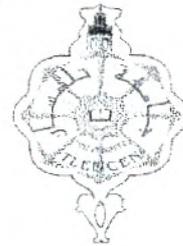


MAST. Bio-242 /

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE / 03
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE VIE ET DES SCIENCES DE LA
TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE A L'AGROALIMENTAIRE
AU BIOMEDICAL ET A L'ENVIRONNEMENT (LAMAABE)



Mémoire présenté
En vue de l'obtention de grade de master en biologie moléculaire et cellulaire
Option : Microbiologie

Intitulé :

Etude de la flore exogène à Gram négatif responsable de colonisation chez les nouveau-nés à l'unité de néonatalogie E.H.S mère et enfant de Tlemcen

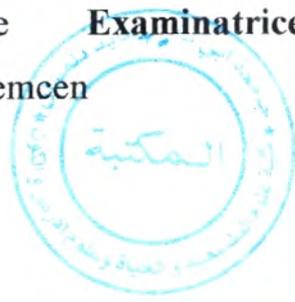
Présenté par :

Azzaoui Hafsa

Inscrit Sous le N° 8399
Date le 09/07/2012
Code:

Soutenu le 4 juillet 2012, devant le jury composé de :

- | | | |
|-----------------------------|---|---------------------|
| Mr Aribi Mourad | Maitre de conférence A, Université
Abou Bekr Belkaid de Tlemcen | Président |
| Mr Rebiahi Sid Ahmed | Maitre de conférence B, Université
Abou Bekr Belkaid de Tlemcen | Promoteur |
| Mme Chaabni Nafissa | Maitre assistante A en Epidémiologie
et médecine préventive C.H.U de Tlemcen | Examinatrice |



Année universitaire :
2011-2012

REMERCIEMENTS

A Monsieur REBIAH Sid Ahmed maitre de conférence B au département de biologie Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen

Vous nous avez fait l'honneur de guider ce travail. Nous nous sommes reconnaissantes pour la confiance, la patience que vous nous avez portées

Mes vifs remerciements vont à Monsieur ARJBI Mourad, Maitre de conférence A au département de biologie, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen

Toute notre reconnaissance pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce modeste travail, nous vous témoignons notre profond respect.

Au Dr CHABNI Nafissa Maitre assistante en épidémiologie et médecine préventive au centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen

Vous avez accepté sans hésitation de siéger parmi nos juges Soyez assurées de notre respectueuse considération

Mes remerciements au Pr SMAHI Médecin spécialiste au service de pédiatrie du CHU Tlemcen, qui ma permis de réaliser ce travail dans l'unité de néonatalogie E.H.S mère et enfant de Tlemcen



DEDICACES

Je dédie ce travail avec toute mon affection

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour

A mes très chère sœur et frères

A ma famille

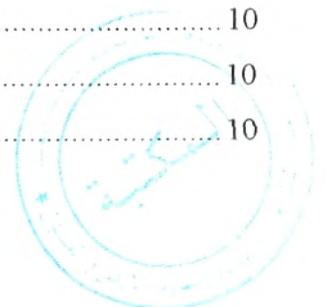
A mes amies : Hadjira, Imane, Basma, Amina

Enfin j'espère du fond du cœur que tout ce petit monde. Mon monde à moi, trouve ici un mot de reconnaissance, et que chacun se reconnaisse en ce qui le concerne. J'espère aussi que l'effort déployé dans le présent travail répondra aux attentes des uns et des autres.

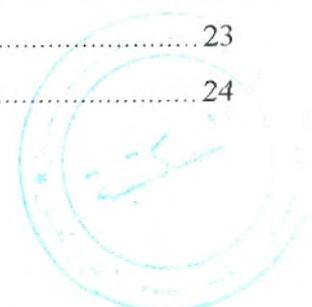


Sommaire :

Liste des abréviations	i
Liste des tableaux	ii
Liste des figures	iii
Introduction	1
Synthèse bibliographique	3
Chapitre 1 : Le nouveau-né	3
1. Généralités sur le nouveau-né	3
2. Colonisation du nouveau-né	3
2.1. Définition de la colonisation	3
2.2. Principe de la colonisation	3
2.3. Facteurs influençant l'acquisition de la flore néonatale	4
2.4. Colonisation digestive du nouveau-né	4
2.4.1. Sources de la colonisation	4
2.4.1.1. La flore vaginale lors d'accouchement	4
2.4.1.2. L'alimentation	4
❖ Allaitement maternel	4
❖ Alimentation artificielle	4
2.4.2. L'environnement : un facteur influençant la colonisation digestive du nouveau-né	5
2.5. Colonisation des autres sites	5
2.6. Rôle de la flore normale du nouveau-né	6
3. Statut immunitaire du nouveau-né	6
4. Influence de l'antibiothérapie maternelle sur le nouveau-né	7
Chapitre 2 : Infections nosocomiales néonatales	8
1. Flore exogène	8
1.1. Définition de la flore exogène	8
1.2. Flore cutanée du nouveau-né	8
2. Définitions d'infections nosocomiales néonatales	9
3. Cas particulier : infections nosocomiales néonatales par contamination materno-fœtale	10
3.1. L'écologie microbienne génitale de la mère	10
3.1.1. Flore de groupe I	10



3.1.2. Flore de groupe II.....	10
3.1.3. Flore de groupe III.....	10
3.2. Les voies de contamination materno-fœtale.....	10
3.2.1. Voie hématogène transplacentaire.....	10
3.2.2. Voie ascendante.....	11
3.2.3. Contamination au passage dans la filière génitale.....	11
3.3. Infections nosocomiales chez la mère.....	11
4. Facteurs de risque favorisant l'infection nosocomiale néonatale.....	11
4.1. Facteurs intrinsèques.....	11
4.2. Facteurs extrinsèques.....	11
5. Classification des infections nosocomiales selon leurs sites.....	12
6. Fréquences des infections nosocomiales.....	12
7. Impact des infections nosocomiales néonatales sur le nouveau-né.....	13
8. Flore exogène à Gram négatif.....	13
8.1. Particularité des bactéries à Gram négatif.....	13
8.1.1. Paroi bactérienne.....	13
8.1.2. Rôle des LPS dans l'aggravation des infections systémiques.....	14
8.2. Les bactéries à Gram négatif incriminés dans les infections nosocomiales néonatales.....	15
8.1. <i>Acinetobacter</i> spp.....	15
8.2. <i>Enterobacteriaceae</i>	17
8.2.1. <i>Klebsiella</i> spp.....	17
8.2.2. <i>Escherichia coli</i>	17
8.2.3. <i>Enterobacter</i>	20
8.3. <i>Pseudomonas</i>	20
Chapitre 3 : Diagnostic des infections nosocomiales néonatales.....	22
1. Critères de diagnostic.....	22
2. Arguments cliniques.....	22
3. Eléments d'orientation : Les marqueurs biologiques d'infection néonatale.....	22
4. Arguments radiologiques.....	23
5. Diagnostic de laboratoire en microbiologie.....	23
5.1. Prélèvements.....	23
5.2. Procédés diagnostiques.....	23
Chapitre 4 : Traitement des infections nosocomiales néonatales.....	24



1. Antibiotiques actifs sur la flore à Gram négatif	24
2. Résistance des bactéries à Gram négatif aux antibiotiques	24
2.1. Nature de la résistance aux antibiotiques	24
2.1.1. Résistance non génétique	24
2.1.1.1. L'évasion	24
2.1.1.2. Arrêt de production de la majeure partie de paroi bactérienne	24
2.1.1.3. Surproduction ou absence de la cible	25
2.1.2. Résistance génétique	25
2.1.2.1. Résistance naturelle ou intrinsèque	25
2.1.2.2. Résistance acquise	25
2.2. Mécanismes de résistance	25
2.2.1. Mécanismes de résistance enzymatiques	26
2.2.2. Mécanismes de résistance non enzymatiques	28
2.2.2.1. Mécanisme de résistance par imperméabilité	28
2.2.2.2. Mécanisme de résistance par système d'efflux	28
2.2.2.3. Mécanisme de résistance par modification de cible	29
2.3. Recommandations pour limiter l'émergence des bactéries résistantes	29
Matériels et méthodes	30
1. Type d'étude	30
2. Lieu d'étude	30
3. Période d'étude	30
4. Population étudiée	30
5. Démarche suivie	30
6. Matériels	32
7. Méthodes	32
7.1. Nature des prélèvements	32
7.1.1. Prélèvements à partir des nouveau-nés	32
7.1.2. Prélèvements à partir de l'environnement immédiat pour les nouveau-nés	32
7.2. Isolement	32
7.3. Purification	32
7.4. Coloration de Gram	32
7.5. Identification	33
7.6. Antibiogramme	34
7.7. Conservation des souches	35

Résultats et discussion.....	36
1. Résultats	36
1.1. <i>Prélèvements</i>	36
1.2. Coloration de Gram	38
1.3. Résultats d'identification et d'antibiogramme.....	40
1.4. Résistance aux antibiotiques	47
1.5. Etat de la multirésistance	51
2. Discussion.....	52
2.1. Identification	52
2.2. Résistance aux antibiotiques	54
2.3. <i>Etat de la multirésistance</i>	55
Conclusions	56
Références bibliographiques	57
Annexes.....	70



Liste des abréviations

ATB : antibiotique
BMR : bactéries multirésistantes
BGN : bactéries à Gram négatif
BLSE : β -lactamase à spectre étendu
CDC : Centers for Disease Control and Prevention
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute
CPS : capsular polysaccharide
CN : gentamycine
CRP : C reactive protéine
ELBW : poids de naissance extrêmement bas
FOX : Cefoxitine
HAS : Haute Autorité de Santé
IN : infection nosocomiale
INN : infection nosocomiale néonatale
ISC : infection du site chirurgical
IMF : infection materno-fœtale
IUN : *infection urinaire nosocomiale*
LBW : poids de naissance bas
LPS : lipopolysaccharide
MBI : marqueurs biologiques d'infection
Mex : Multiple efflux
NICHD : *National Institute of Child Health and Human Development*
OFX : Ofloxacin
OMPs : outer membrane proteins
ORL : ortho-rhino-larynx
PCT : procalcitonine
RND : Resistance nodulation cell division
SFHH : Société française d'hygiène hospitalière
UPEC : uro-pathogen *E. coli*
VLBW : poids de naissance très bas
VS : vitesse de sédimentation

Introduction

Introduction

Introduction

La mère et son enfant constitue le groupe le plus précieux d'une société humaine. Ce qui impose que la protection maternelle et infantile soit une activité primordiale et *prioritaire dans le domaine de la santé publique*.

En réalité la connaissance des problèmes menaçant les nouveau-nés représente le premier pas vers la détermination du choix des solutions convenables et efficaces pour affronter une infection devenue propagée dans les hôpitaux, telle est l'infection nosocomiale.

Les caractéristiques particulières de période néonatale permettent une grande sensibilité aux infections (Maussi-Pinhata et Do Nascimento., 2001). Par ailleurs, ces infections qui sont la résultante d'un ensemble des facteurs induisent une morbidité significative, une surmortalité non négligeable et des coûts tout aussi importants (Guibert et al., 1999). L'urgence et la sévérité du pronostic est souvent sanctionnées par un traitement probabiliste.

La néonatalogie, partie intégrante de la pédiatrie, s'occupe de la pathologie des nouveau-nés dès la naissance à 28 jours de vie dont les infections nosocomiales. Ainsi, le *développement de nouvelles méthodes de traitement, ventilation assistée, perfusion, alimentation parentérale totale, surveillance biologique par prélèvements en micro-méthode, dosage biologique sur des petits échantillons de sang ou de plasma* ont permis l'essor de cette spécialité. (B. Guy et al., 2003)

Les bactéries à Gram négatif sont incriminées dans les infections nosocomiales, cette situation est compliquée chez les prématurés du fait de l'immaturation accentuée de leurs grandes fonctions et leur fragilité extrême. Ainsi, il est capital de savoir si la présence des bactéries à Gram négatif exogènes est responsable ou non de la colonisation voire de l'infection chez les nouveaux nés à l'unité de néonatalogie E.H.S de Tlemcen.

L'objectif de cette étude est d'identifier les bactéries à Gram négatif responsables de colonisation exogène et de connaître leur niveau actuel de résistance aux antibiotiques.

Pour infléchir cette tendance des généralités sur le nouveau-né ainsi que d'actualité sur les infections nosocomiales néonatales et les principales bactéries à Gram négatif en cause, sont présentés dans la première partie de ce travail qui est consacrée à une synthèse bibliographique. Cette dernière traite brièvement le diagnostic des infections nosocomiales néonatales ainsi que leur traitement et la résistance de ces bactéries aux antibiotiques.

Introduction

Dans la deuxième partie seront présentés les matériels et les méthodes qui ont été utilisés, la troisième partie présentera les résultats qui ont été obtenus.



synthèse

Bibliographie

Chapitre 1 : Le nouveau-né

1. Généralités sur le nouveau-né :

Un certain nombre de définitions sont à connaître :

- Un nouveau-né à terme : se définit comme un enfant naissant après 40 semaines de gestation ;
- Un prématuré : se définit comme un enfant naissant avant 40 semaines de gestation. (Guy et al., 2003)

Les nouveau-nés se caractérisent par un âge gestationnel et un poids de naissance. Les nouveaux nés ayant un poids bas < 2500 g sont désignés « LBW » pour low-birth-weight (ou nouveau-nés à poids de naissance bas) (Bowen et Braden., 2006), ceux ayant un poids très bas ≤ 1500 g sont désignés « VLBW » pour very-low-birth-weight (ou nouveau-nés à poids de naissance très bas) (Makhoul et al., 2004) et ceux qui ont un poids extrêmement bas < 1000 g sont désignés « ELBW » pour extremely-low-birth-weight (ou nouveau-nés à poids de naissance extrêmement bas). (Kaufman et Fairchild., 2004)

2. Colonisation du nouveau-né :

2.1. Définition de la colonisation :

La colonisation est la présence d'un microorganisme sur ou dans un hôte et qui se multiplie sans aucune expression clinique. (Maussi-Pinhata et Do Nascimento., 2001)

En effet, la colonisation postnatale par des bactéries multirésistantes (BMR) peut être suivie d'une infection chez les nouveau-nés. (Campeotto et al., 2004)

Cependant, les facteurs de risque favorisant la colonisation bactérienne sont la prématurité, l'hospitalisation préalable, la nutrition parentérale et des antécédents de ventilation assistée. Ainsi, Le risque d'acquisition d'une BMR est en moyenne de huit jours. (Campeotto et al., 2004)

2.2. Principe de la colonisation :

Le fœtus en développement est protégé de la flore microbienne du tractus génital de la mère. Cependant, la colonisation normale du nouveau-né débute durant l'accouchement après la rupture de la membrane amniotique ensuite au fur et à mesure des contacts

subséquents avec l'environnement une flore endogène équilibrée à composition précise s'établira. (Maussi-Pinhata et Do Nascimento., 2001)

Selon la société française d'hygiène hospitalière (SFHH), les zones les plus colonisées sont l'ombilic, les plis de la peau, les fesses et la plante des pieds.

2.3. Facteurs influençant l'acquisition de la flore néonatale :

- La flore génitale maternelle ;
- Le mode d'accouchement ;
- L'âge gestationnel ;
- Le type de nutrition du nouveau-né ;
- Les personnes en contact direct avec le nouveau-né ;
- L'environnement tel que la flore provenant du matériel médicale ;
- La flore des autres nouveaux nés ;
- L'antibiothérapie. (Maussi-Pinhata et Do Nascimento., 2001 ; Waligora-Dupriet et al., 2007)

2.4. Colonisation digestive du nouveau-né :

2.4.1. Sources de colonisation digestive :

2.4.1.1. La flore vaginale lors de l'accouchement :

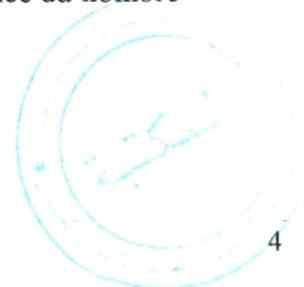
2.4.1.2. L'alimentation :

❖ Allaitement maternel :

Chez les nouveau-nés subissant un allaitement maternel, des auteurs ont constaté l'apparition au niveau de l'intestin après 12 heures :

- des bactéries anaérobies facultatives, des bifidobactéries et des clostridies chez moins de 50% des nouveaux nés ;
- des *Bactéroïdes* chez moins de 30% des nouveaux nés. (Posfay et al., 2001)

Après quelques jours, le nombre des bifidobactéries augmente très rapidement (10^{10} à 10^{11} germes par gramme de selles) chez 100% des nouveau-nés (Posfay et al., 2001). Parallèlement on constate une chute du nombre des anaérobies et une constance du nombre des *Bactéroïdes*



Ainsi, une augmentation de nombre des clostridies est remarquée entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jours (Posfay et al., 2001)

Après une semaine, les bifidobactéries représentent plus de 99% de la flore digestive. (Posfay et al., 2001)

❖ Alimentation artificielle :

Chez les nouveau-nés nourris par le lait artificiel, la colonisation digestive pendant le 1^{ier} et le 2^{ème} est identique à celle obtenue lors de l'allaitement maternel, l'augmentation du nombre des bifidobactéries, mais le nombre des autres bactéries anaérobies ne diminuent pas surtout les bactéries à Gram négatifs. (Posfay et al., 2001)

C'est ainsi que des clostridies sont retrouvées chez 50 à 80% des nouveaux nés âgés de 6 jours. Les *Bactéroïdes* sont présentes chez 60 à 80% des cas dont leur nombre est de 10⁸ à 10¹⁰ germes par gramme de selles. La flore est donc moins stable chez les nouveaux nés nourris par lait artificiel. (Posfay et al., 2001)

2.4.2. L'environnement : un facteur influençant la colonisation digestive du nouveau-né :

La flore digestive d'un nouveau-né hospitalisé est différente de celle d'un nouveau-né retourné rapidement à domicile : on remarque dès le 15^{ème} jour d'hospitalisation, l'apparition de souches résistantes même en dehors de toute antibiothérapie. (Posfay et al., 2001)

Ainsi, la colonisation par les bactéries opportunistes du milieu hospitalier augmente avec la durée de séjour. (Borderon et al., 1996)

Le prématuré est colonisé au début par des Klebsielles et des bactéries anaérobies avec un retard de l'installation des bifidobactéries au-delà de 8 jours.

