cathéter et d'une antibiothérapie large. Lachassinne et ces collaborateurs en (2004), rapportent que, la majorité des nouveau-nés n'est pas hospitalisée mais le contact dans les premiers jours de vie avec des structures de soins les soumet au risque nosocomial. Le nouveau-né, stérile à la naissance, mais rapidement colonisé par des germes provenant de sa mère et de l'environnement. Tout apport de germes à risque pathogène déséquilibre cette colonisation. La prescription d'antibiotiques favorise ce déséquilibre et le développement de bactéries résistantes dans le tube digestif. Les nouveau-nés, très dépendants du personnel, sont soumis à des actes thérapeutiques « agressives » avec effraction des barrières cutanées.

Un diagnostic précoce d'infection nosocomiale en réanimation néonatale reste difficile mais indispensable. Les signes cliniques chez le nouveau-né et surtout chez le prématuré sont non spécifiques : toute aggravation inexplicquée de l'état d'un enfant hospitalisé de plus de 72 h doit faire suspecter une infection nosocomiale. Aussi, le nouveau-né hospitalisé, à l'état clinique parfois précaire, présente souvent de lourdes pathologies qui peuvent justifier le recours à des procédures invasives. La survie plus fréquente de très grands prématurés prolonge les durées d'hospitalisation et majore ces risques.

En raison de l'importance élevée des infections nosocomiales aux niveaux du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (CHUT), nous nous sommes proposés de :

- Rechercher les sources de contamination de l'infection nosocomiale au niveau du service de maternité (CHUT)
- Rechercher et identifier des bactéries à Gram positives responsables de l'infection nosocomiale
- Etudier leurs résistances aux antibiotiques.

Liste des figures

Liste des photos personnelles

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Infection nosocomiale dans le service maternité.....	3
I.1.les infections nosocomiales.....	3
I.2. Surveillance des infections nosocomiales.....	4
➤ <i>Les enquêtes de prévalence</i>	4
➤ <i>Les enquêtes d'incidence</i>	4
I.3. Infections nosocomiales chez les nouveaux nés	5
I.4. Epidémiologie des infections néonatale.....	5
I.5. Mécanismes de l'infection nosocomiale néonatale.....	6
I.6. <i>Incidence et densité d'incidence (DI)</i> d'infections nosocomiales bactériennes en unités de néonatalogie (INB).....	7
I.7. Facteurs de risque d'infection nosocomiale bactérienne	7
I.7.1. Immaturité de l'immunité néonatale	7
I.7.2. Moyens de défense du fœtus	7
I.7.3. Procédures invasives : densité d'incidence spécifique /durée d'exposition au risque.....	8
I.7.4. L'âge gestationnel et le poids de naissance.....	9
I.7.5. La corticothérapie postnatale.....	9
I.7.6. Les autres facteurs de risques.....	9
II. Germes responsables d'infection nosocomiale et leurs résistances aux antibiotiques.....	10
II.1. Caractéristiques bactériologiques des souches a gram + les plus incriminés dans les infections nosocomiales.....	10
II.1.1. Streptocoques du groupe B.....	10
II.1.2. Staphylococcus aureus	10

II.1.3. Les Staphylocoques à coagulase négative	11
III. mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques.....	13
III.1 Résistance chez les staphylocoques	14
III.1.1. Résistance aux β -lactamines	14
III.1.2 Résistance aux aminosides.....	16
III.1.3 Résistance aux macrolides.....	17
III.1.4. Résistance aux fluoroquinolones.....	19
III.1.5. Résistance aux glycopeptides.....	19
III.2. Résistance chez les entérocoques.....	20
III.2.1. Résistance naturelle aux β -lactamines.....	20
III.2.2. Résistance aux aminosides.....	21
III.2.3. Résistance aux macrolides et apparentés.....	21
III.2.4. Résistance aux glycopeptides.....	22

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Lieu d'étude.....	23
1.2. Milieux de culture	23
1.2.1. Milieux de culture liquides	23
1.2.2. Milieux de culture solides	23
1.3. Réactifs :.....	23
1.3.1. Tests biochimiques	23
1.3.2. Test d'antibiogramme.....	24

2. Méthodes

2.1. Prélèvement réalisés en néonatalogie.....	24
2.2. Isolement et purification.....	26
2.2.1. <i>Le milieu Chapman</i>	26
2.2.2. <i>Le milieu Bile-Esculine Azide Agar</i>	26
2.3. Identification.....	27
2.3.1. <i>Coloration de gram</i>	27
2.3.2. <i>Recherche de la catalase</i>	27
2.3.3. <i>Recherche de la staphylocoagulase libre</i>	28

Table des matières

2.3.4. Identification par le système API Staph (BioMérieux) (Dellaras, 2007).....	28
2.3.5. Différenciation des streptocoques bile-esculine-positifs (Dellaras, 2007).....	30
2.4. Conservation des souches	31
2.5. Antibiogramme des souches isolées (CA-SFM, 2013).....	31

chapitre III : Résultats et Discussion

1. Prélèvement.....	33
2. Isolement et identification.....	34
2.1. Aspect des colonies.....	35
2.2. coloration de Gram.....	37
2.3. Test catalase.....	38
2.4. Test coagulase libre.....	39
2.5. Identification biochimique par API® Staph Bio Mérieux®.....	39
3. sensibilité aux antibiotiques	42
<i>Conclusion</i>	46

Références bibliographiques

Annexes

I.1. les infections nosocomiales :

Les infections nosocomiales sont des infections bactériennes, virales ou fongiques qui sont contractées au cours d'une hospitalisation et qui se manifestent cliniquement 48 heures après l'admission. (Bejaoui et al., 1991)

en raison de leur fréquence et de leurs conséquences, elles représentent un réel problème dans les unités de néonatalogie. Ces infections ont vu leur incidence croître en raison de l'extension des procédures invasives diagnostiques et thérapeutiques. La multi résistance problématique des germes, le taux élevé de mortalité imposent désormais une prévention soutenue, notamment par la maîtrise des facteurs de risque. (Bedu et al, 1996 ; Habzi et al., 2001).

Selon les services du Ministère de la santé Française (2005), ces infections peuvent être directement liées aux soins (par exemple l'infection sur cathéter) ou simplement survenir lors de l'hospitalisation indépendamment de tout acte médical (par exemple une épidémie de grippe).

Il existe deux types d'infections nosocomiales relevant de modes de transmission différents :

- les infections d'origine « endogène » :

Le malade s'infecte avec ses propres microorganismes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière ;

- les infections d'origine « exogène » :

Il peut s'agir :

- ✓ soit d'infections croisées, transmises d'un malade à l'autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical ;
- ✓ soit d'infections provoquées par les microorganismes portés par le personnel ;
- ✓ soit d'infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, matériel, alimentation...) d'où l'intérêt de notre recherche.

Quel que soit son mode de transmission, la survenue d'une infection nosocomiale est favorisée par la situation médicale du patient qui dépend de :

- **son âge et sa pathologie :**

Les nouveau-nés, en particulier les prématurés sont particulièrement réceptifs.

- **certains traitements :**

Les antibiotiques qui déséquilibrent la flore des patients et sélectionnent les bactéries résistantes et les traitements immunosuppresseurs.

- **la réalisation d'actes invasifs nécessaires au traitement du patient :**

Le Sondage urinaire, pose d'un cathéter, la ventilation artificielle et l'intervention chirurgicale. (Services du Ministère de la Santé Françaises., 2005)

La Fréquence d'infection nosocomiale est comparable à celle des pays européens avec une tendance à la diminution. Depuis plus de 15 ans, la mobilisation des professionnels hospitaliers et des structures de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales permet de disposer de nombreuses données sur les infections nosocomiales.

La surveillance des infections nosocomiales est, en outre, l'une des composantes du programme que les établissements de santé sont tenus de mettre en place (D. EN; JO no 99–1034, 6 déc. 1999). Les différentes sources d'informations relatives aux infections nosocomiales sont les données issues de la surveillance épidémiologique (enquêtes d'incidence et de prévalence) des infections nosocomiales et le dispositif de signalement obligatoire à l'autorité sanitaire de certaines infections nosocomiales. (Services du Ministère de la Santé Françaises., 2005)

I.2. Surveillance des infections nosocomiales

La surveillance des infections nosocomiales requiert une organisation et une charge de travail très importantes pour les établissements de santé et constitue avant tout un des outils utilisés pour adapter leur stratégie de prévention.

- **Les enquêtes de prévalence :** permettent d'avoir une description globale, à un moment donné ou pendant une période donnée, des infections nosocomiales. Elles sont simples à mettre en œuvre, mais les taux d'infections calculés ne sont interprétables que sur des grandes populations (régionales, nationales).
- **Les enquêtes d'incidence :** consistent à étudier, au fur et à mesure de leur survenue, tous les nouveaux cas d'infections et permettent une mesure précise du risque de contracter une infection pour un patient admis à l'hôpital. Elles permettent aussi de prendre en compte les facteurs propres au patient ou aux soins qu'il reçoit. (Services du Ministère de la Santé Françaises., 2005)

Dans le cadre de cette surveillance, un exemple d'une enquête prospective de surveillance des infections nosocomiales a été conduit en 2002, au centre hospitalier de Meaux. Cette enquête a été menée à partir des données du laboratoire de microbiologie, avec validation clinique par le correspondant en hygiène de chaque service et le praticien en hygiène. Le but de cette étude était de sensibiliser les cliniciens aux infections nosocomiales dans le cadre de la nouvelle législation et de décrire à chaque service sa propre écologie des infections nosocomiales afin de proposer des stratégies de prévention adaptées. (Botterel et al., 2004)

I.3. Infections nosocomiales chez les nouveaux nés

Selon Kacet et al (2001), Les infections néonatales sont dues à une transmission maternelle mais maintenant la proportion des infections acquises à la maternité devient prépondérante.

L'infection nosocomiale peut aussi bien apparaître chez des nouveau-nés à terme que chez des prématurés mais l'incidence de ces infections est très augmentée dans la deuxième population. Les progrès techniques en termes d'optimisation de la ventilation, le surfactant, la surveillance hémodynamique échographique, la meilleure connaissance du prématuré en général sont quelques exemples qui expliquent l'augmentation de la survie des grands prématurés de moins de 1500 g.

La conséquence de ces infections est un accroissement de la morbidité et de la mortalité, de la durée d'hospitalisation et du prix de la prise en charge de ces prématurés. Le contrôle et la prévention des infections nosocomiales est donc un enjeu considérable en néonatalogie. (Jellimann, 2002)

Les infections nosocomiales du nouveau-né présentent plusieurs particularités. Jusqu'à la naissance, le nouveau-né n'a pas de flore endogène et il acquiert une flore cutanée et muqueuse à partir des germes des voies génitales maternelles et de l'environnement du service par l'intermédiaire du personnel soignant. (Harris et al., 2000)

La peau est fragile et facilement altérée surtout chez le prématuré. La gravité de la pathologie dans les Services de réanimation néonatale rend indispensable l'utilisation de mesures invasives malgré la grande fragilité des enfants qui nous sont confiés. (Harris et al, 2000).

I.4. Épidémiologie des infections nosocomiales néonatales

Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), l'infection néonatale est responsable chaque année d'un tiers de décès néonataux dans le monde. Les trois quarts de ces décès surviennent dans la première semaine et majoritairement dans les 24 premières heures qui suivent

l'accouchement. C'est ainsi que dans les pays développés, la mortalité néonatale précoce liée aux infections nosocomiales néonatales est de 12 % contre 9 % pour celle tardive. Deux-tiers de ces quatre millions de décès qui ont lieu chaque année, s'observe en Afrique et en Asie du Sud-est. L'Inde à elle seule en représente le quart. La majorité de ces décès sont dues aux INN bactériennes dans 30-40% des cas, suivi des accouchements prématurés dans 28% des cas. (Djoupomb, 2007)

Dans les pays développés, l'incidence des INN varie de 1 pour mille naissances vivantes à 4 pour mille naissances vivantes. C'est ainsi que pour 774800 naissances vivantes en France métropolitaine en 2001, l'INN représentait entre 774 et 3100 des INN certaines, et entre 2300 et 6200 des INN probables, et 10% pouvaient décéder. L'incidence des INN certaines en 2002 en France était de 1 à 4 pour mille naissances vivantes et celles des INN certaines associées aux INN probables de 3 à 8 pour mille. En 2003, on constate que les infections materno-fœtales sont relativement rares en France, soit une incidence de 0,5%, mais avec un potentiel de gravité élevé et un taux de mortalité néonatale précoce de 10% dans la dernière décennie du 20ème siècle. Malgré les nombreuses améliorations faites par l'OMS, l'impact des INN bactériennes dans les pays en développement en général et en Afrique en particulier, y est considérable. Elles sont responsables de 64% des hospitalisations en Afrique. Des études menées en Afrique ont montré une incidence pour mille naissances vivantes de 45 au Sénégal en 1994 et de 34 en Cote d'Ivoire en 1998. Une prédominance bactérienne des bacilles à Grams négatifs a été démontrée en Afrique contre une prédominance des Grams positifs dans les pays développés (Djoupomb, 2007)

I.5. Mécanismes de l'infection nosocomiale néonatale

Le nouveau-né, stérile à la naissance, est rapidement colonisé par des germes provenant de sa mère et de l'environnement. Tout apport de germes à risque pathogène déséquilibre cette colonisation. La prescription d'antibiotiques favorise ce déséquilibre et le développement de bactéries résistantes dans le tube digestif. Les nouveau-nés, très dépendants du personnel, sont soumis à des thérapeutiques « agressives » avec effraction des barrières cutanéomuqueuses et autant de portes d'entrée. Enfin l'enfant peut être contaminé au cours de son alimentation (Lachassinne et al., 2005).

I.6. Incidence et densité d'incidence (DI) d'infections nosocomiales bactériennes en unités de néonatalogie (INB)

Kacet et ces collaborateurs (2001) rapportent que, La fréquence de l'INB varie selon les unités de soins et leur recrutement, selon les habitudes de prescription et de recours à des procédures invasives. Les incidences rapportées varient ainsi entre 7 et 24,5 % et les DI entre 4,8 et 8,9/1000 jours d'hospitalisation. Selon l'expérience du réseau REAPED 5,9 % des nouveau-nés hospitalisés présentent une INB, soit une incidence de 7,2 % et une DI de 5,4/1000 jours (Sarlangue et al., 1998).

Une première enquête française réalisée pendant 3 mois en 1992 dans 18 unités de réanimation pédiatrique a confirmé l'incidence élevée des infections nosocomiales en pédiatrie. Dans le prolongement de ce travail, le Groupe Francophone de 30 Réanimation Pédiatrique a lancé un réseau de surveillance des infections nosocomiales en réanimation pédiatrique appelé projet « Réaped » (réanimation pédiatrique). De 94 à 95, 18 unités de réanimation néonatale et/ou pédiatrique réparties dans toute la France et ont collecté sur questionnaire une fiche de séjour de 4 525 enfants admis plus de 48 heures. Le taux brut d'infection était alors de 8,2 % dont 50 % de septicémie. La densité d'incidence était de 7,8 % jour cathéter. Pour le nouveau-né, la densité d'incidence sans cathéter était de 1 %, avec KTVO de 1,4 %, et avec KTVC de 5,2 %. (Jellimann, 2002)

I.7. Facteurs de risque d'infection nosocomiale bactérienne

I.7.1. Immaturité de l'immunité néonatale

Le facteur de risque principal de l'infection néonatale est l'immaturité immunitaire qui est d'autant plus importante que le nouveau-né est prématuré. Cette immaturité concerne aussi bien l'immunité spécifique que l'immunité non spécifique. L'infection quelle qu'elle soit, est la conséquence d'un déséquilibre en faveur des bactéries entre la virulence du germe et les défenses du nouveau-né (Djoupomb, 2007)

I.7.2. Moyens de défense du fœtus

La mise en place des organes et des cellules de l'immunité s'effectue progressivement au cours du développement fœtale. C'est le placenta et l'utérus qui assure le rôle de barrière pour protéger le fœtus contre les infections et qui empêchent le fœtus de subir les phénomènes de

rejet d'un organisme histo-incompatible. Il est certes vrai que le liquide amniotique contient plusieurs facteurs s'opposant à la croissance bactérienne et que le bouchon muqueux protège des germes contenus dans le vagin mais tout ceci n'assure qu'une faible protection. (Djoupomb, 2007)

I.7.3. Procédures invasives : densité d'incidence spécifique /durée d'exposition au risque :

Selon Kacet et al., (2001) , La présence d'un cathéter intravasculaire central majore le risque de septicémie (OR 3,81 à 7). Le risque du cathéter épicutanéocave est deux fois plus important que celui du cathéter posé chirurgicalement et 3,8 fois celui du cathéter veineux ombilical. Le risque est multiplié par 2,60 à 5,72 en cas de nutrition parentérale totale et par 5,8 à 9,4 en cas de perfusion de lipides. La durée du cathétérisme est un facteur de risque majeur : risque multiplié par 2,5 au delà de 15 jours de cathéter, par 3,8 pour un cathéter de Broviak maintenu plus de dix jours, par cinq pour un cathéter veineux ombilical au delà de sept jours.

Le risque nosocomial est donc apprécié en densité d'incidence spécifique (DIS), rapporté au nombre total de jours de cathéter, ce qui, associé au taux d'utilisation de cette procédure, permet la comparaison entre les sites. Dans l'étude du réseau EPIREAPED qui portait sur 7626 nouveau-nés hospitalisés plus de 48 heures, la DIS était de 3,1/1000 jours (3,2/1000 si cathéter ombilical et 4,8/1000 si cathéter veineux central).

Les différences peuvent être expliquées par des pratiques différentes : manipulations des tubulures, fréquence des hémocultures, taille des prélèvements, mais aussi par des politiques différentes de re-transfert.

- *La présence d'un cathéter périphérique.* Elle expose au risque d'infection locale : la densité d'incidence est de 26/1000 jours de perfusion et le risque d'IN est multiplié par 4,45 en cas de maintien plus de 48 heures surtout si la perfusion est posée sur la tête.
- *Le recours à la ventilation assistée.* Il majore le risque nosocomial : risque multiplié par 2,43 à 5,1. Dans ces pneumopathies associées à la ventilation mécanique le risque est majeur au delà de dix jours de ventilation cette DIS varie de 2,5 à 8,9/1000 jours de ventilation selon les études, selon la fréquence du recours à la ventilation assistée, le poids et le terme. (Kacet et al., 2001).

I.7.4. L'âge gestationnel et le poids de naissance :

L'incidence des infections nosocomiales peut, toutes infections confondues, atteindre 90 % avant 28 semaines. Ces différences peuvent être expliquées par l'immaturation des défenses anti-infectieuses, l'absence de transmission transplacentaire d'IgG chez le grand prématuré, la gravité des pathologies, un recours plus fréquent à des procédures invasives (cathéter central chez 62,5 % des moins de 1000 g et 45,2% de ventilation assistée chez les nouveau-nés de 1000 à 1500 g) et une durée de séjour plus longue. Le risque d'infection nosocomiale est multiplié par 4,5 si le terme est inférieur à 30 SA et par 5 si le poids est inférieur à 1000 g. Le risque lié à l'utilisation de procédures invasives est maximum pour les nouveau-nés de moins de 1500 g, avec une DIS des infections liées à un cathéter de 3,2 à 12,8/1000 jours de cathéter et une DIS des pneumopathies de 3,5 à 27,3/1000 jours de ventilation. (Kacet et al., 2001)

I.7.5. La corticothérapie postnatale :

Elle majore le risque nosocomial (risque multiplié par 1,7 à 2 au delà de 1500 g de poids de naissance). L'utilisation de céphalosporines de troisième génération augmente le risque de colonisation à *Enterobacter cloacae*. (Zafar et al., 2001)

I.7.6. Les autres facteurs de risques :

Ils sont beaucoup plus recherchés en cas d'infection materno-fœtale. Il s'agit de:

- Infection génitale ou antécédent de cervico-vaginite au cours du troisième trimestre de grossesse non traité;
- Infections urinaires ou antécédent d'infection urinaire au cours du troisième trimestre de grossesse non traité ;
- Une bactériurie asymptomatique au cours du troisième trimestre de grossesse ;
- Un portage vaginal asymptomatique de Streptocoque B chez la mère ;
- Une infection respiratoire : un état grippal ;
- Prématurité spontanée inexplicée < 35 semaines d'aménorrhée ;
- Température maternelle avant, ou pendant le travail = 38°C;
- Rupture prolongée des membranes > à 12 heures ;
- Un liquide amniotique teinté d'emblée, méconial ou d'odeur fétide ;
- Tableau évocateur de chorio-amnionite ;
- Jumeau atteint d'une infection materno-fœtale ;
- Une réanimation du nouveau-né dans des conditions d'asepsie douteuse;

L'existence d'un de ces critères nécessite une surveillance clinique particulièrement rapprochée pendant les 24 premières heures après l'accouchement.

II. Caractéristiques bactériologiques des souches a gram+ les plus incriminés dans les infections nosocomiales:

II.1. *Streptocoques du groupe B*

Les streptocoques du groupe B, *Streptococcus agalactiae*, est un germe non pathogène pour l'homme. Le réservoir du streptocoque du groupe B est le tube digestif qui contamine souvent le tractus génital de la femme ; le portage vaginal pouvant être transitoire. Il existe plusieurs sérotypes du streptocoque B dont les plus fréquents sont I, II et III ; les sérotypes IV et V sont plus rares ; certains restent non groupables.

Les trois sérotypes majeurs (I, II et III) sont retrouvés dans les infections précoces sans atteinte méningée, mais le sérotypes III est responsable de 85% des méningites à streptocoque du groupe B et de 90% des infections néonatales tardives. La prématurité est associée à un risque quinze à vingt fois plus élevé d'infection précoce à streptocoque du groupe B (Aujard, 2001).

La flore vaginale est à l'origine de la contamination du nouveau-né, réalisant une transmission verticale qui est démontrée par la similitude entre les sérotypes des streptocoques de la mère et ceux des souches isolées chez le nouveau-né. (Aujard, 2001).

L'incidence globale de l'infection à streptocoque du groupe B durant le premier mois de vie est de 2 à 5 pour mille naissances vivantes, les deux-tiers survenant dans la première semaine de vie. Ils sont responsables de 25 à 40 % des infections du nouveau-né et de plus de la moitié des infections materno-fœtales. Le streptocoque B colonise la peau ou les muqueuses de 50 % des nouveau-nés de mère ayant une culture vaginale et/ou anorectale positive à l'accouchement, ceci dans les 72 premières heures de vie. La mortalité est surtout le fait des formes précoces : 13 % contre 0 à 5% dans les formes tardives. (Aujard, 2001)

II.2. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des coques Gram + possédant une catalase, oxydase négative avec les réactifs habituels, et toujours immobiles. Les staphylocoques sont occasionnellement pathogènes et sont souvent en amas au Gram. D'autres bactéries possèdent les mêmes

caractères mais sont généralement les aérobies stricts contrairement aux *Staphylococcus* aéro-anaérobies. (figure 1)

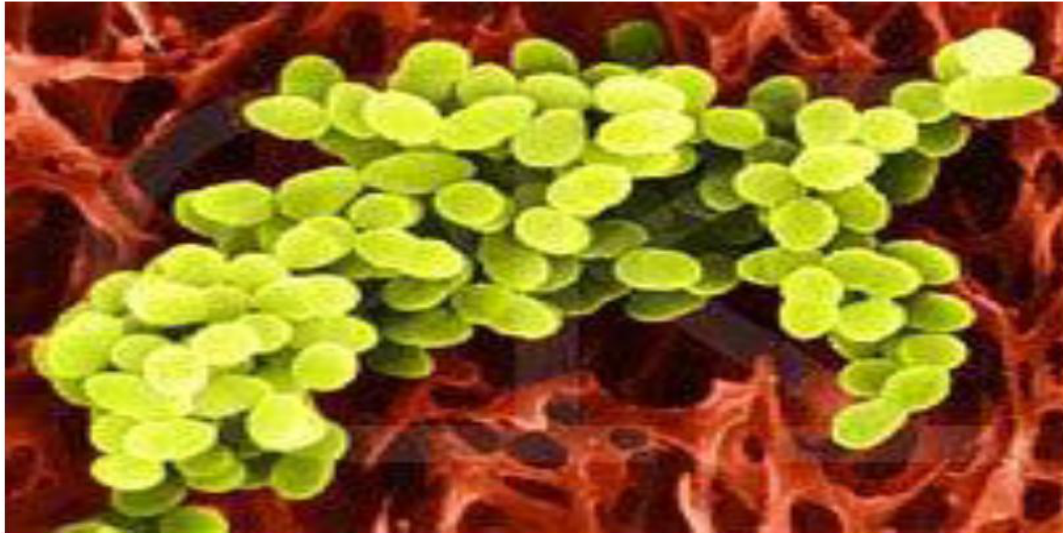


Figure 1. Image au microscope électronique de *S. aureus*.

Taille : 400 × 400

Les Cocci Gram +, catalase + sont des parasites des muqueuses et de la peau. On les trouve aussi dans la flore intestinale. Toutes les infections sont possibles particulièrement de la peau ou à partir de la peau. Différentes causes favorisent l'infection staphylococcique : les déficits leucocytaires, les déficits dans l'immunité humorale et les autres. Certains *Staphylococcus aureus*, extrêmement fréquents sont capables de produire une toxine thermorésistante dans des aliments, toxine qui déclenche un syndrome digestif peu grave. Elle agit comme un super antigène: c'est une immunotoxine. La prophylaxie des staphylococcies est particulièrement difficile. (Farmer et al., 1999 ; Lamnaouer, 2002)

II.3. Les *Staphylocoques* à coagulase négative

Les staphylocoques à coagulase négative sont les germes les plus fréquemment responsables d'infections nosocomiales, mais ils ne sont en cause que dans 1 % des infections materno-foetales. Ces infections s'observent surtout chez le grand prématuré et sont la conséquence d'une contamination massive du liquide amniotique. Des focalisations secondaires sont possibles : pleurésie, abcès sous-cutané, omphalite, mastite, méningite. Il a été constaté une

résistance des staphylocoques à coagulase négative nosocomiaux à l'action de la méticilline. (Aujard, 2001)

Tableau 1: Répartition des germes selon leur fréquence d'apparition. (DJOUPOMB NJANANG, 2007)

	Germes	Effectif	Pourcentage
Cocci A Gram Positifs	Streptocoque B	3	7, 1
	Streptocoque D	1	2, 4
	Streptocoques non groupables	1	2, 4
	Streptocoque A	1	2, 3
Total cocci grams positifs		6	14,2

Tableau 2: Germes cultivés selon la période néonatale. (DJOUPOMB NJANANG, 2007)

Germes		0 à 7 jours (%)	8 à 28 jours (%)	Total (%)
Cocci A Gram positifs	<i>Streptocoque B</i>	2 (6, 06)	1(11, 11)	3 (7, 1)
	<i>Streptocoque D</i>	1 (3, 03)		1 (2, 4)
	<i>Streptocoque A</i>	1 (3, 03)		1 (2, 4)
	<i>Streptocoque non groupable</i>	1 (3, 03)		1 (2, 3)
Total des		5 /6 (83,33)	1/6 (16,67)	6 (100%)

III. Mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques

Les cocci à Gram positif se caractérisent par la capacité d'évolution de leurs phénotypes de résistance aux antibiotiques, ainsi que par leur grande faculté d'acquisition de nouveaux mécanismes de résistance, que ce soit par l'intermédiaire de transferts de matériel génétique au sein d'une même espèce bactérienne ou entre espèces différentes. Étant donné le nombre important des espèces et l'étendue des mécanismes de résistance, nous concentrerons notre propos sur les principaux agents impliqués en pathologie infectieuse, en particulier en réanimation. (Quincampoix et al., 2001)

Tableau 3 : Répartition des germes selon leur pourcentage de sensibilité globale aux antibiotiques. . (DJOUPOMB NJANANG, 2007)

Antibiotiques	Cocci grams positifs
Ampicilline (N=36)	62,5
Cefotaxime (N=38)	71,43
Ceftriaxone (N=39)	62,50
Ceftazidime (N=38)	62,50
Gentamycine (N=39)	12,50
Nétilmicine (N=37)	14,29
Amikacine (N=38)	71,43
Imipénème (N=38)	87,50
Ciprofloxacine (N=35)	71,43
Ofloxacine (N=21)	66,70

N= nombre de fois tester

Les céphalosporines présentait une bonne sensibilité, allant de 62,5% à 73,43 %, sur les cocci grams positifs

Tableau 4 : Répartition des germes selon leur pourcentage de sensibilité spécifique aux antibiotiques. (DJROUPOMB NJANANG, 2007)

	Cocci a gram positif N=5	Streptocoque D N=1
Ampicilline	75	100
Cefotaxime	100	100
Ceftriaxone	80	100
Ceftazidime	80	100
Nétilmicine	25	0
Gentamycine	40	0
Amikacyne	75	100
Imipénème	100	100
Ciprofloxacine	75	100
Ofloxacine	100	100

N= nombre de fois isoler

On a une sensibilité importante des germes à l'imipénème, la ciprofloxacine et l'ofloxacine et une sensibilité meilleure à des germes à l'action de l'amikacine qu'aux autres aminosides.

III.1.Résistance chez les staphylocoques :

Staphylococcus aureus (SA) et les staphylocoques à coagulase négative (SCN) occupent une place importante en pathologie nosocomiale. Ces micro-organismes présentent très souvent une résistance multiple aux antibiotiques.

III.1.1.Résistance aux β -lactamines :

La résistance aux β - lactamines chez les staphylocoques repose sur deux grands types de mécanismes qui sont identiques pour les SA et pour les SCN : un mécanisme de résistance extrinsèque par production d'enzymes inactivant l'antibiotique et un mécanisme de résistance

Intrinsèque par modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) ou par acquisition de nouvelles PLP.