Les bifidobactéries sont les prédominantes entre le 12^{ème} et le 35^{ème} jour de vie, mais dans une proportion plus faible que chez les nouveau-nés à terme : on compte 10 bifidobactéries pour une entérobactérie chez un prématuré âgé de 7 semaines contre 1000 bifidobactéries pour une entérobactérie chez le nouveau né à terme. (Posfay et al., 2001)

Récemment, des données ont prouvé que la modification dans l'établissement de la flore intestinale, et que le retard d'implantation des bactéries entériques d'origine maternelle pourraient responsables d'une absence de flore de barrière ou d'une mauvaise stimulation du système immunitaire intestinal. (Waligora-Dupriet et al., 2007)

2.5. Colonisation des autres sites :

D'autres sites du corps du nouveau-né sont colonisés quelques jours après la naissance :

- *La peau et les muqueuses (nasopharynx, oropharynx, conjonctive, cordon ombilicale)* par les microorganismes suivants : Streptocoques α -hémolytiques, Staphylocoques à coagulase négative ;
- *Le vagin par *Candida albicans*.* (Maussi-Pinhata et Do Nascimento., 2001).

2.6. Rôle de la flore normale du nouveau-né :

La flore normale équilibrée exerce un effet protecteur : la présence de la flore normale protège le nouveau-né de certains microorganismes pathogènes et cela par ce que les microorganismes appartenant à cette flore s'étendent vers les différents sites du corps et entrent en compétition avec les microorganismes pathogènes. (Maussi-Pinhata et Do Nascimento., 2001).

3. Statut immunitaire du nouveau-né :

La peau qui constitue une barrière mécanique dans la réponse immunitaire innée est immature, fine, pauvre en kératine et douée d'une perméabilité élevée (Maussi-Pinhata et Do Nascimento., 2001 ; Harpin et Rutter., 1993).

De plus, la muqueuse est extrêmement fragile. Ainsi, le manque de réponse immunitaire innée (phagocytes mononucléaires et facteurs humoraux tel que le complément) joue un rôle critique dans la sensibilité à l'infection par les bactéries pyogènes. (Maussi-Pinhata et Do Nascimento., 2001).

Aussi, Le nouveau-né de faible poids de naissance est immunodéficient en raison de réserves médullaires faibles en précurseurs de la lignée neutrophile et de troubles quantitatifs des polynucléaires neutrophiles. (Guibert et al., 1999)

Les autres barrières naturelles telles que l'acidité de l'estomac et la production de pepsine et de trypsine qui maintient la stérilité de l'intestin grêle ne sont pas entièrement développées qu'après 3 à 4 semaines de la naissance. (Srivastava et Shetty., 2007)

A son tour, la réponse immunitaire spécifique ne se développe qu'au 5^{ème} voir 7^{ème} jours après l'exposition initiale aux microorganismes. De plus, la production des immunoglobulines sécrétoires A est absente durant les 1^{ers} jours de la vie, par conséquent,

l'épithélium respiratoire et gastrointestinal est vulnérable. (Maussi-Pinhata et Do Nascimento., 2001)

Aussi, les immunoglobulines G sont quantitativement insuffisantes et fonctionnellement déficientes chez le prématuré. (Guibert et al., 1999)

Ainsi, il est important de signaler que l'immaturation immunologique est d'autant plus marquée que l'âge gestationnel est plus faible. (Guibert et al., 1999)

4. Influence de l'antibiothérapie maternelle sur le nouveau-né

Blond, et ses collègues (2001) ont effectué un dépistage de l'infection à *Streptococcus agalactiae* chez des femmes enceintes.

Pour les femmes infectées ils ont procédé à une antibiothérapie *per partum* dont l'antibiotique utilisé est l'ampicilline afin d'éradiquer le germe en cause. Ensuite, ils ont étudié l'influence de cette antibiothérapie sur la mère et sur le nouveau-né.

Ils ont trouvé que cette dernière diminue de façon hautement significative les infections à *Streptococcus agalactiae* chez la mère et le nouveau-né, mais elle génère des risques maternels : l'émergence des bactéries à Gram négatif résistantes à l'ampicilline ; et des risques néonataux : la survenue des septicémies néonatales et des infections à bactéries résistantes à l'ampicilline. (Blond et al., 2001)

Chapitre 2 : Infections nosocomiales néonatales

1. Flore exogène :

Les micro-organismes responsables des infections nosocomiales proviennent soit de la flore endogène principalement digestive, soit de la flore exogène et affectent les malades après une étape de colonisation. (Habzi et Benomar., 2001)

1.1. Définition de la flore exogène :

La flore exogène est les microorganismes n'appartenant pas à la flore endogène propre de l'individu, elle provient d'une source externe animée ou inanimée (**Tableau 1**). Ainsi la flore exogène inclue aussi les microorganismes présents sur un individu.

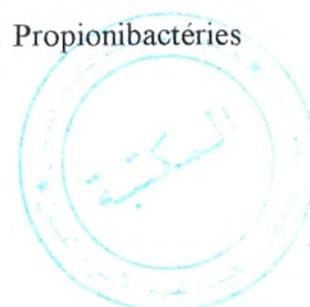
Tableau 1 : Sources de la flore exogène

Source externe animée	Source externe inanimée	Référence
- Personnel soignant : médecins et infirmières (mains, ongles, vêtements, nez, gorge) - Autres patients (infection croisée) (gouttelettes de salive ou autres liquides biologiques)	- Nourriture, air et aérosols - Antiseptiques contaminés - Fluides nutritionnels - Cathéters, sondes d'intubation trachéales - Appareils médicaux, ventilateur, aspirateur, conduits d'aération, humidificateurs d'air, adoucisseurs d'eau	(Horrevorts et al., 1995 ; Clifford et al., 1999 ; Shaechter et al., 1999 ; Kaufman et Fairchild., 2004 ; Ducel et al., 2008)

1.2. Flore cutanée du nouveau-né :

La flore microbienne de la peau est constituée de microorganismes adaptés à la surface de l'épiderme. Deux types de flores sont distingués :

- 1- La flore résidente constituée d'espèces implantées de façon prolongée, voire permanente sur la peau (Baumgartner et al., 1998), cette flore inclue les Staphylocoques, les Microcoques, les Corynebactéries et les Propionibactéries (David N. Fredricks., 2001) ;



2- La flore transitoire qui comporte des espèces faisant un bref séjour cutané, elles peuvent être à l'origine de transmission de bactéries manuportées. Les bactéries de la flore résidente, longtemps considérées comme peu dangereuses, peuvent devenir pathogènes opportunistes lors d'effraction du revêtement cutané et provoquer des infections sévères (Baumgartner et al., 1998). Ces microorganismes sont *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *Pseudomonas aeruginosa*. (David N. Fredricks., 2001)

Ainsi, le manuportage transit est responsable de transmission croisée. (Kampf et Kramer., 2004)

2. Définition de l'infection nosocomiale chez l'adulte :

Une infection nosocomiale (IN) du latin *nosocomium* (hôpital) et du grec *nosos* (maladie) et *komein* (soigner), est une infection acquise par un patient au cours ou après son séjour à un hôpital ou à un autre établissement de santé et qui n'était ni présente ni en incubation au moment de l'admission de patient. (Ducel et al., 2008)

Un délai d'au moins 48 heures après l'admission est accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire ; un délai de 30 jours est défini pour une infection du site opératoire et un autre d'une année dans le cas de mise en place d'une prothèse ou d'implant. (Carbonne, 2005)

Ainsi, les IN peuvent être définies en tant qu'endémiques ou épidémiques dont les premiers sont les plus répandues. (Ducel et al., 2008)

3. Définition de l'infection nosocomiale chez le nouveau-né :

Une infection nosocomiale néonatale (INN) c'est toute infection acquise à l'hôpital par le nouveau-né qui se manifeste au-delà de 48^{ème} heures de vie alors qu'aucun signe clinique d'infection n'est présent à la naissance. (Malavaud et al., 2003)

Ains, les INN bactériennes sont les plus étudiées. (Lachassinne et al., 2003)

Aussi, si le nouveau-né présente dès la naissance une infection consécutive à une infection nosocomiale de la mère, cette infection est considérée comme une INN par transmission materno-fœtale. (Malavaud et al., 2003)

Cependant, une infection touchant un nouveau-né, né par voie basse dont l'agent responsable provient de la flore vaginale de la mère, ainsi, toute infection associée à la

rupture de la membrane amniotique ou transmise par le placenta ne sont pas qualifiées de nosocomiales. (Maussi-Pinhata et Do Nascimento., 2001).

Les INN se développent chez le nouveau-né en maternité, unité de soins intensifs et unité de néonatalogie. (Guibert et al., 1999)

4. Cas particulier : infections nosocomiales néonatales par contamination materno-fœtale

L'infection materno-fœtale (IMF) peut avoir des conséquences sévères sur le nouveau-né allant jusqu'à entraîner une décompensation multi-viscérale et le décès de celui-ci (Popowski et al., 2011).

4.1. L'écologie microbienne génitale de la mère :

Le vagin contient des bactéries appartenant à 3 grands groupes écologiques.

4.1.1. Flore de groupe I :

C'est une flore de portage habituelle, composée de flore de Döderlein présente à des concentrations élevées : 10^6 - 10^9 bactéries/g de sécrétions vaginales, associée aux Streptocoques α -hémolytiques et aux Corynébactéries. (Blond et al., 2001)

4.1.2. Flore de groupe II :

C'est une flore de portage fréquent telles que *E.coli*, *Klebsiella* et *Enterobacter* (Bałaka et al., 2003)

4.1.3. Flore de groupe III :

C'est une flore de portage exceptionnel hôtes usuels de la flore oropharyngée telles que *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *méningocoques* et *pneumocoques*. (Blond et al., 2001)

4.2. Les voies de contamination materno-fœtale :

Il existe 3 voies de contamination : voie hématogène transplacentaire, voie ascendante et voie de contamination lors du passage dans la filière génitale.



4.2.1. Voie hématogène transplacentaire :

Elle est exercée au cours d'une septicémie ou bactériémie maternelle. (Blond et al., 2001)

Selon le centre de contrôle et prévention des maladies, le CDC (pour Centers for Disease Control and Prevention) parmi les infections transmises par le placenta on trouve : la syphilis, la toxoplasmose, la rubéole, l'infection à cytomégalovirus, l'hépatite B, l'herpes simplex et l'infection à HIV. (Maussi-Pinhata et Do Nascimento, 2001)

Pour cette voie de contamination, l'infection est affirmée sur les prélèvements systématiques à la naissance (peau, liquide gastrique, oreilles, placenta). (Malavaud et al., 2003)

4.2.2. Voie ascendante :

Elle est due à l'ensemencement du liquide amniotique par des bactéries provenant du tractus génital (Blond et al., 2001), cela peut être dû à la rupture de la membrane amniotique avant 24 heures de l'accouchement. (Maussi-Pinhata et Do Nascimento, 2001).

4.2.3. Contamination lors du passage dans la filière génitale :

Dans ce cas le nouveau-né présente un tableau infectieux lié à un germe retrouvé au prélèvement vaginal de sa mère. (Malavaud et al., 2003)

4.3. Infections nosocomiales chez la mère :

Une IN chez la mère est une infection acquise en cours de séjour à la maternité alors qu'elle n'était ni présente ni en phase d'incubation à l'entrée, avec un intervalle libre d'au moins 48 heures. (Malavaud et al., 2003)

5. Facteurs de risque favorisant l'infection nosocomiale néonatale :

Les facteurs de risque peuvent être divisés en facteurs intrinsèques et extrinsèques.

5.1. Facteurs intrinsèques :

- Age gestationnel (Habzi et al., 2001) ;
- Poids de naissance (Habzi et al., 2001) ;
- Immaturité immunologique accentuée par la prématurité. (Guibert et al., 1999)

Synthèse bibliographique

- Maladies sous-jacentes : les patients atteints des maladies chroniques telles que la leucémie et le diabète sont plus sensibles aux infections opportunistes. (Ducel et al., 2008)

5.2. Facteurs extrinsèques :

- Agents microbiens : virulence intrinsèque et quantité d'inoculum. (Ducel et al., 2008)
- Durée d'hospitalisation (Habzi et al., 2001) ;
- Procédures invasives (Habzi et al., 2001) ;
- Usage massif des antibiotiques surtout ceux à large spectre (Habzi et al., 2001) ;

6. Classification des infections nosocomiales néonatales selon leurs sites :

Les INN peuvent être classées selon le site dans lequel survient l'infection en : septicémies nosocomiales, bactériémies nosocomiales, pneumopathies nosocomiales, infections urinaires nosocomiales, gastro-entérites et infections de la peau et des tissus mous.

Les définitions de chaque INN sont présentées dans l'annexe 1.

7. Microorganismes responsables des infections nosocomiales néonatales :

Le tableau 2 présente les microorganismes incriminés dans les INN.

Tableau 2 : Microorganismes responsables des infections nosocomiales néonatales

(Habzi et Benomar., 2001)

Bactéries à Gram positif	Bactéries à Gram négatif	Virus	Levures
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Candida</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Pseudomonas</i>	Cytomégalovirus	<i>albicans</i>
Entérocoques	<i>Klebsiella et Salmonella</i>	Adénovirus	
Streptocoques B	<i>Legionella et Campylobacter</i>	<i>Enterovirus</i>	

8. Impact des infections nosocomiales néonatales sur le nouveau-né :

Elles influencent sur le fonctionnement du corps du nouveau-né, par exemple de la méningite peuvent résulter une perte d'audition, affaiblissement de vue, paralysie cérébrale, difficulté d'apprentissage et retard mental. (Newby et al., 2008)

9. Flore exogène à Gram négatif responsable d'infections nosocomiales néonatales :

9.1. Particularité des bactéries à Gram négatif : Paroi bactérienne

Les bactéries à Gram négatif (BGN) sont caractérisées par une membrane externe unique riche en lipopolysaccharides (LPS) ou endotoxines, ainsi que d'autres composants de la paroi : peptidoglycane, lipoprotéines et porines (**Figure 1**). (I. Vanlaere et C. Libert., 2009)

Les porines appelées initialement OMPs (pour Outer-Membrane Proteins) fonctionnent comme une interface dynamique entre la cellule bactérienne et son environnement, elles interviennent dans la maintenance de la structure de cellule, transport passif et actif (H.M. Wexler., 2002)

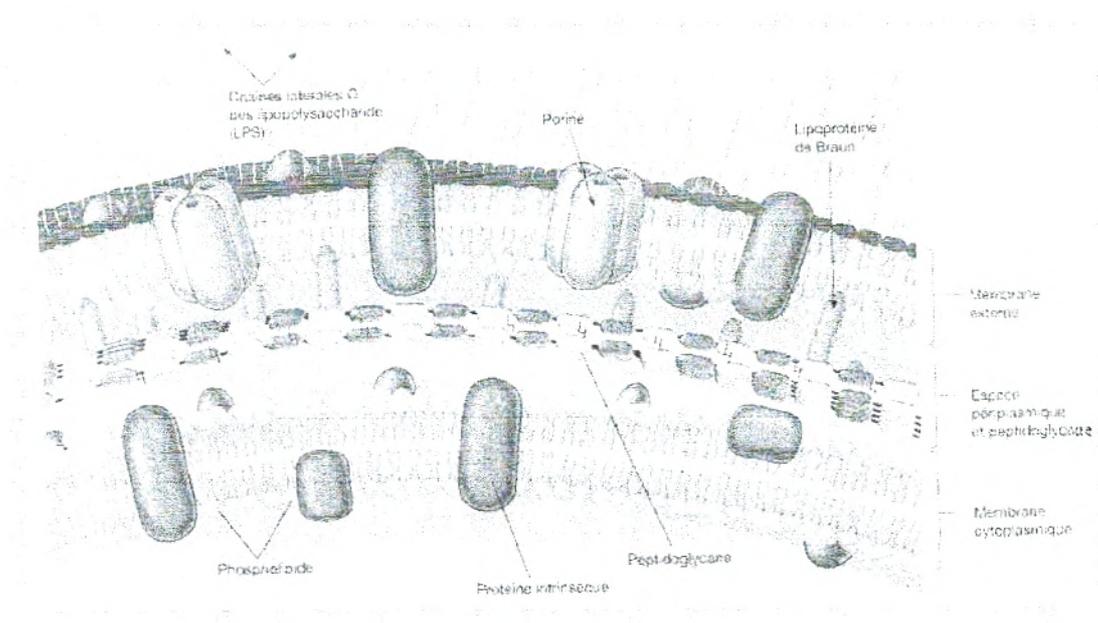


Figure 1 : Paroi des bactéries à Gram négatif (Prescott et al., 2010)



9.2. Rôle des LPS dans l'aggravation des infections systémiques :

Suite d'une bactériémie, une réponse inflammatoire systémique se produit, un sepsis à Gram négatif, du fait que les LPS sont très puissants et une petite quantité est suffisante pour déclencher une réponse immunitaire naturelle. (I. Vanlaere et C. Libert., 2009)

L'infection s'évolue à un sepsis sévère quand le dysfonctionnement des organes est atteint (**Figure 2**), et en choc septique si l'hypotension persiste malgré la réintroduction adéquate des fluides (**Figure 2**). (I. Vanlaere et C. Libert., 2009)

Durant le choc septique, il n'y a pas activation de voie anti-inflammatoire pour la terminaison de réponse inflammatoire, par conséquent il en résulte des blessures des tissus, défaillance des organes et très souvent la mort.