- **Résistance par production de β -lactamases**

Une β -lactamase est une enzyme qui hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines, les rendant inactives. L'existence d'une pénicillinase entraîne une résistance à la pénicilline G et aux pénicillines A (ampicilline, amoxicilline, etc.), aux carboxypénicillines (ticarcilline), et aux uréidopénicillines (pipéracilline). Ce mode de résistance est présent chez 90 % des isolats cliniques de SA. (Mainardi et al., 1996)

Le gène *blaZ* codant pour les pénicillinases de staphylocoque peut être porté soit par un transposon soit être chromosomique. La production de β -lactamases peut être constitutive ou, le plus souvent, inductible. L'activité des β -lactamines est restaurée en présence d'un inhibiteur de β -lactamases de type acide clavulanique, tazobactam ou sulbactam. (Mainardi et al., 1996)

- **Résistance par une protéine de liaison à la pénicilline additionnelle : la PLP2a**

Les PLP sont des protéines possédant une activité enzymatique (transpeptidases, carboxypeptidases ou glycosyltransférases) impliquée dans la synthèse de la paroi bactérienne et possédant une affinité pour les β -lactamines. La résistance à la méticilline, qui entraîne une résistance à toutes les β -lactamines, est déterminée par la présence d'un gène chromosomique (*mecA*) qui code pour la PLP2a. Cette PLP additionnelle a moins d'affinité pour les β -lactamines et en particulier pour la méticilline (De Jonge et al., 1993 ; Ryffel et al., 1992).

Ce mécanisme est présent chez les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et chez les SCN.

La régulation du gène *mecA* est principalement sous la dépendance de deux gènes : les gènes *mecI* (répresseur du gène *mecA*) et *mecR* (antirépresseur). La résistance conférée par *mecA* peut être homogène (résistance exprimée par toutes les souches) ou hétérogène (résistance exprimée seulement par une proportion des colonies filles issues d'une colonie mère exprimant la résistance). Chez les souches présentant une résistance hétérogène à la méticilline, le niveau de résistance n'est pas corrélé avec la quantité de PLP2a, mais semble être sous la dépendance de quatre gènes *fem A, B, C, D* (facteurs essentiels à la méticillino-résistance) chromosomiques impliqués dans la formation du pont interpeptidique pentaglycine du peptidoglycane.

À l'heure actuelle, aucun des gènes régulateurs impliqués dans la résistance aux β -lactamines ne permet d'expliquer le caractère hétérogène de cette résistance. (De Lancastre et al., 1993)

- **Autres mécanismes de résistance :**

Certaines souches présentent une résistance intermédiaire à la méticilline. Ces souches sont dites « borderline » et possèdent des CMI de l'oxacilline entre 4 et 16 $\mu\text{g/mL}$. Ces souches sont caractérisées par l'absence du gène *mecA*. (De Jonge BLM et al., 1993)

Deux types de mécanismes peuvent être impliqués. *Modification de protéines de liaison à la pénicilline autres que la PLP2a* Ce mécanisme définit les souches de type modifier *Staphylococcus aureus* (MODSA) présentant une résistance homogène de bas niveau à l'oxacilline (CMI < 16 $\mu\text{g/mL}$) chez des souches non productrices de β -lactamases. Le mécanisme impliqué peut résulter de mutations au sein des gènes codant pour les PLP, conduisant à une diminution d'affinité pour les β -lactamines ou à une hyperproduction d'une de ces PLP. (Chambers, 1997)

- **Mécanisme enzymatique :**

La résistance de telles souches peut également s'expliquer par une hyperproduction de pénicillinase ou par la production d'une méticillinase, enzyme hydrolysant les β -lactamines de classe M, (oxacilline, dicloxacilline, méticilline) inductibles par la méticilline (CMI de l'oxacilline 0,5–2 $\mu\text{g/mL}$).

III.1.2. Résistance aux aminosides

Ces antibiotiques agissent en inhibant la synthèse d'ARN. Ils se répartissent en deux groupes chimiquement distincts : le groupe de la streptidine (comprenant la streptomycine) et le groupe de la 2-déoxystreptamine (kanamycine, gentamicine, amikacine, nétilmicine). Cette classe d'antibiotique a naturellement une action bactéricide sur les staphylocoques. (Casin et al., 1997)

- **Mécanisme enzymatique**

Les enzymes inactivant les aminosides sont codées par des gènes plasmidiques ayant un fort potentiel de dissémination. Les trois phénotypes engendrés sont :

- phénotype K : résistance de haut niveau à la kanamycine et à l'amikacine due à une phosphorylase (APH-3') ;
- phénotype KT : résistance de haut niveau à la kanamycine, l'amikacine, et à la tobramycine, due à une adénylase (ANT-4') ;

– phénotype KTG : résistance de haut niveau à kanamycine, amikacine tobramycine, nétilmicine et gentamicine, induit par la présence d'une enzyme bi-fonctionnelle ayant des activités de phosphorylation et d'acétylation (APH-2''-AAC-6').

- **Mutations chromosomiques**

La résistance à la streptomycine est provoquée par un mécanisme de mutation de la cible de cet antibiotique. L'activité de la streptomycine n'est pas altérée par la présence des enzymes inactivant les autres aminosides puisque cette molécule appartient à un groupe chimiquement distinct. Il y a en France, depuis 1995, la réapparition de clones de SARM sensibles à la gentamicine. Cette population est devenue aujourd'hui majoritaire. (Lelièvre et al., 1999)

En 1999, à l'hôpital Broussais, 60 % des SAMR étaient sensibles à la gentamicine. Sur ces souches, l'association des glycopeptides et de gentamicine est synergique in vitro.

III.1.3.Résistance aux macrolides

Les macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS), inhibent la synthèse protéique en stimulant la dissociation du ribosome et du complexe ARN de transfertpeptide. Cela entraîne une terminaison réversible de l'élongation protéique. Les macrolides et les lincosamides (lincomycine et clindamycine) n'ont qu'une activité bactériostatique sur les staphylocoques alors que les streptogramines (pristinamycine, quinupristine–dalfopristine), qui résultent de l'association de deux composés A et B agissant en synergie et possédant une activité bactéricide.

Trois mécanismes sont impliqués : une modification de la cible de l'antibiotique, un mécanisme d'efflux et une modification enzymatique.

- **Résistance par modification de la cible de l'antibiotique**

Le mécanisme repose sur l'action d'une enzyme (méthylase) réalisant la méthylation d'une adénine de la sousunité 23s de l'ARN ribosomique. Ces méthylases sont codées par les gènes *erm* dont il existe au moins 20 variants .Le support des gènes *erm* peut être chromosomique ou plasmidique. (Roberts et al., 1999).

- **Résistance par efflux**

Trois gènes codant pour des systèmes d'efflux ont été décrits chez les cocci à Gram positif. Leur produit forme un transporteur protéique qui diminue l'accumulation de l'antibiotique dans la cellule. Les gènes *msrA* et *msrB* sont responsables d'un phénotype de résistance de type MS, c'est-à-dire d'une résistance inductible vis-à-vis des macrolides dont le noyau

comporte 14 et 15 carbones (C14 et C15) et au composé B des streptogramines, après induction par l'érythromycine. Le gène *mef* entraîne un phénotype de résistance nommé M, caractérisé par une résistance limitée aux macrolides en C14 et en C15. (Lina et al., 1999)

Il est localisé sur des éléments chromosomiques transférables par conjugaison et n'a jamais été retrouvé sur un plasmide. Les gènes *vga*, *vgaB* codent pour des protéines d'efflux du seul composé A des synergistines.

. Tous ces gènes sont retrouvés chez différentes espèces de SCN et chez SA.

- **Résistance par enzymes inactivatrices :**

Ces enzymes, qui modifient l'antibiotique lui-même, peuvent appartenir à la classe des hydrolases (gènes *vgb* et *vgbB* pour virginiamycine facteur B hydrolase), des acétyltransférases (gènes *linA* et *vat*) ou des phosphotransférases (gène *mphC*). Le support de ces gènes est souvent plasmidique.

– phénotype M : il se définit par une résistance limitée aux macrolides dont le noyau comporte 14 carbones (érythromycine) ou 15 carbones (azithromycine) et épargne les molécules apparentées (lincosamides et streptogramines). Il est dû à la présence du gène *mef*.

– phénotype MLSB : il se définit par une résistance aux macrolides, lincosamides et au composé B des synergistines. Ce phénotype peut être inductible ou constitutif. Le phénotype inductible semble prédominant chez les staphylocoques dorés sensibles à la méticilline, tandis que le phénotype constitutif prédomine chez les SAMR (gène *ermA* prédominant). Le déterminant *ermC* est d'avantage retrouvé chez les staphylocoques à coagulase négative sensibles ou non à la méticilline, de phénotype inductible ou constitutif. (Lina et al., 1999)

– résistance de type MSgB (macrolides et streptogramines B) : elle est inductible par l'érythromycine et touche les macrolides en C14 ou en C15 et les streptogramines B. Le gène responsable est *msrA*. (Lina et al., 1999)

– résistance aux associations synergiques (SgA+ SgB) : toutes les souches résistantes aux associations le sont au composé A (avec des CMI SgA ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$) et à ses dérivés (pristinamycine II, virginiamycine M ou dalfopristine), sans l'être obligatoirement au composé SgB. La résistance à ce type de composé rapportée chez les SA et les SCN est habituellement liée à l'accumulation de différents mécanismes tels que *vga* et *vat* et *vgb* situés sur différents plasmides, en association avec des gènes de méthylases. (Lina et al., 1999)

– la résistance aux lincosamides seule est médiée par le gène *linA*, rencontré chez SA et chez *S. haemolyticus*.

III.1.4.Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones inhibent la croissance bactérienne par arrêt de la réplication de l'ADN. Ces molécules ont une action ciblée sur les topo-isomérases. Les topo-isomérases regroupent les topo-isomérases de classe II, les gyrases, constituées de deux sous-unités GyrA et GyrB (codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*) et impliquées dans le relâchement de l'ADN, et par les topo-isomérases de classe IV (composées de deux sous-unités codées par les gènes *grlA* et *grlB*) qui entraînent un désenchevêtrement de l'ADN à la fin de la réplication

Trois mécanismes sont impliqués essentiellement

– la modification de la cible qui implique une mutation au niveau des gènes chromosomique *grlA* ou *grlB* de la topo-isomérase IV ;

– l'altération des sous-unités A ou B de la gyrase par introduction d'une mutation au sein des gènes *gyrA* ou *gyrB* ;

– l'efflux de (codée par le gène *norA*) : Chez les bactéries à Gram positif, la topo-isomérase de classe IV constitue la cible primaire, et une mutation de cette cible est nécessaire pour entraîner l'apparition d'un premier niveau de résistance aux fluoroquinolones. (Lina et al., 1999)

La résistance aux fluoroquinolones est croisée entre les différentes molécules. Chez les SAMR, le taux de résistance est supérieur à 90 %.

III.1.5.Résistance aux glycopeptides

Le mécanisme de résistance reste mal connu et semble être multifactoriel. Chez les SCN, le problème existe chez deux espèces, *S. haemolyticus* et *S. epidermidis*. Ces espèces affichent des CMI 50 à la teicoplanine supérieures à celles de la vancomycine).

Concernant les staphylocoques dorés intermédiaires aux glycopeptides (GISA), les données récentes traduisent l'existence de nombreuses modifications de la paroi bactérienne avec notamment une production accrue de précurseurs du peptidoglycane. (Mainardi, 1997 ; Sieradzki et al., 1999)

Le mécanisme exact reste inconnu. Il apparaît cependant que cette résistance repose sur des mécanismes distincts de ceux impliqués chez les entérocoques résistants à la vancomycine

(VRE), puisque aucun gène analogue à ceux impliqués chez les entérocoques n'a pu être mis en évidence chez les staphylocoques. (Mainardi, 1999)

III.2. Résistance chez les entérocoques :

Les entérocoques se caractérisent par une résistance naturelle aux pénicillines et une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides. (Leclercq, 1997)

L'espèce *E. faecalis* se caractérise en plus par une résistance naturelle aux lincosamides et aux sulfamides.

III.2.1. Résistance naturelle aux β -lactamines

L'isolement d'entérocoques responsables d'infections nosocomiales et, parmi ceux-ci, la part des souches multirésistantes aux antibiotiques, est en constante augmentation, notamment au cours de phénomènes épidémiques. (Schouten et al., 1999)

Parmi les souches fréquemment isolées en clinique en France, *E. faecium* possède des CMI50 égales à 8 $\mu\text{g/mL}$ pour la pénicilline G, tandis que pour *E. faecalis*, 100 % des souches ont une CMI < 4 $\mu\text{g/mL}$.

La résistance aux pénicillines chez les entérocoques peut être intrinsèque ou extrinsèque due à des mécanismes acquis.

- **Résistance intrinsèque**

Tous les entérocoques possèdent une PLP particulière (PLP5), de faible affinité pour les β -lactamines et responsable de CMI des pénicillines dix à 100 fois supérieures à celles retrouvées pour les autres streptocoques. De même, les céphalosporines sont naturellement inactives sur les entérocoques. (Patterson et al., 1988)

- **Résistance acquise**

Production de β -lactamases Ce mécanisme a été rapporté en Argentine, au Liban et aux États-Unis et ne concerne à ce jour presque exclusivement qu'*E. faecalis*.

Le support de cette résistance est un gène proche du gène *blaZ* codant pour la pénicillinase du SA, exprimé de manière constitutive. Les enzymes sont produites à bas niveau, conduisant à des CMI à la pénicilline comprises entre 4 et 8 $\mu\text{g/mL}$ et des CMI de l'ampicilline entre 2 et 4 $\mu\text{g/mL}$. Il est à noter que l'activité des pénicillines sur ces souches est restaurée en présence d'un inhibiteur de β -lactamases. Lorsqu'il existe, ce gène se trouve fréquemment associé à un haut niveau de résistance à la gentamicine. (Patterson et al., 1988)

Hyperproduction de la PLP5

Ce mécanisme de résistance est associé à des CMI de la pénicilline G de 8 à 32 µg/mL (Fontana et al., 1994)

Mutation de la PLP5

Ce mécanisme, dû à des mutations survenant près du site actif de la PLP5 chez *E. faecium*, conduit à des CMI de la pénicilline supérieures à 32 µg/mL chez *E. faecium* par diminution d'affinité de cette PLP pour les lactamines (Rybkin et al., 1998).

En France, les CMI de la pénicilline retrouvée chez *E. faecium* varient entre 4 et 128 µg/mL.

III.2.2. Résistance aux aminosides

- **Résistance naturelle**

Comme tous les streptocoques, les entérocoques possèdent une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides due à une anomalie de transport membranaire de ces antibiotiques. Chez *E. faecium*, la production naturelle d'une enzyme, la 6-N'acétyl transférase, confère un phénotype de résistance de type K (kanamycine), T (tobramycine), N (nétilmicine) épargnant la gentamicine. La synergie entre la gentamicine (CMI = 4–16 µg/mL) et les lactamines, permettant une action bactéricide, est conservée. (Leclercq R, Courvalin P, 1997)

- **Résistance acquise**

Mécanisme enzymatique

Chez *E. faecium*, la résistance à haut niveau aux aminosides (CMI > 1 000 µg/mL) est le fait des enzymes plasmidiques qui sont retrouvées chez les staphylocoques et conférant les mêmes phénotypes de résistance.

Mutations chromosomiques

Chez *E. faecalis*, le haut niveau de résistance à la streptomycine résulte de mutations ribosomales. Dans chaque cas, il en résulte une abolition de la synergie avec les pénicillines

III.2.3. Résistance aux macrolides et apparentés

Deux mécanismes sont impliqués dans la résistance de type MLS.

- **Résistance par modification de la cible**

Elle est le fait d'une méthylase codée par les gènes *ermA* ou *ermB*. Ces gènes présentent 100 % d'homologie avec les déterminants *erm* impliqués chez SA et entraînent des phénotypes de résistance MLSB constitutif ou inductible.

- **Existence d'un mécanisme d'efflux**

Deux déterminants sont impliqués chez les entérocoques :

- le gène *msrC* : il est retrouvé de manière ubiquitaire chez les *E. faecium*. Ce gène, chromosomique, code pour une protéine impliquée dans l'efflux de l'érythromycine, de la pristinamycine et de la virginiamycine (composé A). (Portillo et al., 2000)
- le gène *mef* : ce gène est retrouvé de façon irrégulière selon l'origine géographique des isolats d'entérocoques. Il est analogue au déterminant présent chez les staphylocoques et détermine le phénotype M.

III.2.4. Résistance aux glycopeptides

Les glycopeptides sont des inhibiteurs de synthèse de la paroi bactérienne. Ces molécules de taille importante forment des complexes délétères avec le dipeptide terminal (D-alanyl-D-alanine) des précurseurs du peptidoglycane. Le dipeptide ainsi fixé ne peut s'intégrer de manière normale au peptidoglycane déjà formé (Arthur et al., 1996).

La résistance à ces antibiotiques peut être de haut ou de bas niveau, acquise ou naturelle.

- **Résistance naturelle**

Trois espèces ont une résistance naturelle à la vancomycine : *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, et *E. flavescens* avec des CMI pour la vancomycine entre 2 et 32 µg/mL.

Ces souches restent sensibles à la teicoplanine (CMI = 0,5–1 µg/mL). Le support de résistance est le gène *vanC* qui est chromosomique et non transférable (Uttley et al., 1988)

- **Résistance acquise**

Cette résistance concerne essentiellement *E. faecium*, et *E. faecalis*:

- phénotype Van A : le gène *van A* code pour une enzyme (ligase) permettant la naissance d'un dipeptide terminal anormal (D-alanyl-D-lactate) de faible affinité pour les glycopeptides. Le déterminant de cette résistance, inductible par les glycopeptides et de haut niveau (CMI de 64 à > 1 000 µg/mL pour la vancomycine et CMI = 16–512 µg/mL pour la teicoplanine) est porté par un plasmide (ou transposon) ;
- phénotype VanB : le gène *vanB*, chromosomique, est retrouvé chez *E. faecium* et chez *E. faecalis* (Perichon et al., 1997)

La résistance est inductible par la vancomycine (CMI = 8–1 024 µg/mL) et non inductible par la teicoplanine (CMI = 0,5–1 µg/mL).

Présentation du service :

Le service de pédiatrie de l'établissement hospitalier spécialisé mère-enfant(EHS) de Tlemcen se présente sur un seul niveau : comprenant trois ailes ; l'une réservée aux nourrissons, ayant 12 mois (situé a l'est du service), la seconde aux enfants ayant 12 mois et plus (située a l'ouest du service). La troisième réservée aux bébés nés prématurément et mis en incubateurs ou couveuses (située au nord du service).

1. Matériel :

1.1.Lieu d'étude :

La totalité des souches appartenant à la flore a Gram positive, objet de notre étude, a été isolée a partir de l'unité de néonatalogie de l'EHS de Tlemcen.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, Au biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'université Abou –Bekr Belkaid-Tlemcen, durant une période allant du 21Avril au 03 juin 2013.

1.2. Milieux de culture :

1.2.1. Milieux de culture liquides :

- Bouillon nutritif (BN) (Fluka)
- Bouillon cœur cervelle (BHIB) (Fluka)
- Bouillon hypèrsalé a 65 g/l de NaCl.

1.2.2. Milieux de culture solides :

- Gélose chapman (Biomérieux)
- Gélose nutritive (Fluka)
- Gélose Bile Esculine Azide Agar (Fluka)
- Mueller Hinton (fluka)
- Gélose au sang

1.3.Réactifs :

1.3.1. Tests biochimiques :

- Système API Staph (BioMérieux)
- Eau oxygénée a 10 volumes
- Plasma humain
- Sang humain A+

1.3.2. Test d'antibiogramme

- Eau physiologique stérile a 0.9%
- Antibiotique en disque utilisés :

Tableau 5: concentration, diamètre critiques et règles de lecture interprétative (CA-SFM 2012)

	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Oxacilline(OX)	5µg	≤2	>2	≥20	<20
kanamycine (K)	30µg	≤8	>16	≥17	<15
Gentamicin(GN)	10 µg	≤1	>1	≥20	<20
rifampicine (RA)	5 µg	≤0,06	>0,5	≥29	<24
Tétracyclin (Te)	30 µg	≤1	>2	≥23	<21
Vancomycin(VA)	30 µg	≤2	>2	≥17	-
Cefoxitin(Fox)	30 µg	8	> 32	≥27	< 25

2. Méthodes :

2.1.Prélèvement réalisés en néonatalogie :

Des prélèvements ont été effectués a l'établissement hospitalier Spécialisé Mère et Enfant(EHS) de Tlemcen au niveau de l'unité de néonatalogie du service de pédiatrie entre du 21 Avril 2013 et le 03 Juin 2013, ciblant des prématurés qui ont une durée d'hospitalisation théorique supérieur a 48 heures ceux qui ont été inclus dans notre étude.

L'écouvillonnage est réalisé dans les conditions aseptiques (port des gants, utilisation des écouvillons stérile) et a partir de : l'anus, aisselles, portage nasale, liquide gastrique.

Les étapes suivantes décrivent la démarche à suivre pour l'identification de la flore à Gram+ (**Figure 2**)

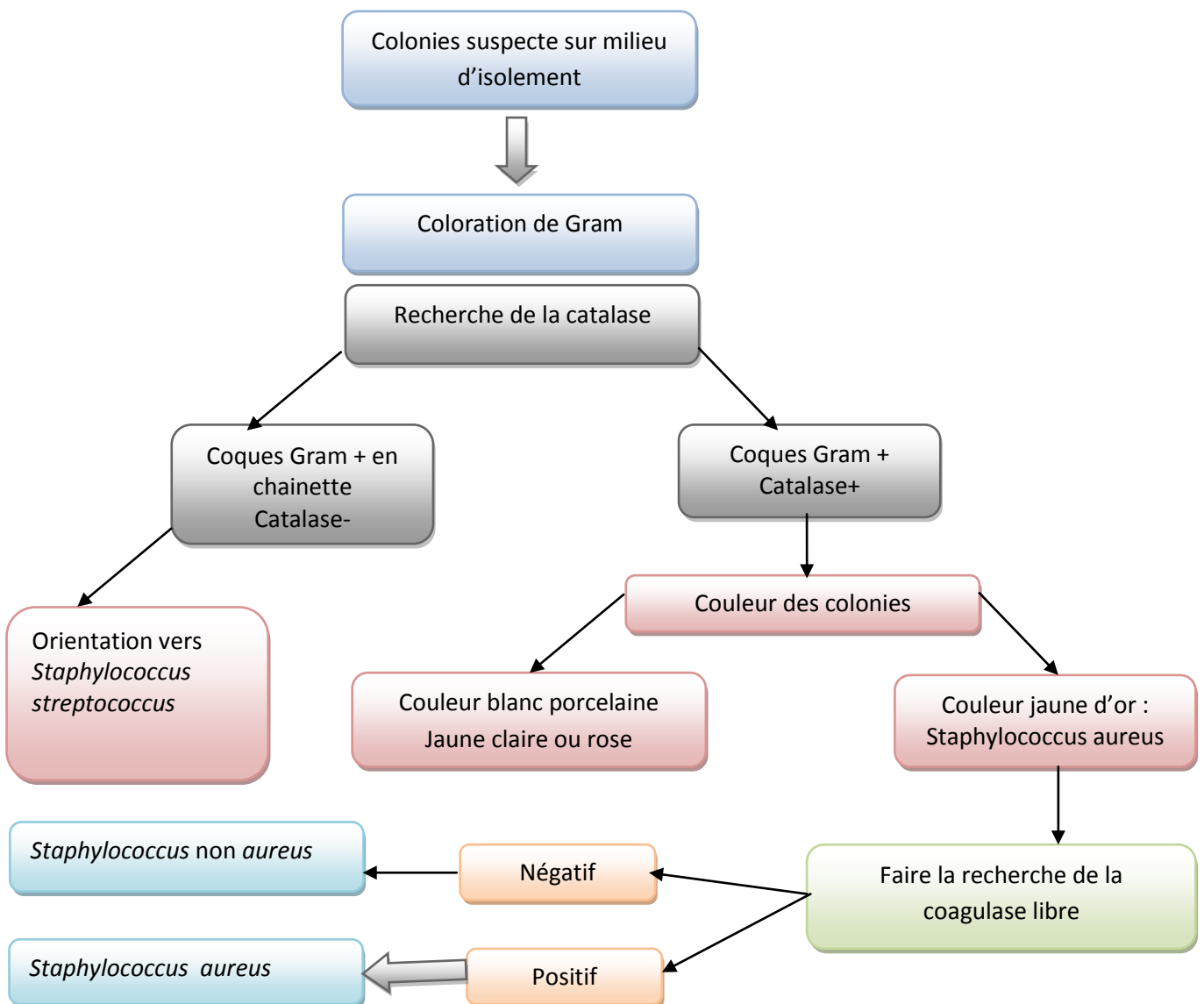


Figure 2: Organisation de l'identification de *Staphylococcus aureus*

2.2. Isolement et purification :

L'isolement a été réalisé par repiquage successif sur bouillon nutritif et sur milieu d'isolement.

2.2.1. Le milieu Chapman :

Est un milieu sélectif contenant une forte quantité en NaCl inhibant les bactéries Gram négatif (-) et favorisant les Gram positif (+) dans le but de sélectionner les staphylocoques, les milieux sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Chaque souche pure est ensemencée sur une gélose nutritive inclinée puis incubée à 37°C pendant 24 heures ensuite conservée à 4 °C.

Lecture :

Les staphylocoques pathogènes forment des colonies luxuriantes, pigmentées, entourées d'une auréole jaune due à la fermentation du mannitol. Les staphylocoques non pathogènes forment en général de petites colonies rouges qui ne modifient pas la teinte du milieu. Quelques souches de *Staphylococcus epidermidis* sont capables de fermenter le mannitol. Après 24-48 heures d'incubation, quelques souches d'entérocoques, de *Bacillus*, de *Micrococcus* et de *Serratia* peuvent cultiver.

2.2.2. Le milieu Bile-Esculine Azide Agar:

Milieu d'isolement sélectif des bactéries du genre Streptococcus appartenant au groupe D et les bactéries du genre Enterococcus.

Lecture :

➤ **Présence ou absence de culture (colonies)**

- **Présence :** présomption des bactéries du genre Streptococcus appartenant au groupe D et les bactéries du genre Enterococcus (uniquement présomption car les milieux ne sont pas sélectifs à 100%).
- **Absence :** les bactéries étudiées ne sont pas des bactéries du genre Streptococcus appartenant au groupe D et les bactéries du genre Enterococcus.

➤ *Couleur des colonies*

-Colonies entourées d'un halo noir

Un Précipité noir provenant de la réaction entre le produit d'hydrolyse de l'esculine et le fer III. Hydrolyse de l'esculine par les bactéries. Elles sont dites **esculinase +**

-Absence de halo noir :

Absence de précipité noir et donc de produit d'hydrolyse de l'esculine Les bactéries ne sont pas capables d'hydrolyser l'esculine. Elles sont dites **esculinase –**

2.3. Identification

Les souches isolées ont été pré-identifiées d'abord par des techniques microbiologiques standards (coloration de Gram, test de catalase et test de coagulase) puis identifiées par système API Staph (BioMérieux).

2.3.1. Coloration de gram :

Chaque souche isolée a fait l'objet de coloration de Gram pour vérifier son appartenance a la catégorie des bactéries a Gram positif qui sont colorées en violet.

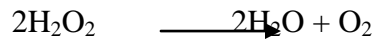
Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de cristal*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de Lugol, et de nouveau rincé rapidement.

-Soumettre alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. À ce stade les cellules a Gram- seront incolores, les cellules gram+ violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la fushine pour colorer les cellules gram- présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement X 100) (Singleton, 1999).

2.3.2. Recherche de la catalase :

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :

Catalase



Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O_2) (Marchal et *al*, 1991).

2.3.3. Recherche de la staphylocoagulase libre :

C'est une protéine qui provoque la coagulation du plasma de lapin, elle est sécrétée par les *staphylocoques* pathogène (*S. aureus*).

Technique :

Ajouter dans un tube à hémolyse 0,5ml de plasma humain et 0,5ml d'une culture de staphylocoques sur BHIB de 24h, le mélange est incubé à 37°C pendant 4 à 24h

Lecture :

Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum. (Jean et Guy ,2001)

2.3.4. Identification par le système API Staph (BioMérieux) (Dellaras, 2007)

API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification en fin de notice.

Principe

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans le médium des plaques API Staph 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.

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl_2 , CO_2 ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum

- Réaliser une préculture sur gélose Columbia au sang (ou Agar P) 18-24 H à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Vérifier l'appartenance de la souche à la famille des Staphylococcaceae et *Micrococcaceae* (morphologie, Gram, catalase...), ainsi que sa pureté.
- Ouvrir une ampoule d'API Staph Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation".
- Préparer une suspension bactérienne **homogène**, d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures). Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

Inoculation de la galerie

- A l'aide d'une pipette, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Mediumensemencé. Ne remplir que les tubes et non les cupules, sans dépasser le niveau du tube. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures.

Lecture de la galerie

- Après incubation, lire les réactions conformément au Tableau de Lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :

- Test VP : VP 1 et VP 2.

Attendre 10 minutes. Une couleur **rose franche** ou **violette** indique une réaction **positive**.

Une couleur **rose pâle** ou **rose claire** obtenue après 10 minutes doit être considérée **négative**.

- Test NIT : NIT 1 et NIT 2.

Attendre 10 minutes. Une coloration **rouge** indique une réaction **positive**.

- Test PAL : ZYM A et ZYM B.