Chez les nouveaux nés on trouve un sepsis précoce et un sepsis tardif. Le sepsis précoce survient avant le 3^{ème} jour de vie de nouveau-né alors que le sepsis tardif survient après le 3^{ème} jour de vie. (Kaufman et K.D. Fairchild., 2004)

Selon des critères microbiologiques un sepsis précoce et un sepsis tardif sont définis successivement comme une hémoculture positive obtenue avant et après 72 heures de vie avec la présence des signes cliniques. (Makhoul et al., 2004)

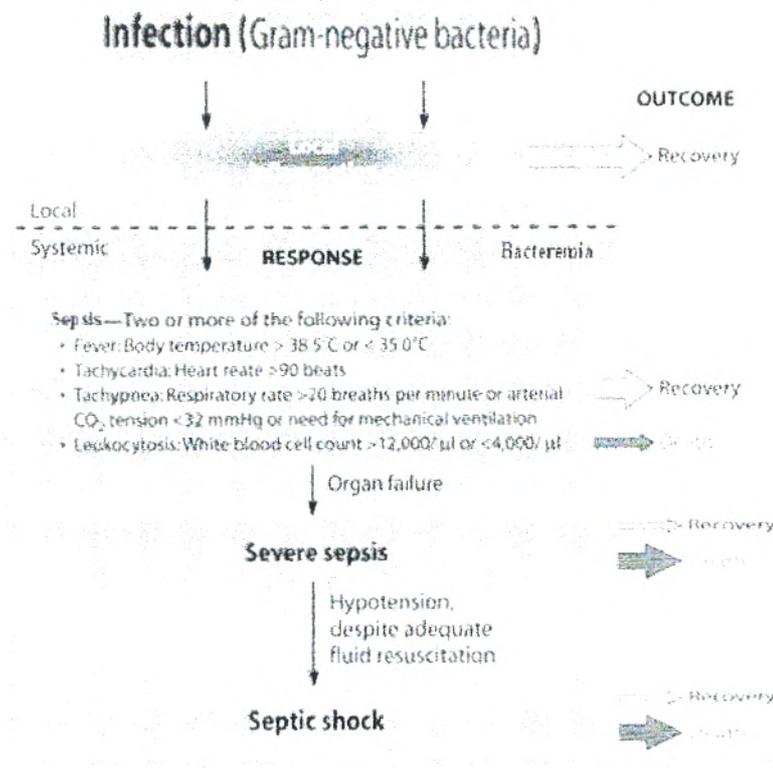


Figure 2 : Définitions de sepsis, sepsis sévère et choc septique

(I. Vanlaere et Libert., 2009)

8.3. Les bactéries à Gram négatif incriminés dans les infections nosocomiales néonatales :

8.1. *Acinetobacter* spp.

Le genre *Acinetobacter* comprend des coccobacilles à Gram négatif, aérobies, immobiles, catalase positive (+) et oxydase négative (-), non fermentaires avec un ADN dont le contenu en GC est de 39% à 47%. (Peleg et al., 2008)

Les travaux réalisés par Bouvet et Grimont, Tjernberg et Ursing, Nishimura et al., basés sur l'étude d'hybridation ADN-ADN, (Bergogne-Bérézin et K. Towner., 1996), et aussi les études réalisées récemment ont permis l'identification d'environ 32 « genomic species » appelées aussi « genospecies » dont 17 espèces possèdent un nom validé (Kilic et al., 2008), retrouvées dans différents habitat : peau, tractus intestinal de l'homme à l'état commensal et dans sa matière fécale ; eau ; sol et végétaux . (Peleg et al., 2008)

Les souches d'intérêt clinique sont représentées dans le tableau 3 et les facteurs de virulence d'*Acinetobacter* spp. sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 3 : Les espèces d'*Acinetobacter* d'intérêt clinique

Espèces	Genomic species	Référence
	3	(Peleg et al., 2008)
<i>A. haemolyticus</i>	4	(Peleg et al., 2008)
<i>A. junii</i>	5	(Horrevorts et al., 1995)
<i>Acinetobacter septicus</i> sp. nov.,	7	(Kilic et al., 2008)
<i>A. johnsonii</i>		
<i>A. hwoffii</i>	8	(Peleg et al., 2008)
<i>A. radioresistens</i>	12	(Kilic et al., 2008)
	13TU	(Peleg et al., 2008)
	14BJ	(Horrevorts et al., 1995)
		(Peleg et al., 2008)
<i>A. Calcoaceticus, A. baumannii,</i>		(Horrevorts et al., 1995)
<i>A. ursingii, A. parvus, A. schindleri</i>		(Kilic et al., 2008)

Synthèse bibliographique

Tableau 4 : Facteurs de virulence d'*Acinetobacter* spp.

<i>Acinetobacter</i> spp.							
Capsule	Flagelles	Pili	Toxines	Enzymes	Sidérophores	Protéines	Référence
Polysaccharidique formée de L-rhamnose + D-glucose + D-acide glucuronique + D-mannose		Fimbriae pour l'adhésion aux cellules épithéliales		Lipases	Aérobactine	Bap (Biofilm-associated protein) permet l'adhésion aux kératinocytes et augmente l'hydrophobicité de la surface de la bactérie	(Bérézin et Towner, 1996) (Brossard et Campagnari, 2011)

Les infections envahissantes à *Acinetobacter* chez les nouveaux nés se manifestent généralement sous forme de bactériémie, de méningite ou les 2 ensembles (Robinson et al., 2008)

Lors de bactériémie, les espèces d'*Acinetobacter* peuvent être retrouvées comme étant un seul pathogène, ou comme une partie d'une bactériémie polymicrobienne. (Bergogne-Bérézin et Towner., 1996)

Selon les données provenant de la surveillance nationale des IN en Etats-Unis en 2003, *Acinetobacter* spp. cause 6,9% de pneumonies nosocomiales, 2,4% des septicémies, 2,1% d'ISC et 1,6% d'IUN. (Kilic et al., 2008)

Ces pathogènes opportunistes ont la capacité de survivre lentement et de persister dans l'environnement hospitalier sur des surfaces abiotiques multiples. (Brossard et Campagnari., 2011).

D'une part, ils peuvent être transmis entre les patients via un réservoir humain. (Bergogne-Bérézin et Towner., 1996)

D'autre part ces bactéries semblent être transmises et infectent les nouveaux nés à partir d'une source exogène inanimée telle que l'eau, l'alimentation, les humidificateurs d'air, ventilation, l'air de l'unité des soins, les conduits d'aération et les aérosols (Clifford et al., 1999), les fluides nutritionnels intraveineux, les sacs de réanimation et les systèmes à canaux extra-ventriculaires (Horrevorts et al., 1995) et les autres dispositifs médicaux. (Kilic et al., 2008)

La vraie fréquence des IN causées par *Acinetobacter* n'est pas facilement déterminée car l'isolement de ces germes à partir des prélèvements cliniques ne reflète pas seulement l'infection, mais aussi la colonisation. (Bergogne-Bérézin et Towner., 1996)

8.2. Enterobacteriaceae :

8.2.1. Klebsiella spp.

Les bactéries appartenant au genre *Klebsiella* sont des bacilles, non mobiles, capsulées, ubiquistes, se trouvant notamment dans l'eau et colonisent les muqueuses de l'homme. Elles sont rarement présentes sur la peau où elles passent comme un membre transitoire de la flore de la dermique. (Podschun et Ullmann., 1998)

Klebsiella pneumoniae est présente en tant que saprophyte dans le nasopharynx et l'intestin. (Podschun et Ullmann., 1998)

Les facteurs de virulence de *Klebsiella* spp. sont présentés dans le tableau 5.

Ainsi, *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* peuvent contaminer les aliments artificiels des nouveaux nés. (Bowen et Braden., 2006)

Klebsiella spp. est responsable des bactériémies et d'IUN dans les unités de néonatalogie (Alcanter-Curiel et al., 2004) ainsi que de pneumonie associée à la ventilation (Foglia et al., 2007), et de méningite néonatale. (Sáez-Llorens et McCracken., 2003)

8.2.2. Escherichia coli :

E. coli est un bacille à Gram négatif, anaérobie facultative, commensale du gros intestin de l'homme. Ainsi, les souches appartenant à cette espèce sont séotypiquement diverses, présentant plus de 250 séotypes se basant sur les antigènes O, K et H. (S.M. Jacobsen et al., 2008)

Synthèse bibliographique

Aussi, il existe 80 types des polysaccharides capsulaire (CPSs) dont les souches UPEC possèdent des capsules de groupe II et III et les souches commensales expriment des capsules de groupe I. (S.M. Jacobsen et al., 2008)

Les facteurs de virulence d'*E. coli* sont présentés dans le tableau 5.

Selon le NICHD (pour National Institute of Child Health and Human Development) *E.coli* est la plus fréquente cause de sepsis précoce et tardive du aux bactéries à Gram négatif chez les nouveaux nés à terme. (D. Kaufman et K.D. Fairchild, 2004)

Cependant, les souches d'*E. coli* sont responsables de septicémie associée aux prématurité et haute mortalité (L. Cordero et al., 1999), ainsi que de méningite, diarrhée et IUN. (S.M. Jacobsen et al., 2008)



Synthèse bibliographique

Tableau 5 : Facteurs de virulence de *Klebsiella* spp. et d'*E. coli*

<i>Klebsiella</i> spp.							
Capsule	Flagelles	Pili	Toxines	Enzymes	Sidérophores	Protéines	Référence
Constitué de 4 à 6 sucres et 77 types d'antigènes		- Mannose-sensitifs (MSHA) - hémagglutinines mannose résistants (MRHA)			Aerobactine		(Podschun et Ullmann, 1998)
<i>Escherichia coli</i>							
Chez la souche K1 et UPEC	Présente	Fimbriae de type 1, S, FC1, F9 et P, Iha, IrgA et Dr Chez UPEC	- α -hémolysine HylA - β -hémolysine -CNF 1 et 2 chez UPEC activent l'organisation de cytosquelette -Sat, Pic et Tsh		entérobactine	Ibe (invasion of brain endothélium)	(D. Kaufman et K.D. Fairchild, 2004) (S.M. Jacobsen et al., 2008) ; (R. Podschun et U. Ullmann, 1998)

8.2.3. *Enterobacter* :

Les bactéries appartenant au genre *Enterobacter* sont des bacilles à Gram négatif, commensales de l'intestin de l'homme et des isolats fécaux fréquents chez les nouveau-nés. (Fok et al., 1998)

Cependant, *Enterobacter sakazakii*, *E. agglomerans* et *E. cloacae* peuvent contaminer les aliments déshydratés des nouveau-nés. (Kaufman et Fairchild., 2004)

Ainsi, L'utilisation de céphalosporines de troisième génération augmente le risque de colonisation par *Enterobacter cloacae*. (Lachassinne et al., 2003)

E. cloacae et *E. aerogenes* sont responsables des septicémies (Cordero et al., 1999) alors que *E. sakazakii* peut causer le sepsis et méningite chez les prématurés (Kaufman et Fairchild., 2004), ainsi que des abcès du cerveau et elle tue 40% à 80% des nouveau-nés infectés. (Bowen et Braden., 2006)

Ainsi, le cathétérisme intraveineux et la nutrition parentérale sont les facteurs de risque les plus importants pour la survenue des septicémies à *Enterobacter*. (Fok et al., 1998)

Les espèces d'*Enterobacter* sont aussi responsables aussi de pneumonies associées à la ventilation. (Foglia et al., 2007)

8.3. *Pseudomonas spp.*

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, mobiles, aérobies strictes et ubiquitaires. (Murray et al., 1999)

P. aeruginosa produit un pigment spécifique bleu-vert appelé pyocyanine. Il se comporte comme un agent pathogène opportuniste essentiellement chez les immunodéprimés et les patients atteints de mucoviscidose. (Murray et al., 1999)

Il peut avoir comme réservoir les mains et les ongles de personnels soignant (Kaufman et Fairchild., 2004)

C'est une espèce répandue dans l'hôpital connue comme présente dans les incubateurs humidifiés, éviers et conduits de ventilation (Kaufman et Fairchild., 2004), ainsi que dans l'équipement de thérapie respiratoire, antiseptiques, savons et médicaments. (Lister et al., 2009)

Ainsi, il peut aussi avoir comme réservoir les mains et les ongles du personnel soignant (Kaufman et Fairchild, 2004)

Synthèse bibliographique

Pseudomonas est responsable de 50 à 75% de mortalité due au sepsis tardif dans unités de soins intensives néonataux. (Kaufman et Fairchild, 2004)

P. aeruginosa est un pathogène partiellement virulent pour VLBW. Elle peut causer la pneumonie, conjonctivite et bactériémie. (Kaufman et K.D. Fairchild, 2004)

La gravité de conjonctivite se concrétise par la possibilité d'évoluer vers une infection invasive de l'œil, bactériémie, méningite, abcès cérébrale et la mort. (Kaufman et Fairchild, 2004)

Chapitre 3 : Diagnostic des infections nosocomiales néonatales

1. Critères de diagnostic

Toute aggravation inexplicée de l'état du nouveau-né doit faire suspecter une infection. (Guibert et Boithias., 1999)

Dans la plupart des cas il s'agit d'un ensemble d'arguments qui fait suspecter une infection, pratiquer un bilan et, souvent, en raison de la gravité potentielle, traiter le nouveau-né. (Guibert et Boithias., 1999)

Le diagnostic des INN repose sur l'association de contexte clinique de patient à des arguments biologiques, radiologiques et microbiologiques.

Il existe des critères qui définissent les infections INN dont l'exemple le plus connu et les critères de CDC. Quelques critères CDC de certaines sont présentés dans l'annexe 2.

2. Arguments cliniques :

Les signes cliniques d'INN sont non spécifiques. Les principaux signes à rechercher sont :

- Un changement de teint gris ou pâleur (Guibert et Boithias., 1999) ;
- Détresse respiratoire, apnée, cyanose (Parat et Ouchérif., 2003) ;
- Bradycardie, tachycardie (Guibert et Boithias., 1999) ;
- Mauvaise hémodynamique périphérique, temps de recoloration >3sec (Parat et S. Ouchérif., 2003) ;
- Impotence douloureuse d'un membre, inflammation cutanée localisée. (Parat et Ouchérif, 2003)

Des signes cliniques spécifiques peuvent parfois orienter vers un organe, qui peut être le point de départ de l'infection. (Guibert et Boithias., 1999)

3. Eléments d'orientation : Les marqueurs biologiques d'infection néonatale

Les marqueurs biologiques d'infection (MBI) permettent d'orienter le diagnostic.

Les MBI incluent la vitesse de sédimentation (VS), la *C reactive proteine* (CRP), la procalcitonine (PCT), la fibrinogène et l'orosomucoïde. (Rodière et Zebiche., 2002)

Les situations de détermination ou non des MBI sont présentées dans l'annexe 3 et les caractéristiques de PCT sont présentées dans l'annexe 4.

4. Arguments radiologiques :

L'imagerie médicale peut être utilisée pour aider à la localisation de foyers infectieux profonds. Elle a aussi pour objectif de mettre en évidence les abcès et guider des ponctions à visée diagnostique.

5. Diagnostic de laboratoire en microbiologie :

5.1. Prélèvements :

Pour la mise en évidence d'un agent infectieux, il est important de savoir si le prélèvement à analyser provient d'une région corporelle habituellement stérile, ou si le prélèvement peut contenir une flore de colonisation. (Kayser et al., 2008)

Les types de prélèvements utilisés dans le diagnostic des INN sont présentés dans l'annexe 5.

5.2. Procédés diagnostiques :

Une infection peut être diagnostiquée *directement* par l'isolement de la bactérie ou de l'un de ses constituants ou d'une de ses productions, mais aussi *indirectement* par la mise en évidence d'une réaction immunologique spécifique contre cet agent infectieux. (Kayser et al., 2008)

Les procédés diagnostiques sont présentés dans l'annexe 6.