Attendre 10 minutes. Une coloration **violette** indique une réaction **positive**.

- Noter les résultats sur la fiche de résultats.

Etablir le profil numérique de la souche et l'identifier à l'aide du catalogue analytique (annexe 2) ou d'un logiciel d'identification apiweb® :API 20 Staph v4.1.

2.3.5. Différenciation des streptocoques bile-esculine-positifs (Dellaras, 2007)

le **bouillon hypersalé** sert essentiellement à la confirmation et la différenciation des *Streptocoques bile-esculine-positifs*

-le **bouillon hypersalé** à 65g/l de NaCl est commercialisé, prêt à l'emploi (BioMérieux), mais sa préparation ne pose aucune difficulté. Ce milieu permet de différencier :

- Les « entérocoques vrais » durans qui se développent en 24 à 48h.
- Les « non –entérocoques » incapable de pousser.

-Gélose au sang (Dellaras, 2007)

La gélose au sang est un milieu différentiel et enrichi. Il permet de distinguer les bactéries hémolytiques des bactéries non hémolytiques

Les bactéries hémolytiques (*streptocoques, staphylocoques*) produisent des zones claires autour de leurs colonies, résultant de la destruction des globules rouges

Pour l'utilisation, faire fondre le milieu de base puis le laisser refroidir à 45°C avant d'ajouter 5% de sang défibriné stériles. Agiter doucement pour mélanger, et couler en boîtes de pétri stériles. Le milieu est ensuite ensemencé par épuisement en surface à partir d'une culture de 24 h sur BHIB prélevé des boîtes de BEA





Photo personnelle 1 : les étapes de préparation du Gélose au sang

2.4. Conservation des souches

Les souches sont conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinés a une température de 4°C (ces bactéries sont placés dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue)

-Après incubation de 24 h on ajoute du (BHIB+ Glycérole) d'un volume équivalent a 3ml qui est préparer et stériliser au préalable aux tubes et pour rincer la culture

-Appliquer une agitation avec le vortex. Le liquide est coulé ensuite dans des tubes à épindorf et la conservation se fait a une T° de - 80°C. (photo personnelle 2).



Photo personnelle 2 : conservation des souches dans des tubes a épindorf

2.5. Antibiogramme des souches isolées (CA-SFM, 2013)

A la suite des recommandations du Comité d'Experts de la Standardisation biologique de l'OMS (rapports techniques n° 610, 1977), la Société Française de Microbiologie a créé un

Comité de l'Antibiogramme (CA-SFM) chargé de déterminer les valeurs critiques qui délimitent les catégories cliniques (antérieurement catégories thérapeutiques) et de proposer un guide pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Technique de l'antibiogramme

Préparer un inoculum à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement (gélose nutritive, Chapman). Racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, décharger dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

Homogénéiser et ajuster la suspension bactérienne jusqu'à atteindre une opacité équivalente à 0.5 Mc Farlan. Ajuster en ajoutant, soit de la culture à la suspension bactérienne, si la densité est faible soit de l'eau physiologique stérile si elle est trop forte.

Le milieu Mueller-Hinton (MH) coulé en boîtes de Pétri, l'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

Trempé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum, puis frotter sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.

Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'une boîte de Pétri est ensemencée.

Application des disques d'antibiotiques

Six disques d'antibiotiques sont appliqués par boîte, ils sont espacés de 24 mm, centre à centre. Appliquer chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince stérile ou à l'aide d'un distributeur. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé.

Les boîtes sont, ensuite, incubées immédiatement pendant 18 heures en atmosphère ordinaire à 37°C.

Mesurer les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle.

Comparer les résultats aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture, puis la bactérie est classée dans l'une des catégories: sensible, intermédiaire ou résistante

1. Prélèvement

L'étude prospective de la colonisation des nouveau-nés par des bactéries à Gram + a été menée aseptiquement par écouvillonnage à l'unité de néonatalogie de l'ESH de Tlemcen à partir de : l'anus, aisselles, narines, liquide gastrique (tableau6).

Tableau 6: résultats des prélèvements effectués à l'ESH-Tlemcen

Service	Site de prélèvement	Positive	Négative	Totale
néonatalogie	Portage nasale	56	9	65
	Aisselles			
	Anus			
	Liquide gastrique			

Soixante-cinq prélèvements ont été réalisés sur différents prématurés. Neuf (13,8%) n'ont pas permis de mettre en évidence des colonies bactériennes, ils sont dits « négatifs ». Sur l'ensemble des 56 prélèvements positifs (86,2%), 78 souches bactériennes ont été isolées et identifiées (Figure3).

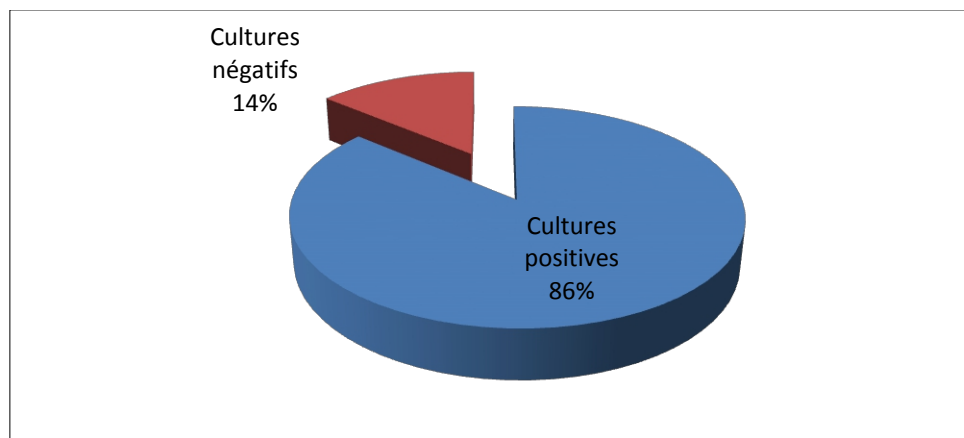


Figure 3 : Répartition des prélèvements

La répartition des 78 souches isolées est illustrée dans la figure 4 qui représente la répartition des germes selon la coloration de Gram : 61 souches (78%) étaient des cocci à Gram + et 17 souches (22%) étaient des cocci à Gram négatif (figure 4).

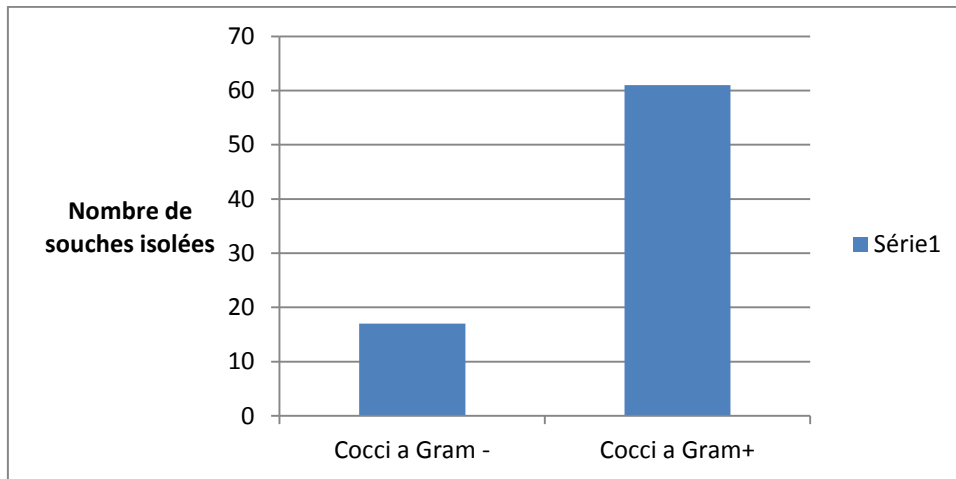


Figure 4: Répartition des souches isolées selon la coloration de Gram

2. Isolement et identification

Pendant une période de trois mois des écouvillons ont été systématiquement prélevés chez 28 prématurés. les caractéristique de la population étudiées sont citées dans le tableau si dessous (tableau7).

Tableau 7 : Caractéristique de la population étudiée.

	Totales patients inclus Nombre=28
Sexe ratio	
Masculin(%)	12 (42,85)
Féminin(%)	16 (57,14)
Accouchement	
Voie base	27
Forceps	1
Age gestationnel	
28-32 SA	15
33-36 SA	10
≥ 37 SA	3

Poids a l'admission(g)	
1000-1499	11
1500-1999	3
2000-2499	3
2500-3999	10
≥ 4000	2

2.1.Aspect des colonies

➤ Aspect des colonies sur milieu **BEAA** :

- Lecture :

La formation d'un **précipité noir** (photo3).

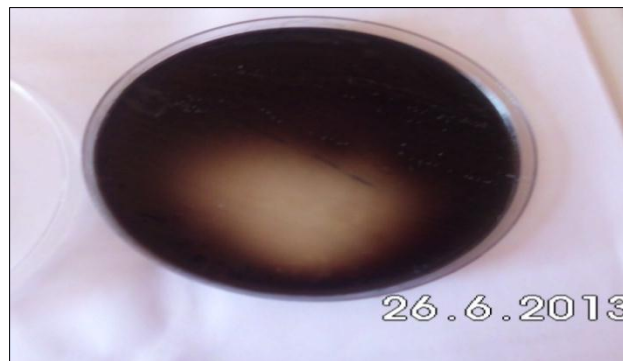


Photo personnelle 3 : formation d'un précipité noir (esculinase+)

Les résultats obtenus après la coloration de Gram nous ont permis d'éliminer presque la moitié des souches qui sont des cocci à Gram-

L'observation de petites colonies, entourées d'un halo noir vas nous orienter vers les cocci a Gram +, sans catalase → ce sont des Streptocoque.

- Résistance à la bile et à l'azide, dégradation de l'esculine → streptocoque du groupe D ou des entérocoques.
- La différenciation des entérocoques a été faite par une culture sur milieux hostiles : hypersalé à 65g/L pendant 24 heures.
- Les souches cultivées sont réensemencées sur BEAA pendant 24 h.
- Les souches : à culture(+) sur BHIB + Nacl et qui sont esculine (+) ⇔ sont des *entérocoques* (photo4).



Photo personnel 4 : aspect des souches a culture (+).

▪ **une identification à partir de la gélose au sang frais :**

Les souches non cultivables sur milieu Hostile sont identifiées sur la gélose au sang frais pour voir le type d'hémolyse.

Les colonies sont petites, translucides avec une hémolyse partielle, totale ou NH. Constituées de coques ovalaires, Gram+ sans catalase (photo personnelle 5).



Photo personnel 5 : aspect des colonies sur gélose au sang frais.

- Après ces 2 test d'identifications les cocci a Gram + isolées sur milieu BEAA sont des entérocoques et qui présent presque la moitié des souches isolées avec un pourcentage de 45 % ainsi des streptocoques qui présente le reste et avec le type d'hémolyse : α , β ou non hémolytique, la répartition a été donner 23 % pour les *streptocoques* α -*hémolytique*, 18 % aux *streptocoques* β -*hémolytique* et 14 % pour les *streptocoques non hémolytique* .la répartition des souches est illustrée dans la figure5 :

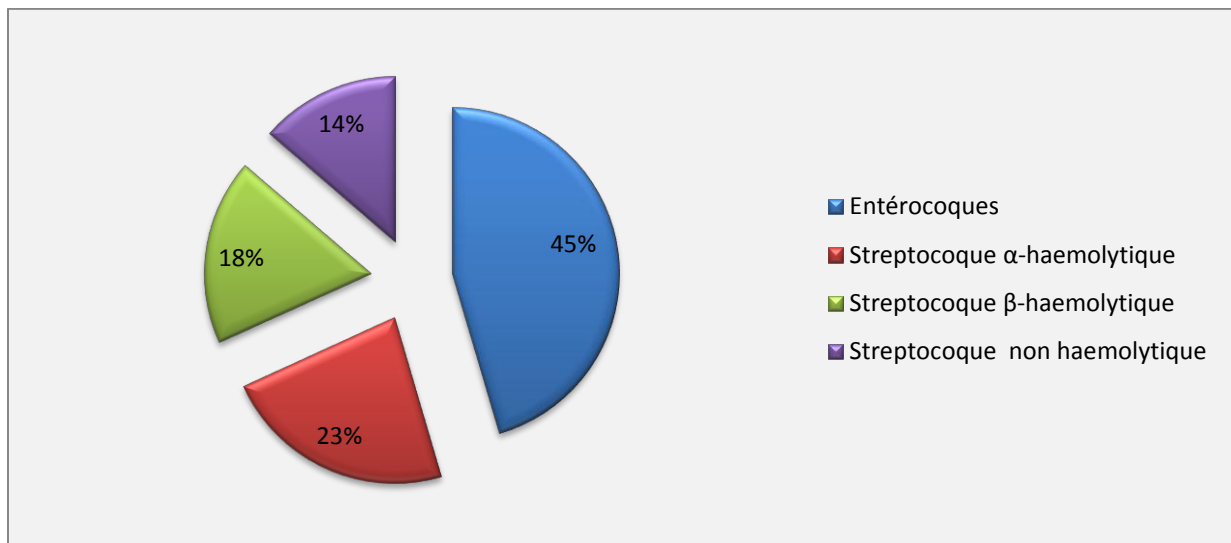


Figure 5: répartition des souches des streptocoques isolées.

- Sur gélose Chapman, nous avons observés deux aspects majeurs :
- Des colonies jaunes entourées par une zone jaune ;
 - Des colonies blanches entourées d'une zone rouge ou pourpre (photo personnelle 6)

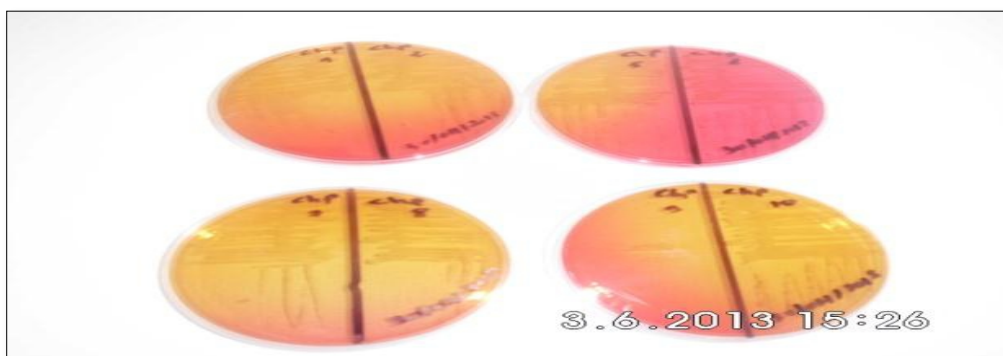


Photo personnelle6 : aspect des colonies sur gélose Chapman

2.2 .coloration de Gram

La coloration différentielle pour les 39 souches isolées du milieu Chapman a mis en évidence des cocci sphériques, en grappe de raisin, en paires, colorés en violet (photo personnelle 7).