Une identification positive du pathogène dans un prélèvement du patient est couplée avec un test de sensibilité aux antibiotiques « l'antibiogramme » ou de E test pour définir le traitement convenable.



Chapitre 4 : Traitement des infections nosocomiales néonatales

1. Antibiotiques actifs sur la flore à Gram négatif :

Les antibiotiques (ATB) qui sont utilisés contre les BGN sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Antibiotiques agissant contre les bactéries à Gram négatif

Bactéries	Antibiotiques agissant sur les bactéries	Référence
Entérobactéries	<ul style="list-style-type: none">• β-lactamines, Fluoroquinolones• Carbapénèmes, Aminoglycosides	(Bryskier et al., 1999)
<i>P. aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none">• β-lactamines, Fluoroquinolones,• Aminoglycosides	(Bryskier et al., 1999)
<i>A. baumannii</i>	<ul style="list-style-type: none">• Carbapénèmes, Sulbactame• Polymixines (colistine, polymixine B), Tigécycline	(Peleg., 2008)

2. Résistance des bactéries à Gram négatif aux antibiotiques :

2.1. Nature de la résistance aux antibiotiques :

2.1.1. Résistance non génétique :

La résistance non-génétique aux antibiotiques n'est pas transmissible, que ce soit verticalement ou horizontalement. Elle est souvent une conséquence du milieu ou d'un changement brusque dans le métabolisme d'une bactérie. (Tremblay., 2007)

2.1.1.1. L'évasion :

L'évasion se produit lorsque la bactérie infectante est placée hors d'atteinte de l'antibiotique, soit à cause d'une mauvaise distribution de ce dernier dans l'organisme, ou d'une forme de fuite de la bactérie. (Tremblay., 2007)

2.1.1.2. Arrêt de production de la majeure partie de paroi bactérienne :

Cela rend la bactérie insensible aux agents antimicrobiens qui agissent sur la synthèse de la paroi. (Tremblay., 2007)

2.1.1.3. Surproduction ou absence de la cible : (Tremblay., 2007)

2.1.2. Résistance génétique :

2.1.2.1. Résistance naturelle ou intrinsèque :

C'est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne (Yala et al., 2001), les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie. (Carle., 2009)

Elle est permanente et stable, transmise verticalement mais pas horizontalement. (Carle., 2009)

2.1.2.2. Résistance acquise :

C'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques. L'acquisition de gène se fait soit par mutation chromosomique soit par transferts d'ADN (**Figure 3**). (Yala et al., 2009)

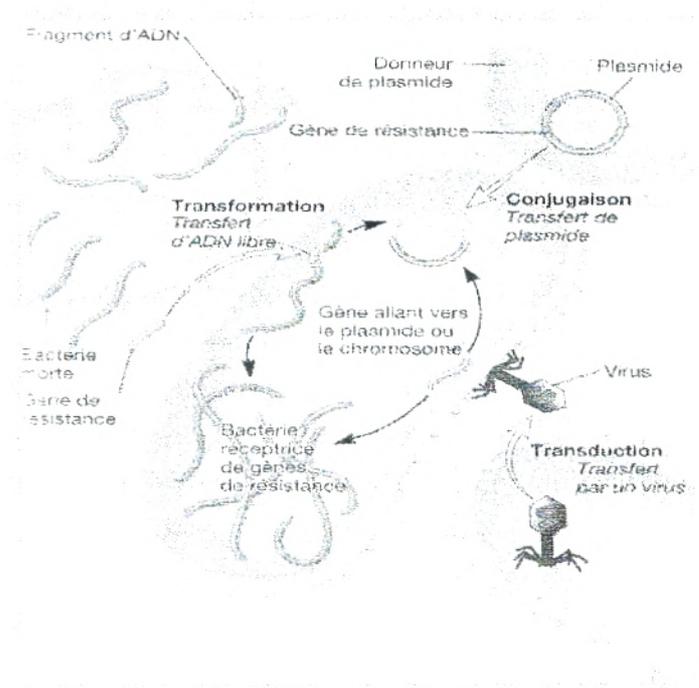


Figure 3 : L'échange génétique horizontal (Prescott et al., 2010)

2.2. Mécanismes de résistance :

Il existe 4 mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques entre autres mécanisme de résistance par inhibition enzymatique, par système d'efflux, par modification de cible et par imperméabilité (Carle., 2009)

La figure 4 représente les 2 premiers mécanismes de résistance. Ces mécanismes peuvent être classés en mécanismes enzymatiques et mécanismes non enzymatiques.

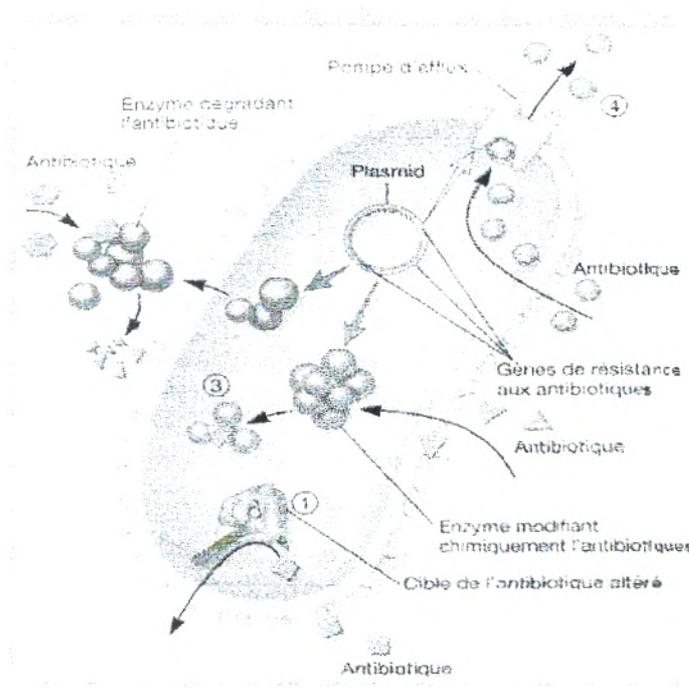


Figure 4 : Les mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques

Les bactéries résistent à l'action des antibiotiques en (1) modifiant la cible d'antibiotique. (2) et (3) dégradant l'antibiotique ou le modifiant (4) rejetant rapidement l'antibiotique. (Prescott et al., 2010)

2.2.1. Mécanismes de résistance enzymatiques :

La bactérie produit une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique, c'est le mécanisme de résistance le plus répandu (**Figure 4 (2) et (3)**). (Carle., 2009)

Le tableau 7 présente les enzymes produites par certaines bactéries à Gram négatif.

La bactérie produit une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique, c'est le mécanisme de résistance le plus répandu (**Figure 4 (2) et (3)**). (Carle., 2009) .

Il existe une variété d'enzymes β -lactamases capables d'hydrolyser le cycle β -lactame des β -lactamines, classées selon leurs séquences d'acides aminés en 4 groupes (A, B, C et D), c'est la classification d'Amblar. (Mérens et al., 2011).

Ainsi, les enzymes des classes A, C et D possèdent une sérine au niveau de leur site actif tandis que les enzymes appartenant à la classe B requièrent un cation divalent, en général le zinc comme cofacteur, d'où leur nom de métallo-enzymes. (Mérens et al., 2011).

Synthèse bibliographique

Tableau 7 : Résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif par mécanisme enzymatique

Espèce bactérienne	Antibiotique à lequel résiste	β -lactamase produite	Gène codant pour l'enzyme	Référence
<i>K. pneumoniae</i>	Ceftazidime	β -lactamase à spectre étendu (BLSE) type SHV-5 BLSE type TLA-1	<i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{TEM}	(D. Alcanter-Curiel et al., 2004)
	Autres antibiotiques	β -lactamase type CTX-M β -lactamase type SFO β -lactamase type VEG β -lactamase type GES		(J. Wachino et al., 2004)
<i>P. aeruginosa</i>	Imipénème β -lactamines, aminopénicillines, céphalosporines de 1 ^{ère} et 2 ^{ème} génération	β -lactamase type GES-2 BLSE, dénommée AmpC		(L. Poirel et al., 2001) (A. Mérens et al., 2011)
	Céphalosporines	β -lactamase chromosomique de classe C BLSE de classe A		(G. Kartali et al., 2002)
<i>E. cloacae</i>	Ceftazidime	BLSE type IBC-1	<i>bla</i> _{IBC-1}	(G. Kartali et al., 2002)
<i>Acinetobacter spp.</i>	β -lactamines	β -lactamase type TEM		(A. Y. Peleg et al., 2008)

2.2.2. Mécanismes de résistance non enzymatiques :

2.2.2.1. Mécanisme de résistance par imperméabilité :

Ce mécanisme est utilisé par les bactéries pour empêcher l'antibiotique de pénétrer dans la cellule. (Tremblay., 2007)

Chez *P. aeruginosa*, la diminution de l'expression de la porine OprD ou D2 ou son altération est responsable de la résistance à l'imipénème. (Aubert et Carricajo, 2005)

Ainsi, la membrane externe en limitant la vitesse de pénétration intracellulaire des antibiotiques favorise l'action d'enzymes hydrolytiques ou modificatrices, ou de systèmes d'efflux. (Mérens et al., 2011)

Cette bactérie résiste aux carbapénèmes en présence de zinc, cadmium ou de cobalt : elle enclenche un interrupteur (appelé système à 2 composants) qui permet d'activer l'expression d'un système d'efflux (dénommé CzcCBA) expulsant les métaux hors de la bactérie et "ferme" en même temps la porine OprD (**Figure 5**). (Perron et al., 2009)

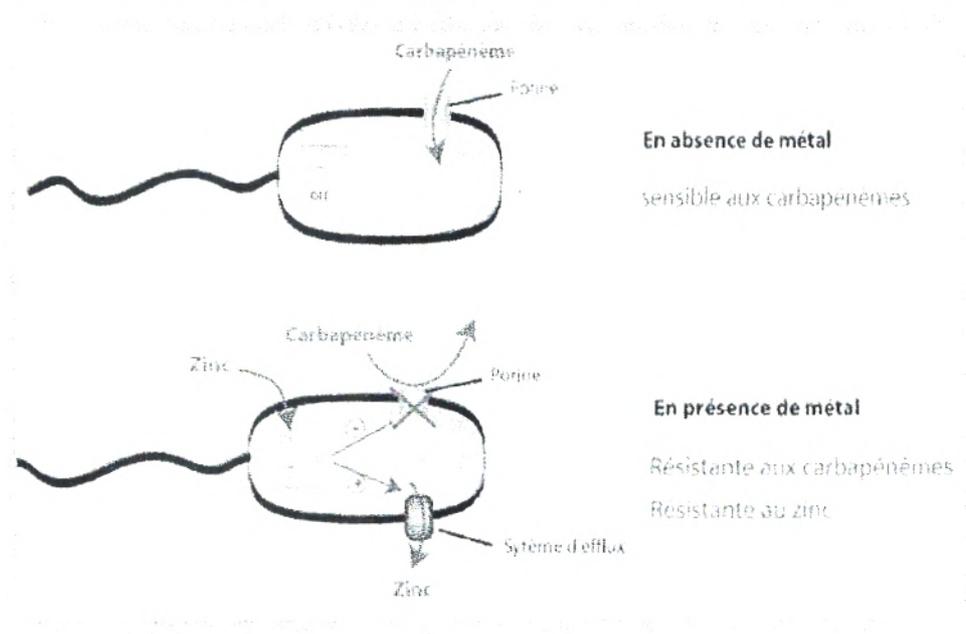


Figure 5 : Mécanisme de résistance aux carbapénèmes et aux métaux lourds
(Perron et al., 2009)

2.2.2.2. Mécanisme de résistance par système d'efflux :

La bactérie peut utiliser une pompe spécifique pour sortir l'antibiotique de la cellule (**Figure 4 (4)**). (S. Tremblay, 2007)

P. aeruginosa est capable de produire pas moins de douze systèmes d'efflux actif différents appartenant à la famille RND (Resistance Nodulation cell Division) mais seulement 2 systèmes appelés Mex (Multiple efflux) contribuent à la résistance naturelle aux ATB. (Mérens et al., 2011)

Ainsi, la pompe dénommée MexAB-OprM est responsable en grande partie de la résistance naturelle de cette bactérie aux aminosides, fluoquinolones et tétracyclines. (Mérens et al., 2011)

Aussi, il est important de mentionner que ces systèmes d'efflux fonctionnent grâce à l'énergie de la membrane cytoplasmique. (Mérens et al., 2011)

2.3.2.3. Mécanisme de résistance par modification de cible :

Ce type de résistance se produit lorsqu'une bactérie contourne le mode d'action de l'antibiotique. Elle peut alors posséder une version modifiée de la cible d'un antibiotique, ou acquérir une voie métabolique complète pour contourner l'effet de l'antibiotique (**Figure 4 (1)**). (Tremblay, 2007)

2.4. Recommandations pour limiter l'émergence des bactéries résistantes :

Les recommandations établies pour limiter l'émergence des bactéries résistantes sont présentés dans l'annexe 7.

Matrils

Et

Métopes

1. Type d'étude :

C'est une étude transversale visant d'identifier les bactéries à Gram négatif responsables de colonisation exogène des nouveau-nés ainsi que de déterminer leur niveau *actuel de résistance*.

2. Lieu d'étude :

Unité de néonatalogie à l'établissement hospitalier spécialisé E.H.S. mère et enfant de Tlemcen.

3. Période d'étude :

Le 2^{ème} trimestre de l'année 2012 à partir de 12 Mai 2012 jusqu'à 24 Juin 2012.

4. Population étudiée

Les nouveau-nés âgés de 1 à 30 jours y compris les prématurés admis à l'unité de néonatalogie à l'établissement hospitalier spécialisé E.H.S. mère et enfant de Tlemcen.

A chaque sujet seront associées les informations suivantes : la date de naissance, le sexe, le poids, l'âge gestationnel, la date d'admission, le diagnostic présumptif et l'*antibiothérapie*.

5. Démarche suivie : (Figure 6)

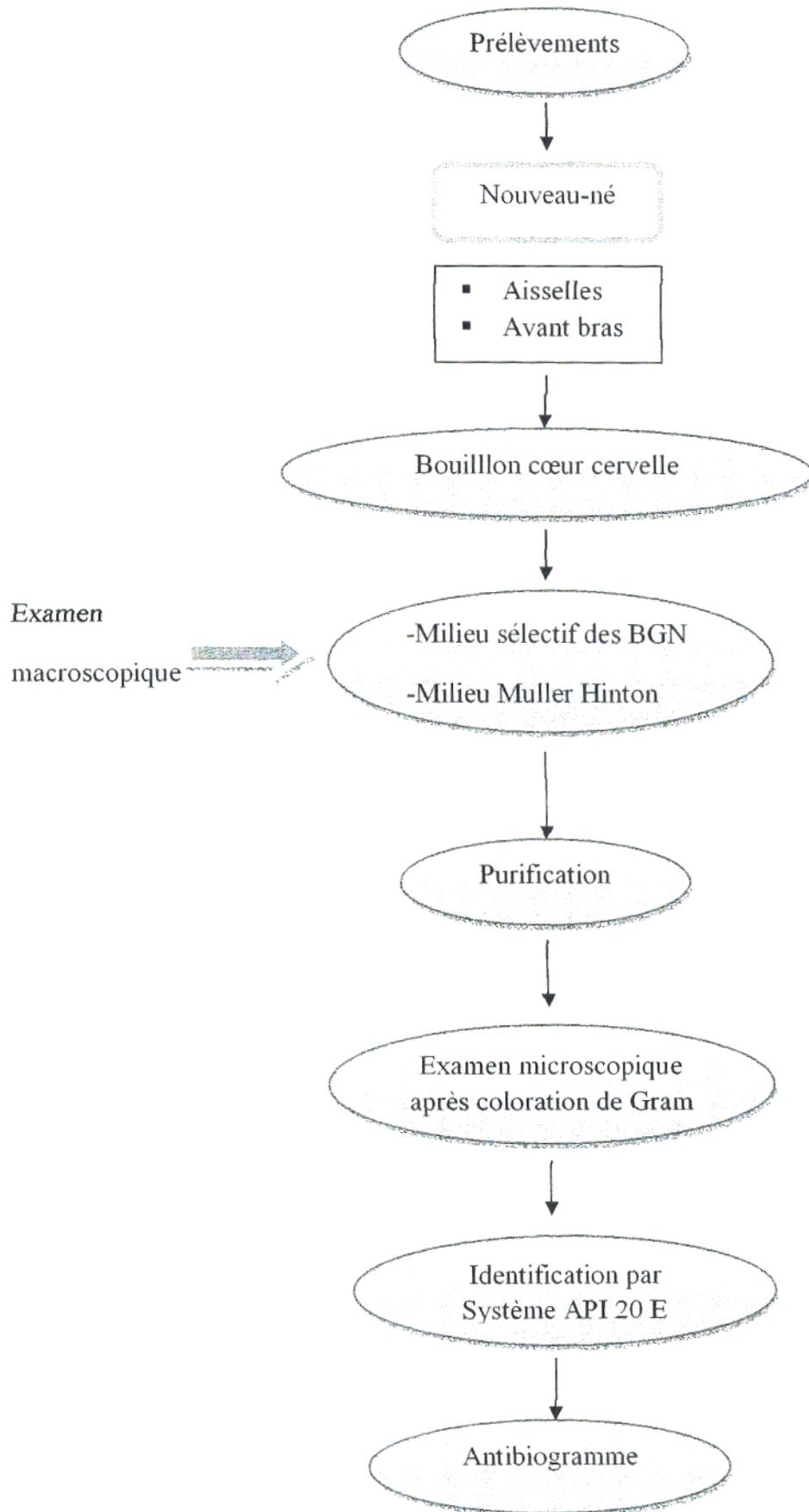


Figure 6 : Schéma de la démarche suivie



6. Matériels :

Le matériel et les produits utilisés sont présentés dans l'annexe 8.

7. Méthodes :

7.1. Nature des prélèvements :

7.1.1. Prélèvements à partir des nouveau-nés :

Des prélèvements à partir des nouveau-nés ont été réalisés par écouvillonnage de l'aisselle et de l'avant bras de chaque patient inclus dans l'étude. Chaque écouvillon a été ensemencé dans 5 ml de bouillon BHIB et incubé à 37°C pendant 24 heures.

7.1.2. Prélèvements à partir de l'environnement immédiat des nouveau-nés :

2 boîtes ouvertes contenant la gélose nutritive ont été mis dans le bloc d'accouchement et dans la salle du service de néonatalogie où sont présents les nouveau-nés. Les boîtes ont été laissées ouvertes pendant 1 heure à 1 heure et ½ puis elles ont été incubées à 37°C pendant 24 heures à 48 heures.

7.2. Isolement :

L'isolement a été réalisé à partir de bouillon BHIB sur gélose Mac Conkey et milieu Muller Hinton par méthode d'ensemencement par épuisement. Après ensemencement les milieux ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

7.3. Purification :

La purification a été faite par repiquages successifs alternés sur bouillon nutritif puis sur le milieu Mac Conkey ou le milieu Muller Hinton.

7.4. Coloration de Gram :

Cette technique permet de déterminer la morphologie des bactéries présentes dans un frottis (cocci ou bacilles), ainsi que classer ces bactéries en bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Les bactéries colorées en roses sont des bactéries à Gram négatif et celles colorées en violet sont des bactéries à Gram positif.

7.5. Identification :

L'identification a été faite par utilisation de la Galerie API 20E.

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

❖ Préparation de l'inoculum :

- Remplir les tubes à essai avec 7 ml de l'eau physiologique stérile ;
- Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu Mac Conkey à l'aide de pipette Pasteur. Utiliser des cultures jeunes (18-24 heures) ;
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être inoculée ex-temporairement.

❖ Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ;
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation ;
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

❖ Inoculation de la galerie :

- A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Renfermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

❖ Lecture de la galerie :

Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture présenté dans l'annexe 9 en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :

- Test IND : Kovacs
- Test VP : VP 1 et VP
- Test NIT : NIT 1 et NIT 2

❖ Identification :

Elle est réalisée à l'aide du logiciel d'identification.

7.6. Antibiogramme :

❖ Principe :

Le principe est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient d'antibiotique qui diffuse à partir de disque dans le milieu gélosé. L'antibiogramme a été donc effectué selon la méthode de diffusion de l'antibiotique sur gélose selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2011 présentés dans l'annexe 10.

Le diamètre de la zone d'inhibition varie selon la sensibilité de la souche.

Les antibiotiques utilisés sont présentés dans l'annexe 8.

❖ Technique :

- La gélose Muller Hinton doit être coulée en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm ;
- A partir d'une culture jeune de 18 à 24h, préparer une suspension de 1 à 2 colonies dans 10 ml de BHIB et incuber sous agitation pendant 5h ;
- A partir de cette culture, préparer la suspension bactérienne, avec de l'eau physiologique stérile à 0,9%, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une densité optique (DO) de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne de la cuve afin de décharger au maximum. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut au bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Déposer les disques (maximum 6 pour une boîte de 90mm) à la surface de la gélose en les appliquant délicatement à la pince stérile.
- Etuver 18 à 24 heures à 37 °C.
- Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et comparés aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture, puis la bactérie est classée dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante. (**Annexe 10**)

7.7. Conservation des souches :

Les souches bactériennes isolées et purifiées ont été ensemencées dans la gélose nutritive inclinées et incubées à 37°C pendant 24 heures ensuite elles ont été conservées dans le réfrigérateur à 4°C.



Résultats

Et

Discussion

1. Résultats :

1.1. Prélèvements :

Au cours de la période d'étude s'étalant de 12 Mai 2012 au 24 Juin 2012, 40 prélèvements ont été réalisés à partir des nouveau-nés hospitalisés au niveau de l'unité de néonatalogie de l'EHS de Tlemcen et 2 prélèvements à partir de l'environnement immédiat des nouveau-nés : bloc d'accouchement et salle dans laquelle ils sont hospitalisés. (**Figure 7**)

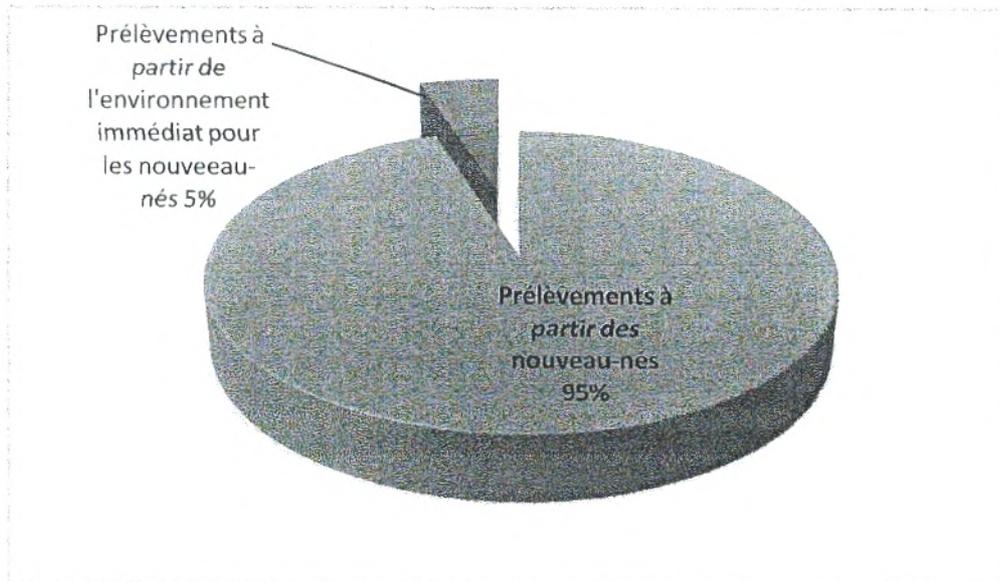


Figure 7 : Répartition globale des prélèvements selon leur nature

Les prélèvements à partir des nouveau-nés ont été réalisés à partir des nouveau-nés à terme et des prématurés.

Parmi les nouveau-nés à terme 5 ont été atteints d'asphyxie néonatale, 2 atteints de syndrome de détresse respiratoire, 1 atteint de paralysie de plexus brachial, 1 atteint d'irritabilité, 1 né d'une mère diabétique, 2 ont eu une CRP positive et 1 atteint d'infection post natale.

Parmi les prématurés 2 ont été atteints d'asphyxie néonatale, 3 atteints de syndrome de détresse respiratoire, 1 a eu une insuffisance rénale et prématuré a été mort.

A partir de la peau des nouveau-nés :

Sur 40 prélèvements analysés, 34 se sont révélés positifs, soit un taux de 85%, alors que 15% sont négatifs (**Figure 8**):

Résultats et discussion

- sur 1 boîte de Mac Conkey, le résultat négatif pour l'isolement des bactéries à partir des aisselles des nouveau-nés à terme.
- sur 2 boîtes de Muller Hinton, le résultat négatif pour l'isolement des bactéries à partir des aisselles des nouveau-nés à terme
- sur 2 boîtes pour l'isolement des bactéries à partir des aisselles des prématurés le résultat était négatif.
- l'ensemencement sur 1 boîte pour l'isolement des bactéries à partir de l'avant-bras des prématurés a été négatif

Les autres boîtes sont de résultat positif.

Nous considérons donc comme négatifs, les prélèvements qui ne présentent aucun signe de culture au niveau du bouillon BHIB ainsi que sur le milieu Mac Conkey et Muller Hinton.

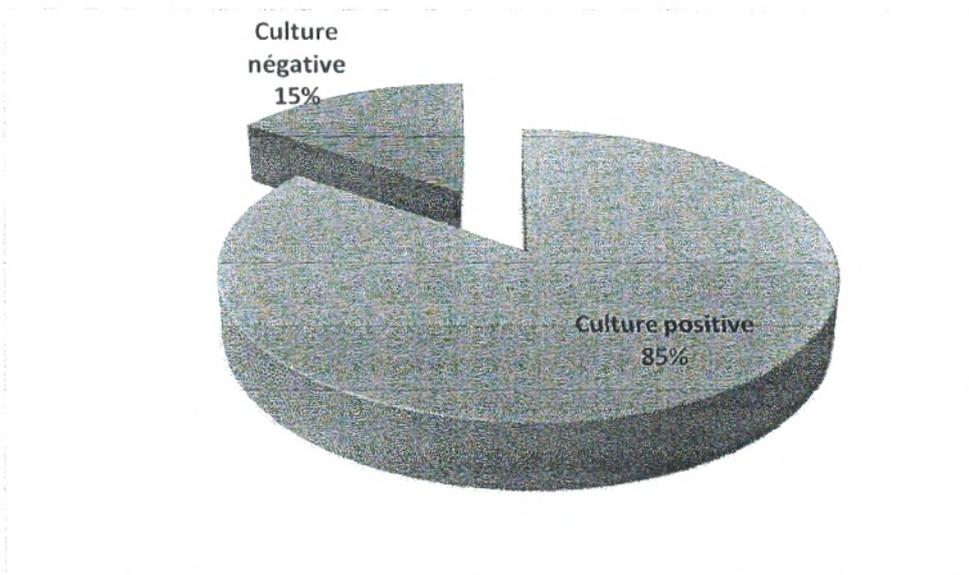
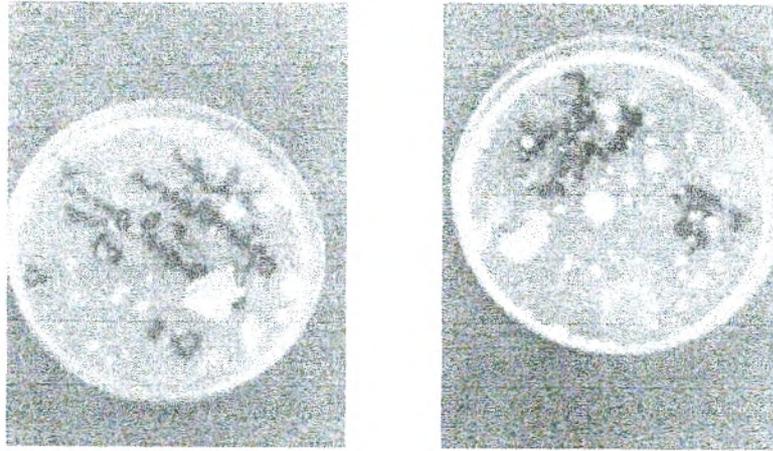


Figure 8 : Répartition des prélèvements selon leur culture

A partir de l'environnement immédiat des nouveau-nés :

Concernant les prélèvements à partir de l'environnement immédiat des nouveau-nés, le résultat après incubation pendant 24 à 48 heures à 37°C était l'apparition des colonies bactériennes de couleurs différentes et une colonie de champignons. **(Figure 9)**



(1)

(2)

Figure 9 : Aspect des colonies dans les boîtes de Pétri après incubation

(1) : Bloc d'accouchement ; (2) Salle des nouveau-nés

1.2. Coloration de Gram :

Pour les prélèvements effectués sur les nouveau-nés, les bacilles à Gram négatif ont été les plus répandus mais il existe des cocci à Gram négatif et quelques cocci à Gram positif.

Pour les prélèvements à partir de l'environnement immédiat pour les nouveau-nés, les résultats sont les suivantes :

Après une incubation de 24 à 48 heures réalisée, une coloration de Gram a été effectuée pour sélectionner les colonies à ensemercer dans les milieux sélectifs des BGN.

- Résultats des lames de coloration de Gram réalisée sur les colonies appartenant au bloc opératoire d'accouchement :
 - Cocci à Gram négatif dispersés ;
 - Bacilles à Gram négatif regroupés en paire ;
 - Cocci à Gram négatif regroupés en amas et dispersés ;
 - Cocci à Gram négatif regroupés en amas
- Résultats des lames de coloration de Gram réalisée sur les colonies appartenant à la salle des nouveau-nés :
 - Cocci à Gram négatif regroupés en amas ou dispersés ;
 - Cocci à Gram négatif regroupés en amas ;
 - Bacilles à Gram négatif regroupés en chaînettes
 - Cocci à Gram négatif regroupés en amas.

Résultats et discussion

Après coloration de Gram, des boîtes de Mac Conkey et de Muller Hinton ont été ensemencées et incubés pendant 24 heures à 37°C.

- Résultats des boîtes appartenant au bloc d'accouchement :
 - Le résultat de la boîte de Mac Conkey était positif (**Figure 10(1)**) ;
 - Le résultat de la boîte de Muller Hinton était positif (**Figure 10(2)**).
- Résultats des boîtes appartenant à la salle des nouveau-nés :
 - Le résultat de la boîte de Mac Conkey était négatif. (**Figure 10(3)**)
 - Le résultat de la boîte de Muller Hinton était positif. (**Figure 10(4)**)

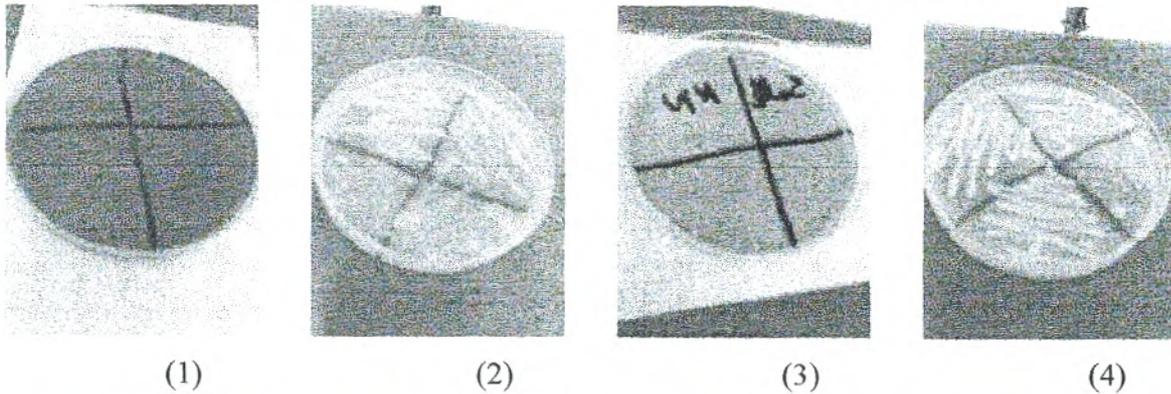


Figure 10 : Résultats des boîtes appartenant au bloc d'accouchement et à la salle des nouveau-nés

- (1) : résultat positif de boîte de Mac Conkey appartenant au bloc opératoire d'accouchement ;
(2) : résultat positif de boîte de Muller Hinton appartenant au bloc opératoire d'accouchement ;
(3) : résultat négatif de boîte de Mac Conkey appartenant à la salle des nouveau-nés ;
(4) : résultat positif de boîte de Muller Hinton appartenant à la salle des nouveau-nés.

Après, l'apparition des résultats précédents des colorations de Gram ont été réalisés sur des colonies prélevées à partir des boîtes de Muller Hinton positives.

- Résultats de coloration de Gram :
 - *Boîte appartenant au bloc d'accouchement* :
 - Bacilles à Gram négatif et Coci à Gram négatif ;
 - Bacilles à Gram négatif ;
 - Bacilles à Gram négatif ;
 - Bacilles à Gram Positif sporulés : *Bacillus*

➤ *Boite appartenant à la salle des nouveau-nés :*

- Cocci à Gram positif ;
- Cocci à Gram positif dispersés ;
- Cocci à Gram négatif ;

1.3. Résultats de l'identification et de l'antibiogramme :

Le développement bactérien sur le milieu Muller Hinton n'est pas spécifique aux bactéries à Gram négatif, d'autres bactéries à Gram positif (Staphylocoques) peuvent y cultiver. La coloration de Gram à partir du milieu Muller Hinton confirme la présence des bactéries à Gram négatif.

Sur 80 souches isolées et purifiées 20 souches ont été identifiées avec la Galerie API 20E. (Figure 11).