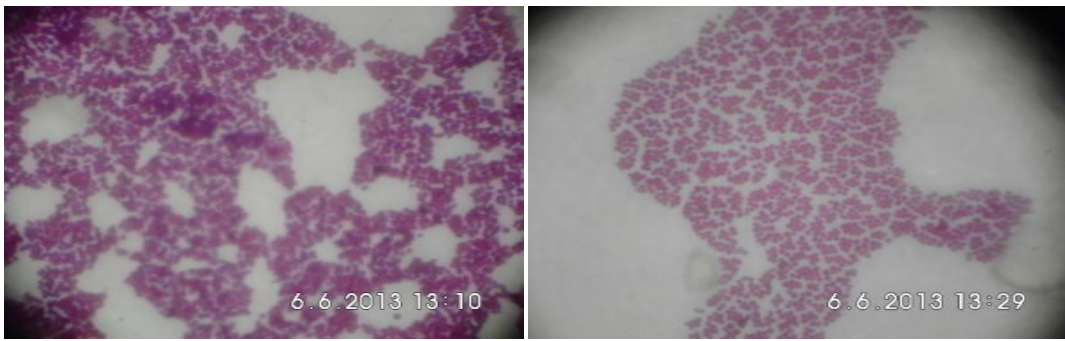


Photo personnelle 7 : observation microscopique au microscope optique a l'immersion (objectif x100)

2.3. Test catalase

Toutes les cocci à Gram positif, testés pour la production d'une catalase, décomposent l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz. (Photo personnelle 8).

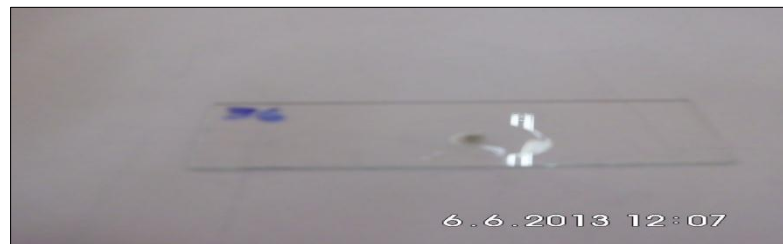


Photo personnelle 8 : production de catalase par les cocci a Gram positif isolés

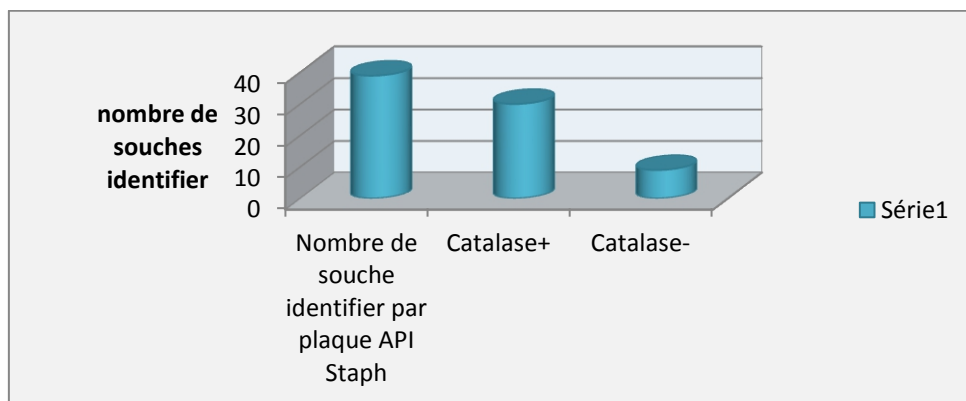


Figure6:répartition des souches selon le test catalase

2.4. Test coagulase libre

Les cocci a Gram positif, catalase positive, testés pour la production d'une coagulase présentent un phénotype variable ; (photo personnelle 9)

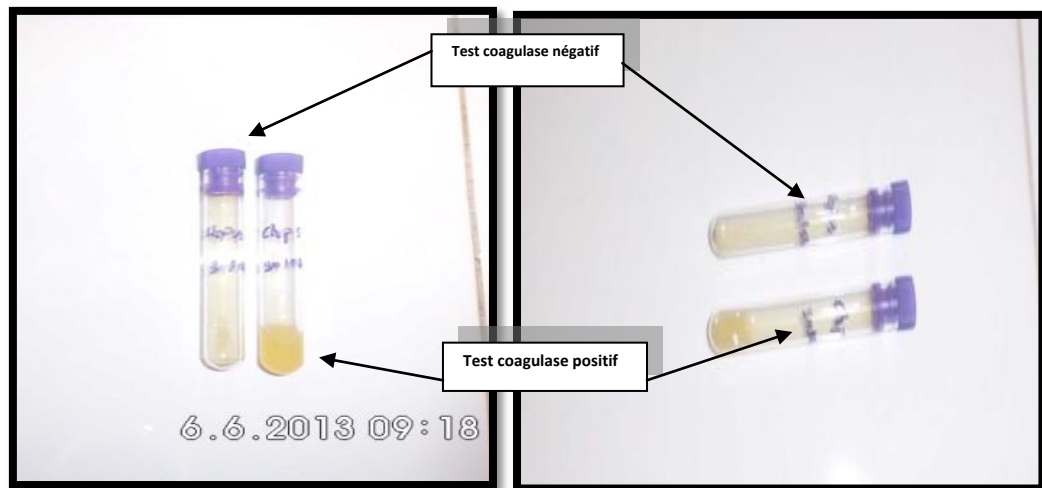


Photo personnelle 9 : observation du test coagulase libre

2.5. Identification biochimique par API®Staph BioMérieux®

Le système API Staph (BIO Mérieux) ® nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques des espèces appartenant au genre *staphylococcus*.

L'identification de chaque souche est établie dans le profil numérique proposé par le logiciel apiweb®API 20Staphv4.1.

➤ Identification des souches isolées



Photo personnelle 10 : identification de *S. aureus* (prélevé d'aisselles) par galerie API Staph



Photo personnelle 11 : identification de *S.haemolyticus* (prélevé de l'anus) par galerie API Staph

✓ **Répartition :**

- *selon le test coagulase* (figure7):

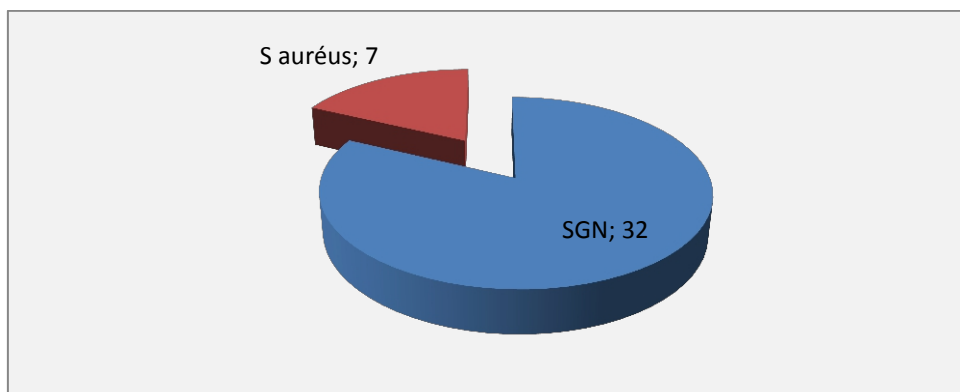


Figure 7 : répartition des espèces étudiées selon leur nature.

La figure 7 illustre une dominance primordiale avec un nombre de 32 pour les Staphylocoques à coagulase négative (SCN), ce qui pourrait s'expliquer par leur prédominance dans la flore commensale cutanée et 7 souches pour *staphylococcus aureus*.

Nos résultats corroborent avec ceux trouvés par les membres du réseau REAPED que Les *staphylocoques* à coagulase négative, en cause dans 35 à 45 % des INB du nouveau-né, dans 45 à 65 % des septicémies mais dans 85 % des septicémies sur cathéter. Les *staphylocoques* dorés sont responsables de la majorité des infections cutanées et postopératoires, de 3 à 16 % des bactériémies et de 9 à 27 % des pneumopathies (Sarlangue et al., 1998)

- ***Répartition des souches selon l'identification par plaque API Staph***

Les résultats de l'identification de la totalité des 39 souches appartenant au genre *Staphylococcus* sont :

15 *S. haemolyticus* ,7 *S.aureus* ,4 *S.saprophyticus* , 2 *S.épidermidis* , 2 *S.hominis* ,2 *S.lentus* , 1 *S. xylosus* ,1 *S. simulans* , *S. wernerie* ,1 *S. caprae* , 1 *S. chromogènes* , 1 *S. auricularis* , 1 *Micrococcus spp* , 1 *S. capitis* .(Figure 8)

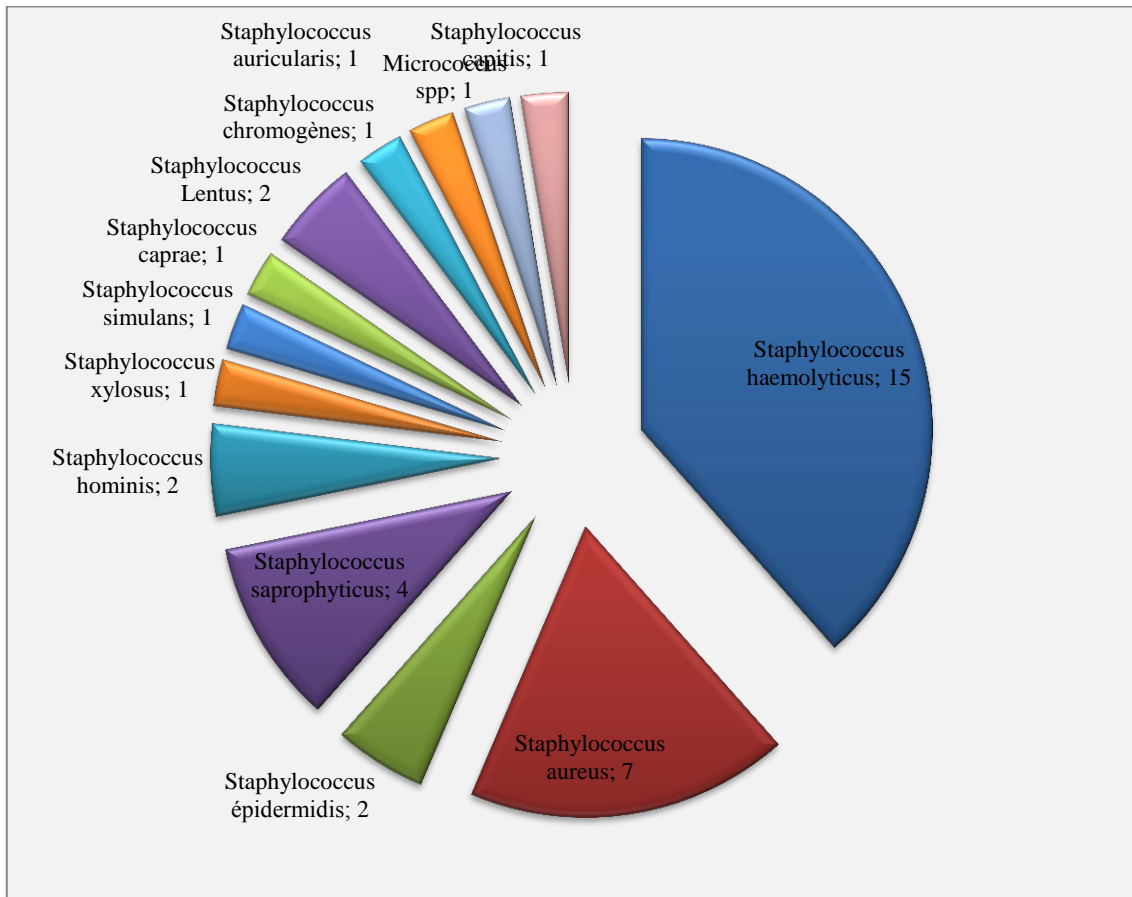


Figure 8: répartition des souches de Staphylocoques identifiées par plaque API Staph

Nous constatons à partir de la répartition des souches bactériennes identifiées présentées dans la figure 8 que l'espèce *Staphylococcus haemolyticus* est majoritaire (avec 15 souches). Dans d'autres études C'est *Staphylococcus epidermidis* qui est le plus souvent identifié, mais on observe l'émergence de *Staphylococcus haemolyticus* et *warneri* (Piette et Verschraegen., 2009)

En milieu hospitalier, les staphylocoques à coagulase négatif sont présents et prédominants dans le tube digestif avant le 4^{ème} jour de vie, associées à du staphylocoque *aureus*. La colonisation par les entérocoques est retardée. La colonisation par les autres

bactéries pathogènes opportunistes du milieu hospitalier augmente avec la durée de séjour (Borderon et al, 1996).

Les bactéries à Gram +, en particulier *Staphylococcus aureus* et *epidermidis* et les entérocoques sont impliqués respectivement dans 45 à 60 % des infections nosocomiales (Bedu et al., 1996, Desplanque et al.,1996).

Les staphylocoques coagulase- sont une cause majeure de bactériémie nosocomiale et d'infection sur cathéter (Desplanque et al., 1996).

Toutefois, certains germes Gram +, classiques de l'infection materno-foetale (streptocoque B, *Listeria*), peuvent être responsables d'infections nosocomiales avec transmission manu portée ou par un matériel contaminé (Bedu et al., 1996) .

3. sensibilité aux antibiotiques :

L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des espèces isolées à partir de l'unité de néonatalogie de l'ESH Tlemcen s'avère d'une importance primordiale, vu qu'elle oriente le choix du traitement direct et permet de réduire la pression de sélection exercée par les antibiotiques.

Sur 39 espèces identifiées soit un pourcentage de 100%, nous avons effectué un antibiogramme pour 16 isolats soit un pourcentage de 44 % et les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 8.