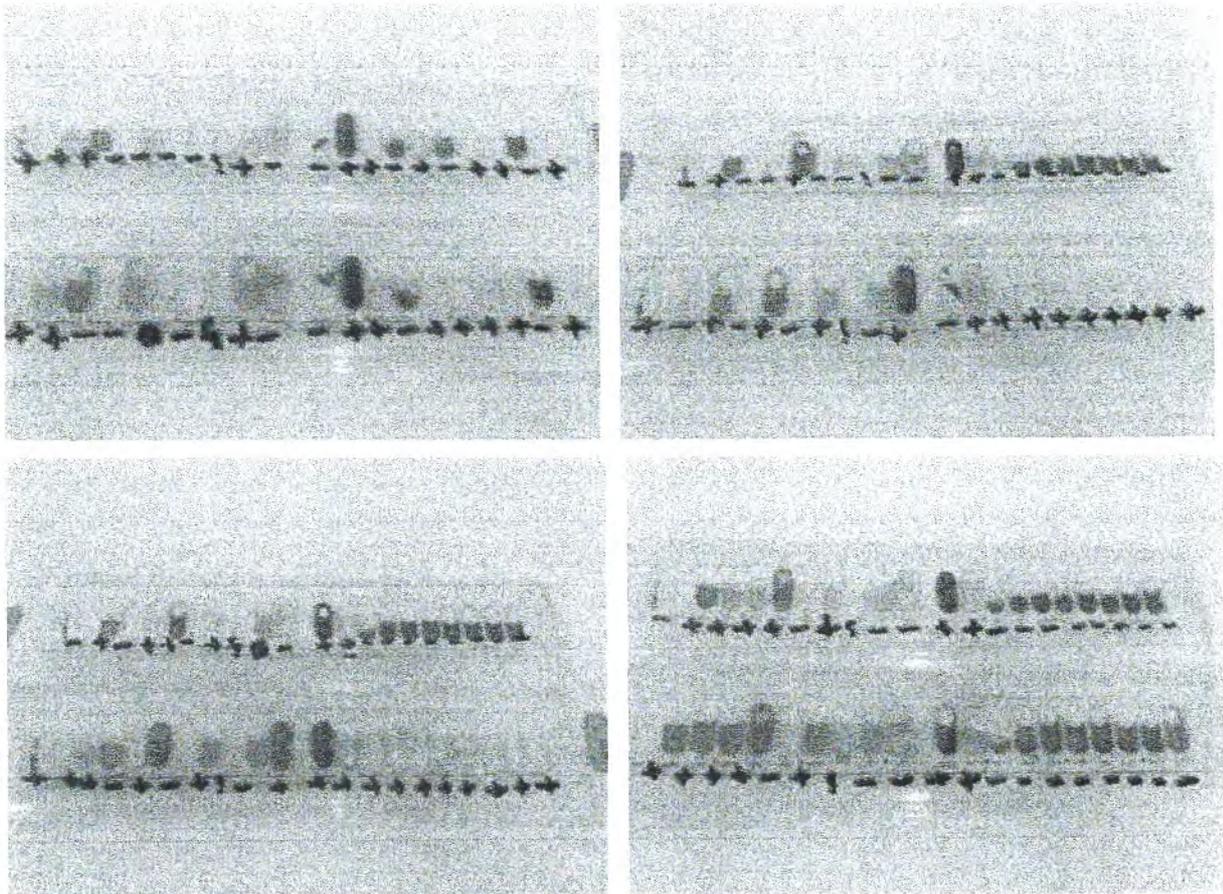


Figure 11 : Résultats de l'identification des bactéries selon API 20E

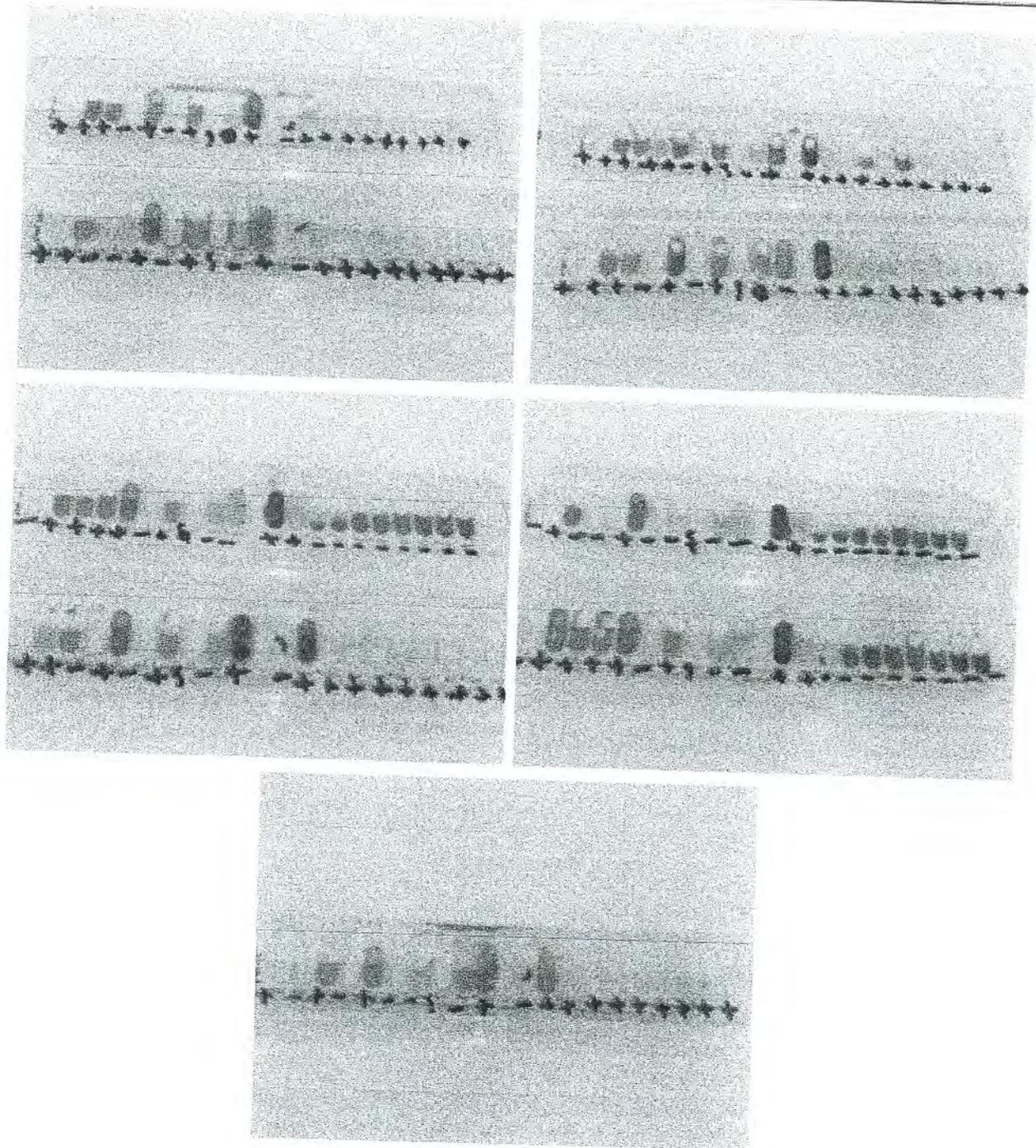


Figure 11 : suite

Les résultats de l'antibiogramme sont présentés dans la figure 12.

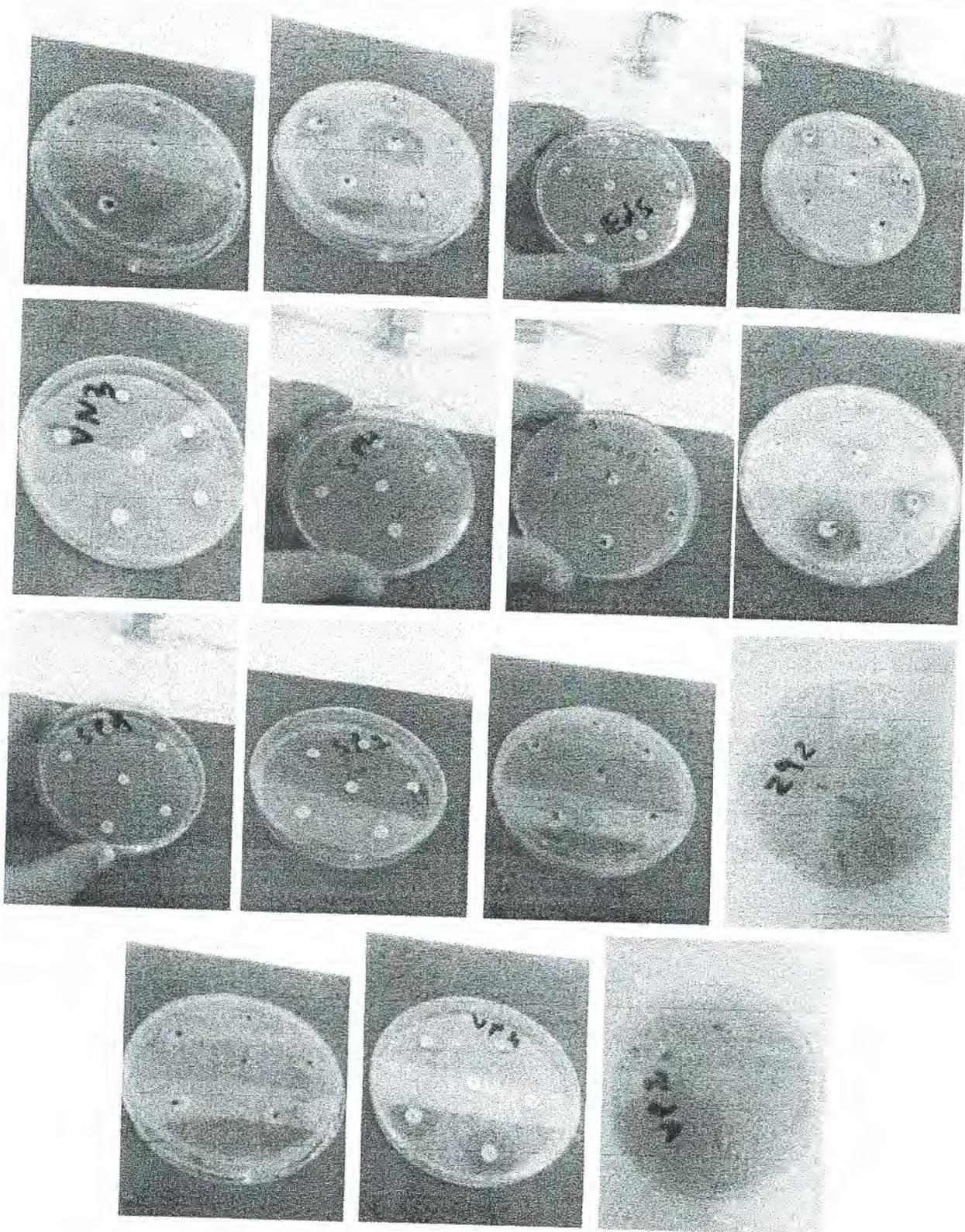


Figure 12: Résultats de l'antibiogramme

Résultats et discussion

Les résultats de l'identification et l'antibiogramme selon l'origine des souches identifiées sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Résultats de l'identification et de l'antibiogramme

Numéro du Patient	Origine des souches	Système API 20 E	Antibiogramme		
			O	G	C
1	Aisselles de nouveau-né à terme	<i>Escherichia coli</i> 1	S	R	R
2	Aisselles de nouveau-né à terme	<i>Escherichia coli</i> 1	S	S	R
3	Aisselle de nouveau-né à terme	<i>P. aeruginosa</i>	S	-	I
4	Aisselle de nouveau-né à terme	<i>K. pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i>	R	R	R
5	Aisselle de nouveau-né à terme atteint d'infection post-natale	<i>P. aeruginosa</i>	S	S	-
6	Avant bras de nouveau-né à terme	<i>Escherichia coli</i> 1	R	-	R
7	Avant bras de nouveau-né à terme	<i>K. pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i>	S	R	S
8	Avant bras de nouveau-né à terme	<i>K. pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i>	S	R	I

Résultats et discussion

Numéro du Patient	Origine des souches	Système API 20 E	Antibiogramme		
			O	G	C
9	Aisselle de prématuré	<i>P. aeruginosa</i>	S	I	R
10	Aisselle de prématuré	<i>Serratia marcescens</i>	S	R	R
11	Aisselle de prématuré	<i>P. aeruginosa</i>	S	S	-
12	Aisselle de prématuré	<i>P. aeruginosa</i>	S	S	-
13	Aisselle de prématuré	<i>K. pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i>	S	R	I
14	Avant-bras de prématuré	<i>Serratia ficaria</i>	S	R	R
15	Avant-bras de prématuré	<i>K. pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i>	S	R	S
/	Bloc opératoire d'accouchement	<i>Serratia marcescens</i>			/
/	Salle des nouveau-nés	<i>P. aeruginosa</i>			/

S : sensible ; R : Résistante ; I : intermédiaire. O : Ofloxacine, G : Gentamycine, C : Céfoxitine.

Résultats et discussion

Concernant les 2 prélèvements à partir de l'environnement immédiat pour les nouveau-nés, les 2 bactéries à Gram négatif identifiées sont : *Serratia marcescens* dans le bloc opératoire d'accouchement et *Pseudomonas aeruginosa* dans la salle des nouveau-nés.

En plus, selon la coloration de Gram l'air de bloc opératoire d'accouchement est colonisé par des bacilles à Gram positif. Alors que l'air de la salle des nouveau-nés colonisée par des cocci à Gram positif et des cocci à Gram négatif.

Sur les 20 souches identifiées, 18 souches ont comme origine les aisselles et les avant bras des nouveau-nés à terme et des prématurés (**Tableau 9**) et 2 souches ont comme origine le bloc opératoire d'accouchement et la salle des nouveau-nés.

Tableau 9 : Distribution des bactéries à Gram négatif en fonction des sites de prélèvement

Sites de prélèvements	Espèces bactériennes identifiées
Aisselle de nouveau-né à terme	2 souches assignées à <i>Escherichia coli</i> 1
	1 souche assignée à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	1 souche assignée à <i>Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae</i>
Aisselle de nouveau-né à terme atteint d'infection post-natale	1 souche assignée à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Aisselle de prématuré	3 souches assignées à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	1 souche assignée à <i>Serratia marcescens</i>
Avant bras de nouveau-né à terme	1 souche assignée à <i>Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae</i>
	1 souche assignée à <i>Escherichia coli</i> 1
	2 souches assignées à <i>Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae</i>
	1 souche de <i>Chromobacterium violaceum</i>

Résultats et discussion

Avant bras de prématuré

1 souche assignée à *Klebsiella pneumoniae*
subsp pneumoniae

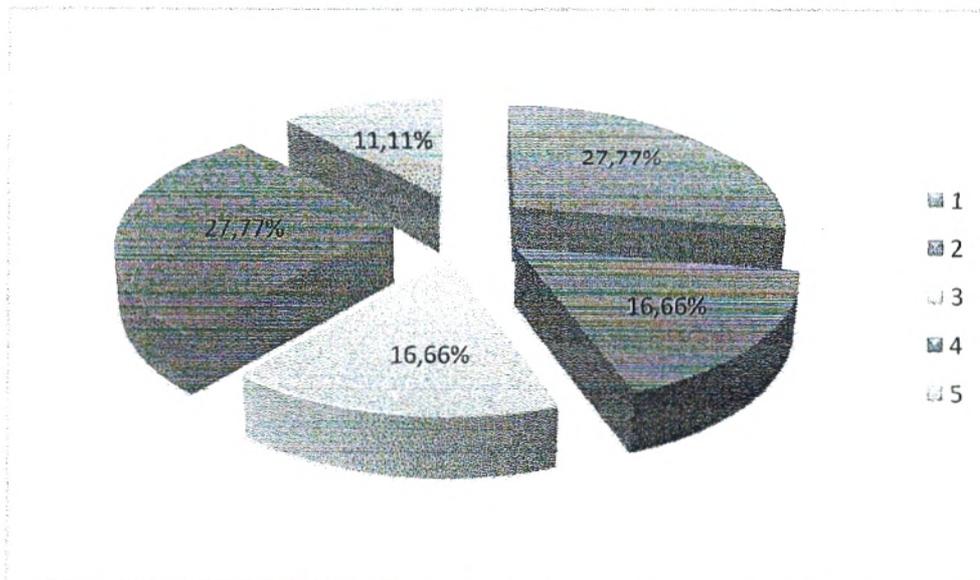
1 souche assignée à *Serratia ficaria*

1 souche assignée à *Raoultella terrigena*

1 souche assignée à *Chromobacterium*
violaceum

Au total, 18 souches appartenant à la flore exogène responsable de colonisation ont été identifiées dont 10 entérobactéries, 5 *P. aeruginosa* et 3 bactéries appartenant à d'autres espèces : 2 *Chromobacterium violaceum*, 1 *Raoultella terrigena*. **(Figure 13)**

Parmi les 10 entérobactéries, les espèces identifiées sont réparties comme suit : 3 *E.coli* 1, 5 *K. pneumoniae* subsp *pneumoniae*, 2 *Serratia*.