Tableau 8 : résultats d'antibiogramme pour 16 espèces appartenant au genre *Staphylococcus* isolées a partir du service de néonatalogie (EHS – Tlemcen)

Souches	Espèce	Oxacilin OX	Kanamyci n K	Gentamici n GN	Rifampin RA	Tetracyclin TC	Vancomyci ne VA	Cefoxitin FOX
Chap1	S.saprophiticus	R	R	R	R	S	S	R
Chap2	S.haemolyticus	R	R	R	R	S	S	R
Chap3	S.haemolyticus	R	R	R	R	S	S	R
Chap4	S.capitis	R	R	S	R	R	S	R
Chap5	S.haemolyticus	R	R	R	R	S	S	R
Chap6	S.saprophyticus	R	R	R	R	R	S	R

Chap7	Micrococcu s spp	R	R	S	S	S	S	R
Chap8	S.haemolyti cus	R	R	S	R	S	S	R
Chap9	S.haemolyti cus	R	R	R	R	S	S	R
Chap10	S.haemolyti cus	R	S	S	R	R	R	R
Chap10T	S.haemolyti cus	R	R	S	S	R	R	R
Chap13	S.haemolyti cus	R	S	S	S	R	S	R
Chap14	S.lentus	R	S	S	S	R	R	R
Chap15	S.saprophyt icus	R	R	S	R	S	S	R
Chap16	S.haemolyti cus	R	R	R	S	S	S	R
Chap17	S.lentus	R	R	S	R	S	S	R
Résistances (%)	/	93,7	75	3,7	68,7	3,1	12,25	100

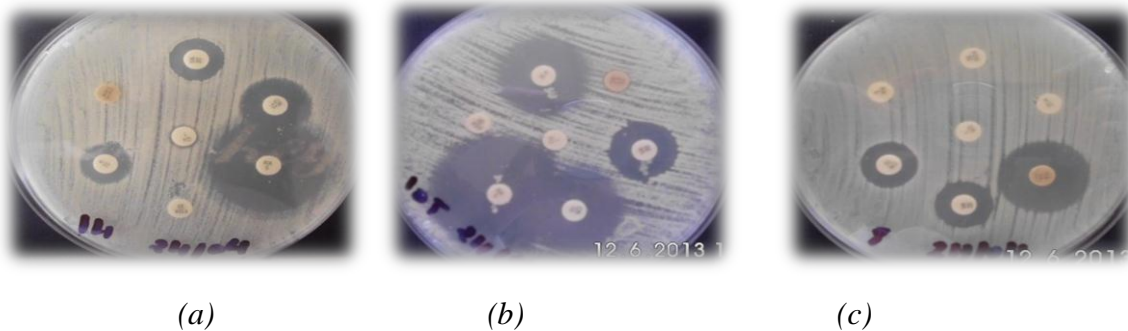


Photo personnelle 12 : effet disques d'antibiotique sur différentes souches :

S.lentus (a), *S.haemolyticus* (b), *S.haemolyticus* (c),

Les espèces étudiées ont présenté des taux élevés de résistance à toutes les familles d'antibiotiques sauf à la Gentamycine, Tétracyclines et la Vancomycine. (Figure 6)

Ces isolats cliniques ont révélé une résistance importante avec un pourcentage de 100% à l'égard de la Cefoxitine (FOX) et un pourcentage de 93,7% vis-à-vis l'Oxaciline (OX). (figure6)

Un pourcentage de résistance assez élevé a été signalé chez les autres souches vis-a-vis du Kanamycine (K) avec un pourcentage de 75%, la Rifampine (RA) avec un pourcentage de 68,7%. (Figure 9)

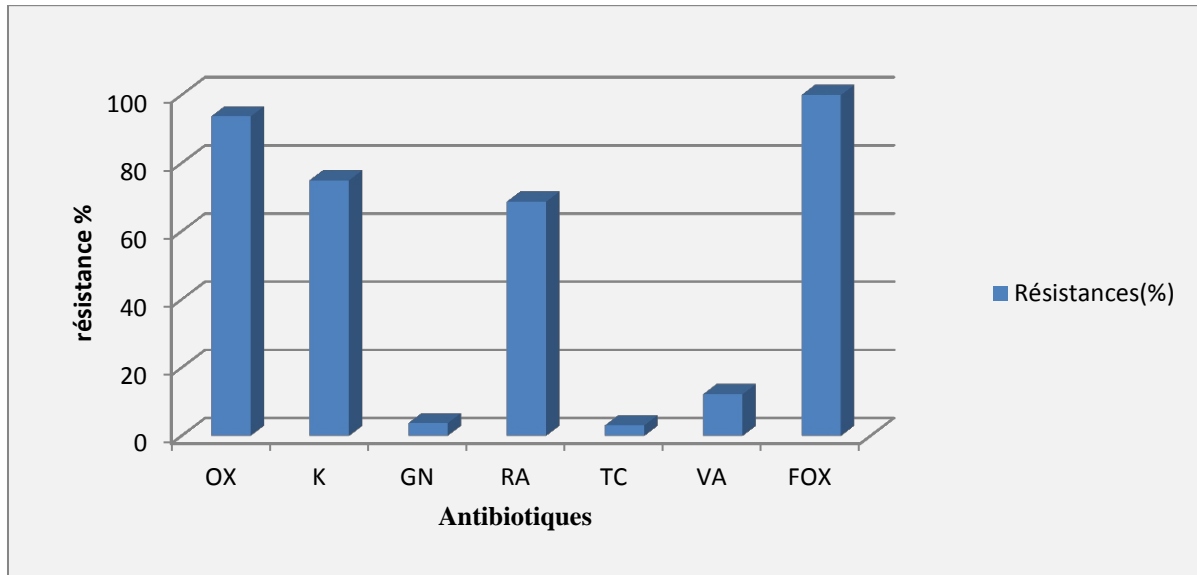


Figure 9: pourcentage de résistance des espèces étudiées vis-à-vis les antibiotiques testés.

Ces résultats corroborent avec des résultats montré par des recherches qui ont été faite au Nigéria, 6,4 % et 4,3% des souches de *S.aureus* sont respectivement résistantes à la méticilline à Ibadon et a Lagos. Aucune de ces souches n'est résistante a la gentamicine (Acar et al., 1999).

➤ **La multirésistance des espèces étudiées :**

Dans cette étude, la multirésistance est définie par la résistance d'une souche à 3 et plus de molécules d'antibiotiques

Parmi les espèces étudiées, aucune n'a présenté le phénotype sauvage, et aucune souche n'a était résistante a moins de 3 antibiotiques. (Figure10)

En moyenne 6 souches ont été résistante à 5 antibiotiques, 8 souches ont été résistante à 4 antibiotiques et 2 souches résistent à 3 antibiotiques. (Figure10)

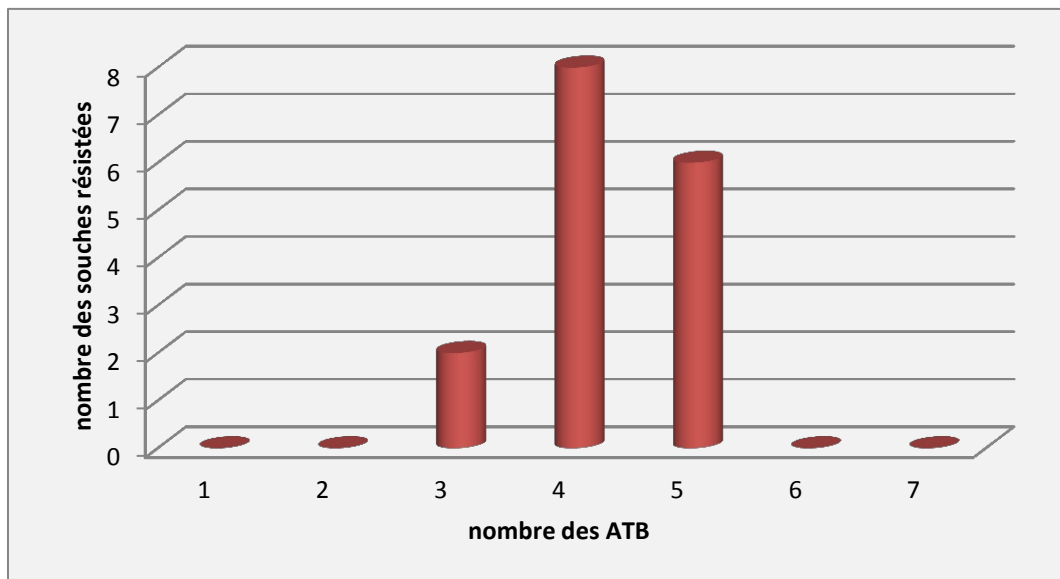


Figure 10: la multi-résistance des espèces étudiées vis-à-vis les antibiotiques testés

Une diminution de l'activité de la Vancomycine (CMI 8-16 mg/l) avait été mise en évidence parmi les souches de Staphylocoques coagulase négative de même qu'une diminution de celle-ci (CMI : 4 mg/l) sur *S.aureus*. une souche de *S.aureus* présentant une résistance de faible niveau (CMI 8 mg/l) a été récemment décrite au Japon et aux USA (Hiramatsu et al., 1997).

En général, tous les nouveaux nés sont prélevés régulièrement (une fois par semaine) afin de rechercher un portage. Les sites prélevés sont le nez/rhinopharynx, l'anus et parfois un site cutané, les selles et le liquide gastrique.

En cas de portage ou d'infection avec une BMR, il faut isoler le patient. Cet isolement est dans la mesure du possible géographique (chambre seule ou avec d'autres patients BMR) et technique (Lavage des mains, gants, blouse spécifique. Une signalisation à l'aide d'une pancarte spécifique à l'entrée de la chambre peut être adjointe. Le port de masque, coiffe et surchaussures n'est en générale pas recommandée. Ses mesures sont à maintenir jusqu'à la sortie du malade. Un traitement antibiotique visant à éliminer un portage de BMR n'est pas recommandé car il ne fait qu'augmenter la pression de sélection des antibiotiques (Alexandre Lapillonne., 2010).

Durant la période de notre étude nous avons trouvé un pourcentage élevée de germe dans l'unité de néonatalogie de l'ESH de Tlemcen. Cette colonisation augmente le risque d'infection nosocomiale.

Dans l'écouvillonnage nous avons basée sur l'écologie du nouveau née ces résultats devrez être discuté a l'échelle de ce service ainsi les utilisées en vue de s'orienté vers des nouvelles mesures de prévention.

La colonisation postnatale par des bactéries multi résistantes est fréquente en néonatalogie et peut être suivie, mais pas toujours, d'infection en particulier chez l'enfant prématuré.

Les infections nosocomiales restent une préoccupation constante dans les unités de néonatalogie. Le respect des règles d'hygiène par l'ensemble du personnel soignant et médical peut permettre une diminution significative du taux des infections. Leurs conséquences médicales et économiques justifient des mesures de surveillance et de prévention dont les principes sont bien définis.

Les règles de base en hygiène reposent sur le respect des précautions standard dont le principe de base est de considérer tout patient comme porteur potentiel d'agent infectieux connu ou inconnu.

Leur objectif est donc d'assurer une double protection à la fois du soignant et du soigné.

La formation en hygiène hospitalier est un élément essentiel de la prévention de l'infection nosocomiale et de la qualité des soins.

L'hygiène des mains reste la mesure de base pour réduire l'incidence des infections nosocomiales son importance est capitale dans un service de néonatalogie.

L'organisation d'un programme de lute et de prévention contre les infections nosocomiale en milieu hospitalier pédiatrique ainsi que tous les autres services.

1. Acar.J, Glauser.O, Moreillon.Ph. (1999). antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Edition Marketing S.A,Paris, ;2-7298-4712-X.
2. Alexandre Lapillonne. (2010).Conduite pratique face à un nouveau-né hospitalisé et porteur d'une bactérie multi-résistante. Université Paris Descartes, Institut de Puériculture et de Périnatologie, Paris.
3. Aujard Y, Baumann C, Bedu A, et al. (1993). Infections nosocomiales bactériens du nouveau -né. Journées parisiennes de pédiatrie, Flammarion Médecine-Sciences. 56-66
4. Ahoyo A.-T, Baba-Moussa. L, Makoutode. M, Gbohoun. A, Bossou. R, Dramane. K, Sanni. A, Prévost. G. (2006). Incidence de Staphylococcus aureus résistant a la méticilline dans le service de néonatalogie du centre hospitalier département du Zou et des Collines in Bénin. Archives de pédiatrie .13:1391-1396.
5. Aujard.Y. (2001). Infections néonatales (I). Encyclopédie médico-chirurgicale, pédiatrie, 4-002-R-90,16p.
6. Arthur M, Reynolds PE, Depardieu F, Evers S, Dukta-Malen S, Quintiliani R, et al. (1996).Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. J Infect Dis ; 32 : 11-6.
7. Bejaoui M, Bibi D, Cheloufi M, Hamza M. Infection nosocomiale du NS. (1991). Etude sur cinq années. Revue maghr de Pédiatrie, 5 : 9-15.
8. Bedu A, Diakite B, Bonacorsi S, Dincen E, Aujard Y. (1996). Infections nosocomiales bactériennes en néonatalogie. Aspect diagnostique et thérapeutique. In : Beaufile S, Aujard Y, Bingen E, Eds. Les infections nosocomiales en pédiatrie. Paris: Arnette Blakwell ; p. 57-64.
9. Borderon JC, Lionnet C, Rondeau C, Suc AI, Laugier J, Gold F. (1996). Aspects actuels de la flore fécale du nouveau-né sans antibiothérapie les sept premiers jours, entérobactéries, entérocoques, staphylocoques. Pathol Biol; 44: 416-22.
10. Botterel. F, Faibis. F , Chevalier. C, Delisse. C, Fiacre. A, Dubois. A, Demachy. M.C. (2004). Intérêts et limites de la surveillance des infections nosocomiales à partir du laboratoire de microbiologie : expérience du CHG de Meaux. Pathologie Biologie 52:469–473.
11. Casin I, Collatz E. (1997). Mécanismes de résistance aux aminosides. Med Therapeut 3 : 86-96.
12. Chemsia. M, Chahida. I,Lehlimia. M, Aalloulab. O, Zeroualic. K, Habzia. A, Benomara.S. (2013). Incidence des infections bacteriennes nosocomiales. Hôpital d'enfants Abderrahim Harouchi, CHU Ibn Rochd, Casablanca, Maroc.Journal de pédiatrie et de puériculture 26, 11—18.

13. Chambers HF. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microb Rev*; 10: 781-91.
14. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandation 2012. Edition Janvier 2012.
15. DJOUPOMB NJANANG Marlène. (2007). Les infections néonatales bactériennes dans l'unité de néonatalogie de l'hôpital gynéco-obstétrique et pédiatrique de Yaoundé. Université des Montagnes, Banganté, Cameroun.
16. Dellaras C. microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse et de contrôle sanitaire. (2007). Lavoisier, Edition TEC&DOC/EM Inter, Paris ; 357-376.
17. De lancastre H, Figueiredo AMS, Tomasz A. (1993). Genetic control of population structure in heterogeneous strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur Journal Clin Microb Infect Dis*; 12: 13-8.
18. De Jonge BLM, Tomasz A. (1993). Abnormal peptidoglycan produced in amethicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicilli: functional role for penicillin binding protein 2a in a cell wall synthesis. *Antimicrob Agents Chemother*; 37: 342-6.
19. De Jonge BLM, Tomasz A. (1993). Abnormal peptidoglycan produced in amethicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin: functional role for penicillinbinding protein 2a in a cell wall synthesis. *Antimicrob Agents Chemother*; 37: 342-6.
20. De lancastre H, Figueiredo AMS, Tomasz A. (1993). Genetic control of population structure in heterogeneous strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur Journal Clin Microb Infect Dis* ; 12 : 13-8.
21. Fontana R, Aldegheri M, Ligozzi M, Lopez H, Sucari A, Satta G. (1994). Overproduction of a low-affinity penicillin binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*; 38: 1980-3.
22. Farmer JJ PR, Baron, EJ, Pfaller MA. (1999). Enterobacteriaceae: Introduction and identification. *Manual of Clinical Microbiology*. 7^e édition. Washington, DC: American Society for Microbiology; 438-47.
23. Gonzales I, Georgiou M, Alcaide F, Balas D, Linares J, De La Campa A. (1998). Fluoroquinolone resistance mutations in the *parC*, *2iri*, and *gyrA* genes of clinical isolates of iridians group streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* ; 42 : 2792-8.

24. Habzi. A, Benomar. S. (2001). les infections nosocomiales néonatales. *Pédiatr Puériculture*, 14:419-24.
25. Jean- Noel Joffine , Guy Leyral (2001). *Microbiologie technique : dictionnaire des techniques* ,volume 1 ,centre régionale de documentation d'aquitaine .
26. JELLIMANN Jean-Marc. (2002). les septicémies nosocomiales en néonatalogie : influence de l'antibiothérapie et vers un bon usage des antibiotiques .thèse de LDM .NANCY 1 : université Henri Poincar.253p.
27. Kacet N., Husson MO., Vaillant C., Lapeyre F., Chevreuil F., Grandbastien B., et al. (2001).Handicap d'origine périnatale, grossesse et toxémie, la prématurité avant 33 semaines: premiers résultats d'Épipage. *Société française de médecine péri-natale. Arnette*:271-289
28. Lachassinne. E, Letamendia-Richard. E, Gaudelus. J. (2004). Épidémiologie des infections nosocomiales en néonatalogie. *Archives de pédiatrie* 11 : 229–233.
29. Lamnaouer D. (Octobre 2002). Détermination des propriétés biologiques des plantes médicinales et aromatiques du PNT. Programme UICN de la Biodiversité en Afrique du Nord : Plantes médicinales et aromatiques: Ethnobotanie.
30. Lelièvre H, Lina G, Jones ME, Olive C, Forey F, Roussel- Delvallez M, et al. (1999). Emergence and spread in french hospitals of *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. *J Clin Microbiol*; 37: 3452-7.
31. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 1062-6.
32. Leclercq R. (1997). Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis*; 24 (suppl 1): 9080-4.
33. Leclercq R, Courvalin P. (1997). Resistance to glycopeptides in enterococci. *Clin Infect Dis*; 24: 545-56.
34. Mainardi JL. (1999). La résistance des bactéries à Gram positif aux glycopeptides : mythe ou réalité ? *Actu Réanim Urg*: 150-8.
35. Mainardi JL, Goldstein FW, Gutmann L. (1996). Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. *EncyclMéd Chir (Elsevier, Paris). Maladies infectieuses*, 8-006-N-10.: 8 p.
36. Marchal, N., Bourdon, J.L.et Richard, CL. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3^{ème} Ed. , Doin éditeurs, Paris.

37. Mainardi JL, Goldstein FW, Gutmann L. (1996). Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. EncyclMéd Chir (Elsevier, Paris). Maladies infectieuses, 8-006-N-10: 8 p.
38. Mainardi JL. (1997). Résistance des staphylocoques aux glycopeptides. Méd Mal Inf; 27 : 940-2
39. Pawa AK, Ramji S, Prakash K, Thirupuram S. (1997). Neonatal nosocomial infection: profile and risk factors. Indian Pediatr; 34:297—302; Guibert M, Boithias C. (1999). Infections nosocomiales néonatales. Med Ther Pediatr; 2:95—103
40. Patterson JE, Masecar BL, Zervos MJ. (1988). Characterization and comparison of two penicillinase producing strains of *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*. Antimicrob Agents Chemother; 32: 122-4.
41. Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. (1997). VanD type glycopeptides resistant *Enterococcus faecium* BM4339. Antimicrob Agents Chemother; 41: 2016-8.
42. Pérez -Trallero E. (2000). Pneumococcal macrolide resistance-not a myth J Antimicrob chemother ; 44 : 401-12.
43. Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. (2000). Macrolide resistance genes in *Enterococcus spp*. Antimicrob Agents Chemother; 44: 967-71.
44. Quincampoix.J.C, Mainardi.J.L. (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. 10 : 267-75
45. Roberts M, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. (1999).Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide- streptogramin B resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother; 43: 2823-30.
46. Rouzic. N, Faisant .M, Scheydeker. J.-L, Collet. M, Lejeune. B. (2008). Infections nosocomiales en maternité au centre hospitalier universitaire de Brest du 01/01/2000 au 31/12/2005. Pathologie Biologie 56; 58–65.
47. Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bächi B. (1992). Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother; 36: 25-31.
48. Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bächi B. (1992). Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in *staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother; 36: 25-31.
49. Santagati M, Iannelli F, Oggioni MR, Stefani S, Pozzi G. (2000). Characterization of a genetic element carrying the macrolide . Efflux gene *mef (A)* in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother; 44: 2585-7.

50. Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Korstanje A and the European VRE Study Group. (1999). Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* ; 43 : 2542-6.
51. Services du Ministère de la Santé françaises. (2005). Les infections nosocomiales. *Médecine & Droit* ; 15–22.
52. Singleton, P. (1999). *Bactériologie*. 4^{ème} Edition. Dunod, Paris. 317 pages.
53. Sieradzki K, Pinho MG, Tomasz A. (1999). Inactivated *pbp4* in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* ; 274 : 18942-6.
54. Sarlangue J, Hubert P, Dageville C, Boithias C, Gottot S, les membres du réseau Reaped. (1998). Infections nosocomiales en pédiatrie. Données épidémiologiques, intérêt des réseaux. *Arch Pediatr*;5(suppl 2):191s–4s.
55. Tomasz A. (1997). Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*; 24 (suppl 1): 85-8.
56. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. (1988). Vancomycin resistant enterococci. *Lancet*; 1: 57-8.
57. Wise R, Brenwald NP, Gill MJ, Fraise A. (1996). *Streptococcus pneumoniae* resistance to fluoroquinolones. *Lancet*; 348: 1660.
58. Zeller V, Janoir C, Kitzis MD, Gutmann L, Moreau N. (1997). Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* ; 41:1973-8.
59. Zafar N, Wallace CM, Kieffer P, Schroeder P, Schootman M, Hamvas A. (2001). Improving survival of vulnerable infants increases neonatal intensive care unit nosocomial infection rate. *Arch Pediatr Adolesc Med*; 155: 1098–104

Annexes 1 : concentration, diamètre critiques et règles de lecture interprétative
(CA-SFM 2012)

Antibiotiques		Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
			S	R	S	R
Béta-lactamines	Oxacilline(OX)	5µg	≤2	>2	≥20	<20
	Cefoxitine (Fox)	30 µg	8	> 32	≥27	< 25
Aminosides	Kanamycine (K)	30µg	≤8	>16	≥17	<15
	Gentamicine(GN)	10 µg	≤1	>1	≥20	<20
Divers	rifampicine (RA)	5 µg	≤0,06	>0,5	≥29	<24
Tétracyclines	Tétracycline (Te)	30 µg	≤1	>2	≥23	<21
Glycopéptides	Vancomycine (VA)	30 µg	≤2	>2	≥17	-

Annexes 2 :

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				NEGATIF	POSITIF
0	Aucun		Témoin négatif	rouge	—
GLU	D-glucose	1,56	(Témoin positif) (D-GLUcose)	rouge *	jaune
FRU	D-fructose	1,4	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1,4	acidification (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1,4	acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)		
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (D-MANnitol)		
XLT	xylitol	1,4	acidification (XyLiTol)		
MEL	D-mélibiose	1,32	acidification (D-MELibiose)		
NIT	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITrates en nitrites		
				incolore-rose pâle	rouge
PAL	β-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	<u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u>	
				jaune	violet
VP	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				incolore-rose pâle	violet-rose
RAF	D-raffinose	1,56	acidification (RAFfinose)	rouge	jaune
XYL	D-xylose	1,4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1,32	acidification (SACcharose)		
MDG	méthyl-αD- glucopyranoside	1,28	acidification (Méthyl-αD- Glucopyranoside)		
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
<u>ADH</u>	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet

Les tests d'acidification doivent être lus comparativement aux témoins négatif (0) et positif (GLU).

* Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs.

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

Annexes 3 : composition des milieux de culture

✓ Milieu BHIB (Fluka)

Cerveau de veau.....	12, 5 g/l
Cœur de bœuf.....	..5g/l
Peptone	5 g/l
Sodium chloride.....	..2g/l
D (+)-Glucose.....	..2g/l
Disodium hydrogen phosphate	2, 5 g/l

PH final = 7, 4 ± 0, 2 (37°C)

✓ Milieu Muller Hinton Agar (Fluka)

Solide perfusion boeuf	2, 0 g/l
Amidon	1, 5 g/l
Casein Hydrolysate	17,5g/l
Agar	7 g/l

PH final = 7, 4 ± 0, 2 (37°C)

✓ API Staph Medium

Extrait de levure.....	0, 5
Bactopeptone (origine bovine/porcine)	10
NaCL.....	5
Oligo-éléments	10ml

PH 7, 0-7, 2 à 25°C

✓ Gélose Bile-Esculine

Bio- Trypase	17, 00
--------------------	--------

Bio-Thione	3,00
Extrait de levure	5, 00
Bile de bœuf	10, 00
Chlorure de sodium	5, 00
Citrate de sodium	1,00
Esculine	1, 00
Citrate de fer ammoniacal	0, 50
Azide de sodium	0, 25
Gélose	13, 50

PH final 7, 1 ± 0, 2

✓ **Milieu Chapman**

La formule théorique de milieu chapman en g/l d'eau purifiée est :

Extrait de viande (bovin ou porcin)	1
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10
Chlorure de sodium.....	75
D-Mannitol	10
Agar	15
Rouge de phenol	0,025

PH 7, 4

Résumé

Introduction :

Les infections nosocomiales représentent un enjeu important en termes de santé publique. Ces infections occupent toujours une place importante dans les services de néonatalogie en raison des taux élevés et de morbidité dont elles sont favorisées par la présence de bactéries multi résistantes.

Objectifs :

La recherche des sources de contamination de l'infection nosocomiale, identification des bactéries à Gram positives responsables de l'infection nosocomiale et l'étude de leurs résistances aux antibiotiques.

Matériel et méthodes :

Cette étude a été réalisée durant la période d'avril à juillet 2013 au laboratoire de Microbiologie (LAMAABE) de l'université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen. L'étude prospective de la colonisation des nouveau-nés par des bactéries à Gram + a été menée aseptiquement par écouvillonnage à l'unité de néonatalogie de l'ESH de Tlemcen à partir de: l'anus, aisselles, portage nasale, liquide gastrique. Puis identifiés et testés vis-à-vis des antibiotiques en disques.

Résultats :

Les souches des streptocoques identifiés présentent un pourcentage de 36, 06% et les staphylocoques présentent 63.93%. La prédominance des staphylocoques est exprimée dans leur pourcentage élevé de résistance à toutes les familles d'antibiotiques testés sauf à la Gentamycine et Tétracycline qui demeurent les molécules de choix contre les infections à Staphylocoques.

Conclusion :

Notre étude a montré une variabilité phénotypique des espèces appartenant au genre staphylocoques dans la colonisation du service. De telles données devraient alors être discutées à l'échelle de cette unité et utilisée en vue d'orienter d'éventuelles mesures de prévention. D'autres phases de surveillances sont à envisager dans les années à venir en vue de suivre l'évolution du phénomène infectieux nosocomial en néonatalogie dans le CHU de Tlemcen.

Mots clés :

Infection, infection nosocomiale, néonatalogie, antibiorésistance, cocci à Gram+,

ملخص

مقدمة:

عدوى المستشفيات هي قضية هامة في مجال الصحة العامة. هذه الإصابات لا تزال تحتل مكانة هامة في حديثي الولادة بسبب ارتفاع معدل الاعتلال بفضل وجود البكتيريا المقاومة.

الأهداف:

البحث عن مصادر التلوث من عدوى المستشفيات، وتحديد البكتيريا إيجابية الجرام المسؤولة عن عدوى المستشفيات ودراسة مقاومتها للمضادات الحيوية.

المواد و الطرق:

وقد أجريت هذه الدراسة من أبريل إلى يوليو 2013 في مختبر الأحياء الدقيقة (LAMAABE) جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان. وقد أجريت دراسة استطلاعية لانتعاش حديثي الولادة بواسطة غرام + البكتيريا عن طريق إجراء مسح معقم ومطهر على الأطفال المتواجدين في وحدة حديثي الولادة بمستشفى تلمسان من: فتحة الشرج، والأبواب، والنقل عن طريق الأنف، والسوائل في المعدة. تم تحديدها واختبارها وجها لوجه مع أقراص المضادات الحيوية.

النتائج:

وقد حددت سلالات من المكورات العنقودية نسبة 36.06% و المكورات العنقودية تمثل نسب 63.93%. يتم التعبير عن غلبة من المكورات العنقودية في نسبة عالية من المقاومة لجميع فئات المضادات الحيوية المختبرة ما عدا الجنتاميسين و التتراسيكلين الجزئيات المتبقية تعتبر خيار ضد التهابات المكورات العنقودية.

الخلاصة:

وأظهرت دراسة التباين المظهري من الأنواع التابعة لجنس المكورات العنقودية في استعمار الوحدة. وينبغي مناقشة هاته البيانات على نطاق الوحدة لكي تستخدم في توجيه تدابير الوقاية الممكنة على المراحل الأخرى من الرصد وينبغي النظر في السنوات المقبلة من أجل رصد ظاهرة عدوى المستشفيات حديثي الولادة من مستشفى جامعة تلمسان.

كلمات البحث:

العدوى، عدوى المستشفيات، حديثي الولادة، المقاومة للمضادات الحيوية، مكورات إيجابية الجرام.

Summary

Introduction:

Nosocomial infections are an important issue in terms of public health. These infections still occupy an important place in neonatology because of the high rate of morbidity and they are favored by the presence of multi-resistant bacteria.

Objectives:

The search for sources of contamination of nosocomial infection, identification of Gram-positive bacteria responsible of nosocomial infection and the study of their resistance to antibiotics.

Materials and methods:

This study was conducted from April to July 2013 at the Microbiology Laboratory (LAMAABE) of university Abu Bakr Belkaid- Tlemcen. The prospective study of the colonization of newborns by Gram + bacteria was conducted aseptically swab to the neonatal unit of the ESH Tlemcen from: anus, armpits, nasal carriage, gastric fluid. Then identified and tested face the antibiotic discs.

Results:

Strains of streptococci have identified a percentage of 36, 06 % and staphylococci present 36.93 %. Predominance of staphylococci is expressed in the high percentage of resistance to all classes of antibiotics tested except Gentamycin and Tetracycline remaining molecules choice against the Staphylococcus infections.

Conclusion:

Our study showed phenotypic variability of species belonging to the genus Staphylococcus in the colonization of service. Such data should be discussed at the scale of this unit and used to guide possible prevention measures. On the other phases of monitoring should be considered in the coming years in order to monitor the phenomenon neonatal nosocomial infection in the University Hospital of Tlemcen.

Keywords:

Infection, nosocomial infection, neonatology, antibiotic resistance, Gram positive cocci