- 1 : *Pseudomonas aeruginosa*
- 2 : Autres espèces
- 3 : *Escherichia coli* 1
- 4 : *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae*
- 5 : *Serratia*

Figure 13 : Répartition des souches exogènes identifiées

1.4. Résistance aux antibiotiques :

Les souches isolées des aisselles des nouveau-nés à terme ont exprimé une sensibilité de 75% à l'ofloxacin (Figure 14)

Ainsi, ces souches ont exprimé un niveau moyen de sensibilité aux aminosides avec 50% de résistance à la gentamycine (Figure 14)

Aussi, ces souches ont exprimé une résistance de 100% à la Céfoxitine (Figure 14)

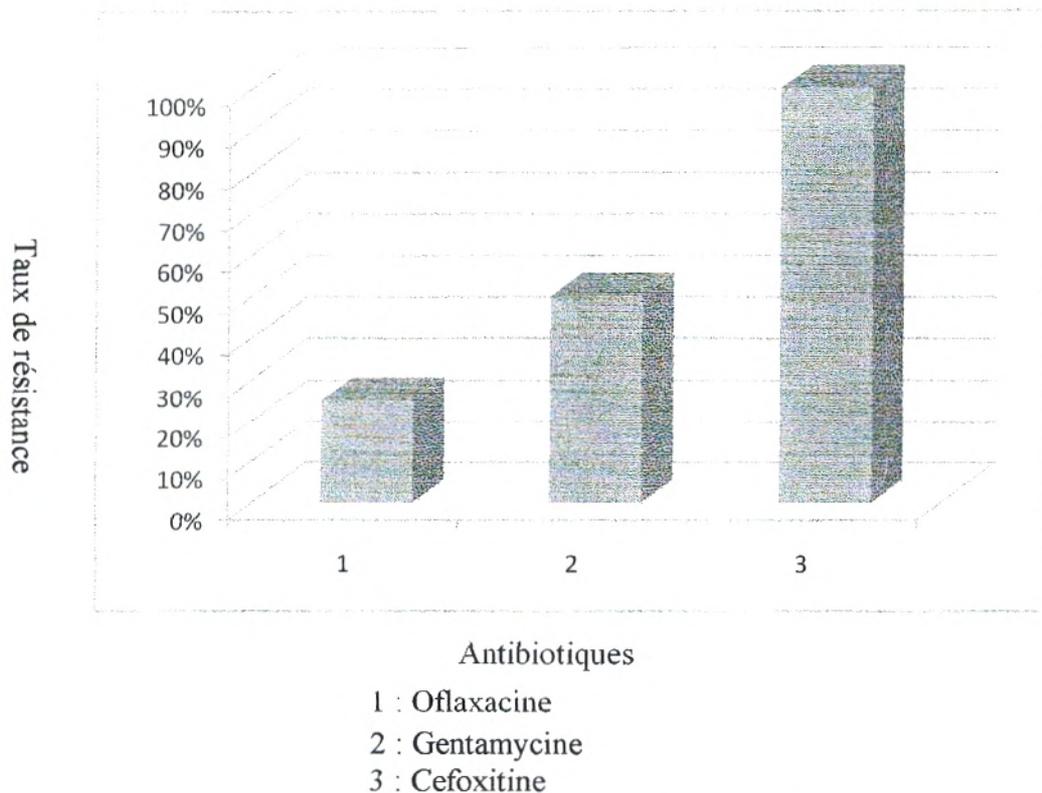


Figure 14 : Profil de résistance des souches isolées des aisselles des nouveau-nés à terme

La souche isolée de l'aisselle du nouveau-né à terme atteint d'infection post-natale est sensible aux fluoroquinolones et aux aminosides.

Les souches isolées des aisselles des prématurés ont exprimé une sensibilité aux fluoroquinolones avec 100% de sensibilité à l'ofloxacin (Figure 15)

Ainsi, ces souches ont exprimé un faible niveau de sensibilité aux aminosides avec 20% de sensibilité à la gentamycine. (Figure 15)

En plus, ces souches ont exprimé un niveau moyen de résistance aux céphalosporines avec 40% de résistance à la Céfoxitine (Figure 15)

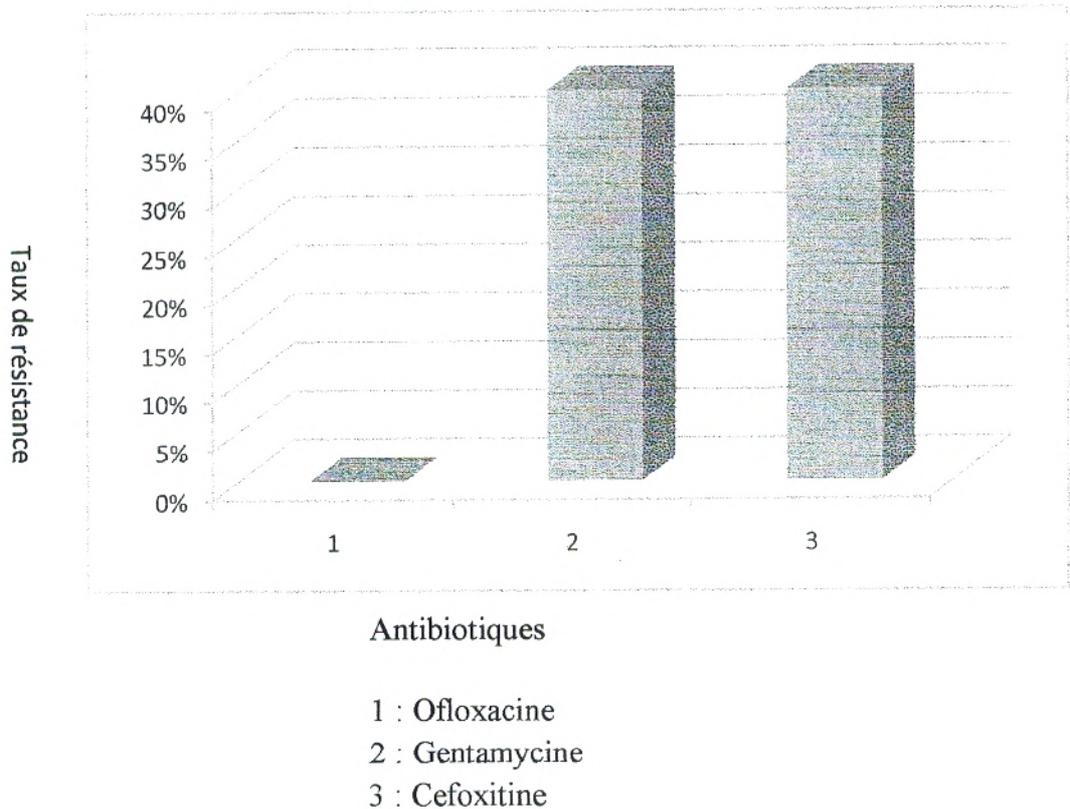


Figure 15 : Profil de résistance des souches isolées des aisselles des prématurés

Les souches isolées des avant bras des nouveau-nés à terme ont exprimé une sensibilité de 66,66% à l'ofloxacine. **(Figure 16)**

Les souches isolées des avant bras des nouveau-nés à terme ont exprimé une sensibilité à l'ofloxacine avec 66,66% **(Figure 16)**

Ainsi, ces souches ont exprimé une résistance à la gentamycine avec 100% de résistance **(Figure 16)**

Aussi, ces souches ont exprimé un faible niveau de résistance à la Céfoxitine avec 33,33% de résistance **(Figure 16)**

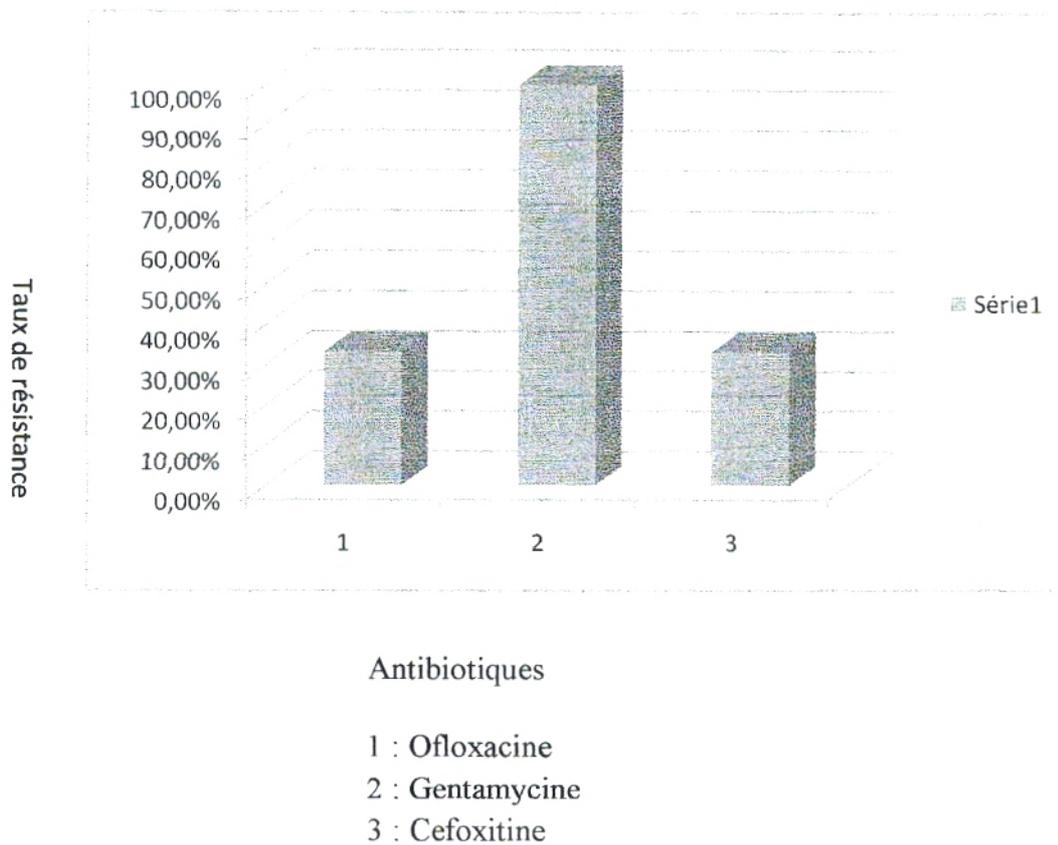


Figure 16: Profil de résistance des souches isolées des avant bras des nouveau-nés à terme

Les souches isolées des avant bras des prématurés ont exprimé un niveau de sensibilité à l'ofloxacine de 100% (**Figure 17**)

Ainsi, ces souches ont exprimé un niveau de résistance à la gentamycine avec 100% de résistance (**Figure 17**)

De plus, ces souches ont exprimé une résistance modérée de 50% à la Céfoxitine (**Figure 17**)

Résultats et discussion

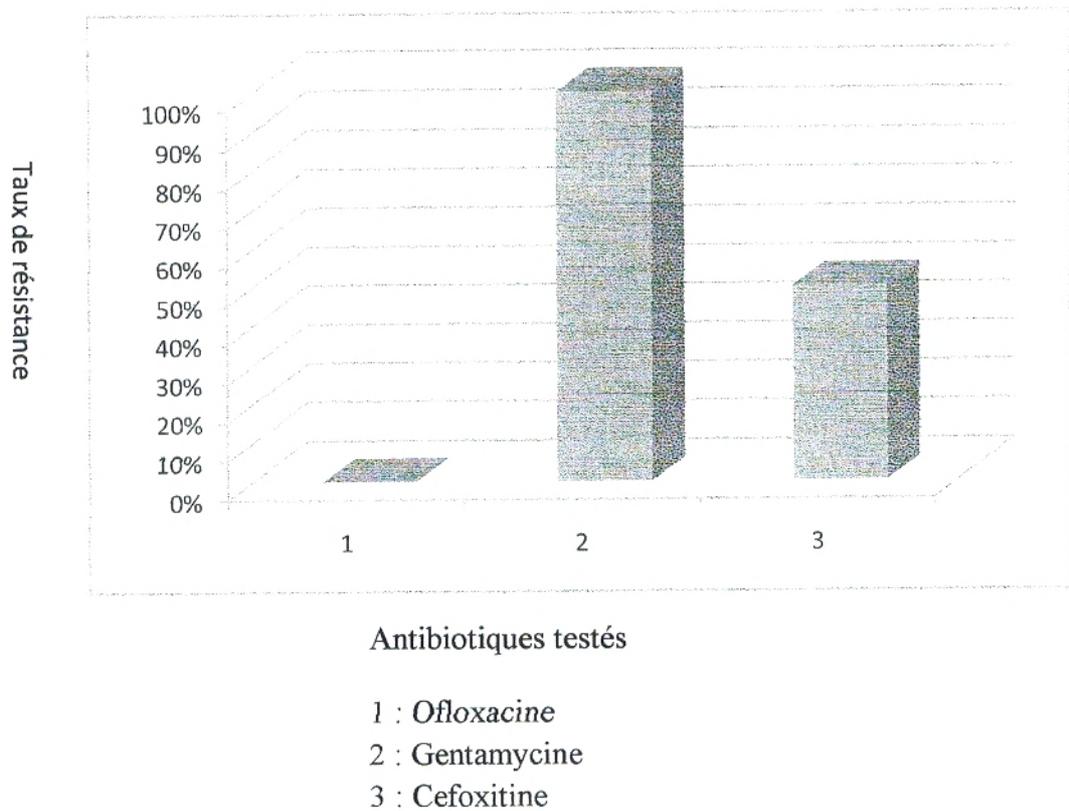
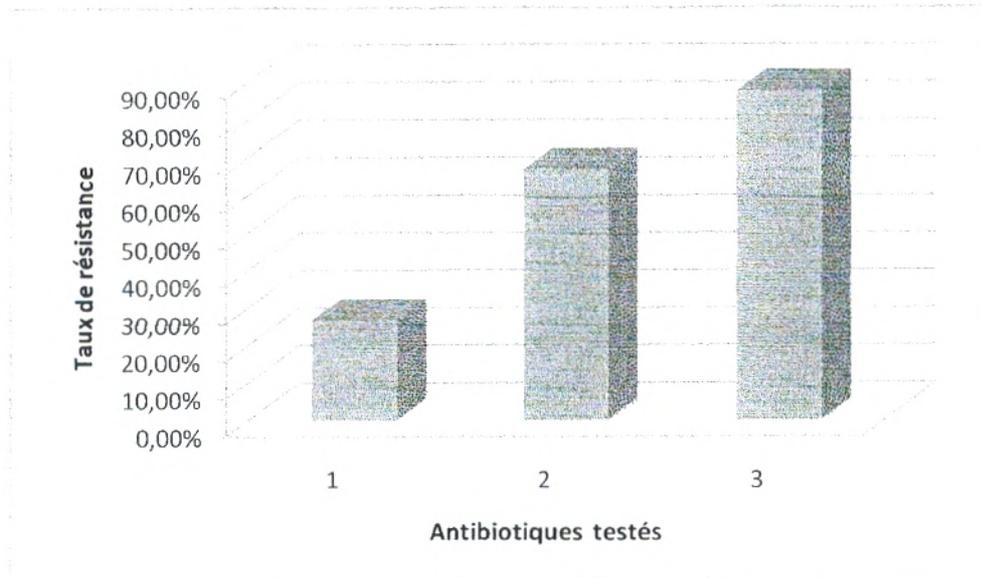


Figure 17: Profil de résistance des souches isolées des avant bras des prématurés

Le taux de résistance aux céphalosporines est élevé : il est supérieur à 87%. Chez ces souches, la résistance aux fluoroquinolones est de 28%, alors que le taux de résistance aux aminosides est de 66,66%. (Figure 18)





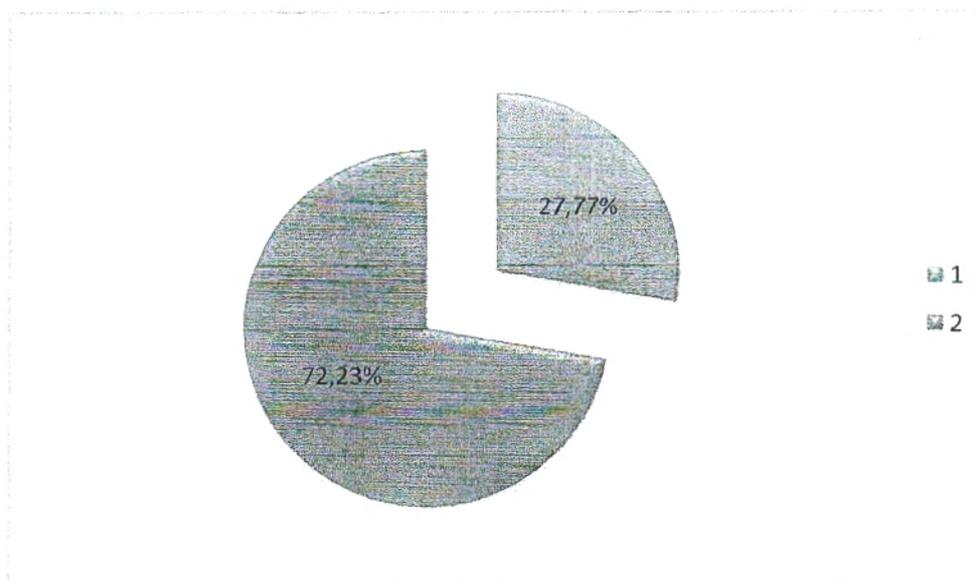
1 : Ofloxacine
2 : Gentamycine
3 : Cefoxitine

Figure 18 : Taux de résistance des souches identifiées aux antibiotiques testés

1.5. Etat de la multirésistance :

Parmi les 18 souches étudiées, 5 souches (27,77%) sont multirésistantes aux antibiotiques testés (**Figure 19**) :

- La souche *E. coli* 1 isolée de l'aisselle d'un nouveau-né à terme était résistante à 2 antibiotiques : la gentamycine (aminosides) et la cefoxitine (céphalosporines) ;
- La souche *K. pneumoniae* subsp *pneumoniae* isolée de l'aisselle d'un nouveau-né à terme était résistante à 3 antibiotiques : l'ofloxacine (fluoroquinolones), la gentamycine et la cefoxitine.
- La souche *S. marcescens* isolée de l'aisselle de prématuré était résistante à 2 antibiotiques : la gentamycine et la cefoxitine.
- La souche *E. coli* 1 isolée de l'avant bras d'un nouveau-né à terme était résistante à 3 antibiotiques : l'ofloxacine, la gentamycine et la cefoxitine.
- La souche *S. ficaria* isolée de l'avant bras d'un prématuré était résistante à 2 antibiotiques : la gentamycine et la cefoxitine.



1 : Taux des souches multirésistantes
2 : Taux des autres souches résistantes

Figure 19 : Taux des souches multirésistantes

2. Discussion :

2.1. Identification :

Par comparaison :

- Les aisselles des nouveau-nés à terme sont colonisées fréquemment par *E. coli* 1 suivie par *P.aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae* ;
- Les aisselles des nouveau-nés des prématurés sont colonisées fréquemment par *P.aeruginosa* suivie par *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae*, *E. coli* 1 et *Serratia marcescens* ;
- Les avant-bras des nouveau-nés à terme sont colonisés par *K. pneumoniae* subsp *pneumoniae* et par *E. coli* 1 ;
- Les avant-bras des prématurés sont colonisés par *Serratia ficaria* et *K. pneumoniae* subsp *pneumoniae*
- L'aisselle de nouveau-né atteint d'infection post-natale est colonisée par *P. aeruginosa*.

Résultats et discussion

Donc *E. coli* 1 est l'espèce la plus fréquente qui colonise les aisselles des nouveau-né à terme et *P. aeruginosa* est l'espèce bactérienne la plus fréquente qui colonise les aisselles des prématurés.

Alors que *K. pneumoniae* subsp *pneumoniae* est la plus fréquente en ce qui concerne la colonisation des avants bras des nouveau-nés à terme. En plus, *K. pneumoniae* subsp *pneumoniae* et d'autres espèces non fréquentes telles que *Serratia ficaria* colonisent les avants bras des prématurés.

La raison pour laquelle la souche *E. coli* 1 était l'espèce la plus fréquente qui colonise les aisselles des nouveau-nés à terme peut être que la souche est d'origine fécale.

Elle représente à lui seul la plus grande partie de la flore bactérienne aérobie de l'intestin (espèce aérobie dominante) à raison de 10^8 par gramme de fécès (flore totale : 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme).

Cependant elle possède un potentiel pathogène qu'elle exprime dans certaines circonstances (pathogènes opportunistes) :

- par pénétration par voie urétrale ascendante (contiguïté) dans l'arbre urinaire ;
- par essaimage à point de départ digestif.

Ainsi, la flore cutanée du prématuré est peu stable et très influencée par l'écologie microbienne hospitalière.

A l'hôpital, le prématuré est rapidement colonisé par des bactéries qui sont éventuellement multi-résistantes. (SFHH., 2007) C'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa* colonisant les aisselles des prématurés.

Donc l'origine de cette bactérie peut être la flore hospitalière ou cette bactérie appartient à la flore cutanée transitoire.

Les bactéries de la flore résidente, longtemps considérées comme peu dangereuses, peuvent devenir pathogènes opportunistes lors d'effraction du revêtement cutané et provoquer des infections sévères (Baumgartner et al., 1998).

Les mains portent souvent une flore transitoire abondante (rôle dans la transmission croisée).

L'origine de *K. pneumoniae* subsp *pneumoniae* colonisant les avant bras des nouveau-nés à terme et des prématurés peut être la flore fécale des nouveau-nés ou la flore commensale de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires. (Avril et al., 1992)

L'origine de *Serratia ficaria* peut être les mains du personnel soignant.

La colonisation par ces souches peut être dangereuse car elle peut évoluer vers une infection (qui peut être nosocomiale) si la flore traverse la peau et si le nombre de bactéries appartenant à la flore cutanée transitoire dépasse les normes.

Selon le CDC, le nombre des bactéries aérobies de la peau diffère d'un site à un autre : le nombre de bactéries sur le cuir chevelu est de l'ordre de 10^6 UFC/cm², le nombre de bactéries de l'aisselle est de l'ordre de 5×10^5 UFC/cm², le nombre de bactéries sur l'abdomen est de l'ordre de 4×10^4 UFC/cm², le nombre de bactéries sur l'avant-bras est de l'ordre de 10^4 UFC/cm². Ainsi, le nombre total de bactéries sur les mains du personnel soignant est de l'ordre de $3,9 \times 10^4$ to $4,6 \times 10^6$ UFC.

Serratia marcescens qui a été trouvée dans le bloc opératoire d'accouchement est une bactérie opportuniste, elle est responsable d'infections urinaires après manœuvres instrumentales ; infections respiratoires dues à l'emploi d'appareils de ventilation artificielle ou par aérosols ; surinfections des plaies par des antiseptiques contaminés ; septicémies compliquant les infections précédentes ou consécutives à l'usage de cathéters. (Avril et al., 1992)

2.2. Résistance aux antibiotiques :

60% des souches de *P. aeruginosa* sont sensibles à l'ofloxacine et 40% sont résistantes à la gentamycine, c'est le taux qui a été retrouvé par Minchella et al. (2009), et 20% des souches sont résistantes à la Céfoxitine.

Malgré que 100% des souches de *K. pneumoniae* subsp *pneumoniae* sont résistantes à la gentamycine, 40% sont sensibles au Céfoxitine et 60% sont sensibles à l'ofloxacine.

Ce n'est pas le taux retrouvé dans l'étude de Nadmi et al. (2009) dont le taux de résistance à la gentamycine était de 0% et celui à la Céfoxitine était de 23%. Ainsi, le taux de résistance à la gentamycine n'est pas le même retrouvé dans l'étude de Bouzenoune (8,3%) en 2008.

Ainsi, le taux de résistance à l'ofloxacine dans l'étude de Bouzenoune et al. (2008) était de l'ordre de 15,8% : le taux retrouvé dans notre étude (40%) est supérieur à ce taux.

66,66% des souches d'*E. coli* 1 sont sensibles à l'ofloxacine et 66,66% sont résistante à la gentamycine. Contrairement à ce qui a été retrouvé par Tagajdid et al. (2008) dont le taux de résistance des souches *E. coli* à l'ofloxacine a été de 27% et aussi à ce qui a été retrouvé par Bouzenoune et al. (2008) dont le taux de résistance signalé a été égal à 10,1%.

Résultats et discussion

Ainsi, le taux de résistance à la gentamycine dans notre étude est supérieur à celui retrouvé dans l'étude de Nadmi et al. (2009) qui était de 8,7%.

100% des souches de *Serratia* sont sensibles à l'ofloxacine et 100% sont résistantes à la gentamycine. Contrairement à ce qui a été retrouvé par Minchella et al. (2008) dont le taux de résistance à la gentamycine était de 5%.

Une publication récente de Souli et al.(2008) rapportant les taux de résistance des bacilles à Gram négatif en Europe issus du réseau de surveillance *European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)* a indiqué, pour la France, des taux de résistance aux cinq principaux antibiotiques (ou familles d'antibiotiques) qui étaient les suivants : les aminosides : 31 % ; les fluoroquinolones : 26,3 %. (Minchella et al. 2009)

Chez nos souches testées, le taux de résistance aux céphalosporines est élevé : il est supérieur à 87%. Chez ces souches, la résistance aux fluoroquinolones est de 28%, alors que le taux de résistance aux aminosides est de 66,66%. (**Figure 18**)

Donc le taux de résistance à l'ofloxacine est assez proche de celui que nous avons observé dans la présente étude. Alors que le taux de résistance à la gentamicine dans notre étude est supérieur que celui de l'étude de Souli et al.

Une altération de la cible ribosomale, un défaut de pénétration membranaire et une inactivation enzymatique sont les principaux mécanismes des résistances bactériennes aux aminosides, mais le dernier est essentiel et concerne la plupart des bactéries. (Lambert., 2005) Donc, l'ofloxacine (fluoroquinolones) est l'antibiotique le plus actif sur les bactéries identifiées suivi par la gentamycine (aminosides).

2.3. Etat de la multirésistance :

27,77% des souches exogènes sont multirésistantes aux antibiotiques testés (**Figure 19**), ce n'est pas qui a été retrouvé par Vaillant et al. (2009) dont le taux de multirésistance de *E. coli* était 20% et de *K. pneumoniae* était 46%.

Les souches isolées des aisselles des nouveau-nés ont été les plus multirésistantes.

Conclusion

Conclusions :

Au terme de notre étude, les 18 souches isolées des aisselles et des avant bras des nouveau-nés ont présenté des résistances vis-à-vis les différents antibiotiques testés.

Ces souches se sont parfois caractérisées par une multirésistance.

La colonisation par la flore exogène peut être dangereuse car elle peut évoluer vers une infection si la flore traverse la peau et si le nombre de bactéries appartenant à la flore cutanée transitoire dépasse les normes.

Chez le nouveau-né hospitalisé, la flore cutanée est très influencée par l'écologie microbienne hospitalière.

La maîtrise de la dissémination de ces germes doit passer par la formation du personnel soignant en matière d'hygiène, et le respect des procédures de lavage des mains. Ainsi, l'application d'un nettoyage de la peau des nouveau-nés par des antiseptiques peut avoir comme objectif de diminuer la concentration des microorganismes sur la peau ou les muqueuses lors d'une procédure invasive.

En perspective de ce travail, il serait intéressant d'explorer les mécanismes d'adhésion de ces microorganismes.

Références

Bibliographies



Articles :

Almmuneef M, Memish Z A, Balkhy H H, Alalem H, Abutaleb A. Ventilator-Associated Pneumonia In a Pediatric Intensive Care Unit in Saudi Arabia : A 30-Month Prospective Surveillance. *Pediatrics* 2000;

Bergogne-Bérézin E, Towner K J. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clinical Microbiology Reviews* 1996;

Baumgartner C, Constant H, Putet G, Aulagner G. Efficacité comparée de deux préparations de chlorhexidine alcoolique dans l'antisepsie cutanée du nouveau-né pour ponction veineuse. *Journal de Pharmacie Clinique* 1998;

Blond M H, Gold F, Pierre F, Quentin R, Aujard Y. Infection bactérienne néonatale par contamination materno-fœtale : pour un accouchement de paradigme ? 1^{re} partie : Dépistage de l'infection à *Streptococcus agalactiae* : modalités et bilan des effets. Elsevier Masson 2001;

Blond M H, Poulain P, Gold F, Bingen E, Watier H, Quentin R. Infection bactérienne materno-fœtale. Elsevier SAS 2005;

Bouzenoune F, Boudersa F, Bensaad A, Harkat F, Siad N. Les infections urinaires à Ain a9M'lila (Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007

Bowen A B, Braden C R. Invasive *Enterobacter sakazakii* Disease in Infants. *Emerging Infectious Diseases* 2006. Elsevier SAS 2008 ;

Bouzenoune F, Boudersa F, Bensaad A, Harkat F, Siad N. Les infections urinaires à Ain M'lila (Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007. Elsevier SAS 2008 ;

Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter Baumannii* Biofilm Associated Protein (Bap) Plays a role in Adherence to Human Epithelial Cells. *Pub Med* 2011;

Brouwer M C, Tunkel A R, Van de Beek. Epidemiology, Diagnosis, and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial Meningitis. *Clinical Microbiology Reviews* 2010;

Campeotto F, Garnier F, Kalach N, Soulaïnes P, Dupont C, Raymond J. Acquisition nosocomiale de bactéries multirésistantes dans un service de néonatalogie : Etude prospective et analyse des facteurs de risque. Elsevier SAS 2004;

Cordero L, Sananes M, Ayers L W. Bloodstream Infections In a Neonatal Intensive-Care Unit : 12 Years' Experience With An Antibiotic Control Program. Pediatrics 2000;

Curiel D A et al. Nosocomial Bacteremia and Urinary Tract Infections Caused by Extended-Spectrum β -Lactamase- Producing *Klebsiella pneumoniae* with Plasmids Carrying Both SHV-5 and TLA-1 Genes. Clinical Microbiology Reviews 2004;

Dubos F. Stratégie de prise en charge (diagnostic, surveillance, suivi) d'une méningite présumée bactérienne de l'enfant. Elsevier Masson SAS 2009;

Fok T F et al. Risk Factors for *Enterobacter* Septicemia in a Neonatal Unit : Case-Control Study. Clinical Infectious Diseases 1998;

Fredricks D N. Microbial Ecology of Human Skin in Health and Disease. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings 2001;

Gerdes J S. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. Elsevier Inc 2004;

Gill CJ et al. Impact of Enhanced Infection Control at 2 Neonatal intensive Care Units in The Philippines. Clinical Microbiology Reviews 2009;

Guibert M, C Boithias. Infections nosocomiales néonatales. Médecine thérapeutique / Pédiatrie 1999;

Guillemot D. Approche pharmaco-épidémiologique de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Elsevier 2003;

Habzi A, Benomar S. Les infections nosocomiales néonatales. Elsevier Masson 2001 ;

Horrevorts A, Bergman K, Kollée L, Breuker I, Tjernberg I, Dijkshoorn L. Clinical And Epidemiological Investigations Of *Acinetobacter* Genomespecies 3 In A Neonatal Intensive Care Unit. Clinical Microbiology 1995;

Jacobsen S S M, Stickler D J, Mobley H L T. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews* 2008;

Jacoby G A. AmpC b-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2009;

Kartali G et al. Outbreak of Infections Caused by *Enterobacter cloacae* Producing the Integron-Associated β -Lactamase IBC-1 in a Neonatal Intensive Care Unit of a Greek Hospital. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 2002;

Kaufman D, Fairchild K D. Clinical Microbiology of Bacterial and Fungal Sepsis in Very-Low-Birth-Weight Infants. *Clinical Microbiology Reviews* 2004;

Lachassinne E, Letamendia R E, Gaudelus J. Epidémiologie des infections nosocomiales en néonatalogie. *Elsevier* 2004;

Lambert T. État actuel de la sensibilité des bactéries aux aminosides. *Elsevier* 2005;

LiPuma J J. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2010;

Luregn J et al. Differential Role of the Lectin Pathway of Complement Activation in Susceptibility to Neonatal Sepsis. *Clinical Infectious Diseases* 2010;

Malavaud S, Bou-Segonds E, Berrebi A, Castagno R, Assouline C, Connan L. Les infections nosocomiales chez la mère et l'enfant : à propos d'une enquête d'incidence portant sur 804 accouchements. *Elsevier Masson* 2003;

McDonald C L, Banerjee S N, Jarvis W R. Seasonal Variation of *Acinetobacter* Infections: 1987–1996. *Clinical Infectious Diseases* 1999;

Merchaoui S N et al. Intérêt de la C-réactive protéine (CRP) sériée dans la prise en charge des nouveau-nés suspects d'infection bactérienne materno-fœtale : étude prospective de 775 cas. *Elsevier* 2009;

Mérens A, Delacour H, Plésiat P, Cavallo J D, Jeannot K. *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone Des Laboratoires* 2011;

Minchella A, Molinari L, Defez Fougeron C, Lavigne J P, Sotto A, Bouziges N. Évolution de la résistance aux antibiotiques de *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii* et *Morganella morganii* au CHU de Nîmes : 2002–2006. Elsevier Masson SAS 2008

Minchella A, Molinari L, Alonso S, Bouziges N, Sotto A, Lavigne J P. Evolution of antimicrobials resistance against *Pseudomonas aeruginosa* in a French University Hospital between 2002 and 2006

Mussi Pinhata M M, De Nascimento S D. Neonatal nosocomial infection. Journal de Pédiatrie 2001;

Nadmi H, Elotmani F, Talmi M, Zerouali K, Perrier-Gros-Claude J D, Timinouni M. Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes communautaires à El Jadida (Maroc). Elsevier Masson SAS 2009 ;

Newby J. Nosocomial Infection in Neonates Inevitable or Preventable? Continuing education. Clinical microbiology 2008;

Peleg Y A, Seifert H, Paterson D L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. Clinical Microbiology Reviews 2008;

Pittet D, Ruef C. Bactériémies nosocomiales (Partie 1). Swiss-NOSO 1998;

Popowski T, Goffinet F, Batteux F Maillard F, Kayem G. Prédiction de l'infection materno-fœtale en cas de rupture prématurée des membranes par les marqueurs sériques maternels. Elsevier Masson SAS 2011;

Pósfay B K, Mühlemann K, Pittet D. Une infection nosocomiale néonatale : l'entérocolite nécrosante. Swiss-NOSO 2001;

Rodière M, Zebiche H. Indications des marqueurs biologiques d'infection en situation d'urgence. Elsevier SAS 2002;

Sarlangue J, Boralevi F, Barba G, Leautaud-Labrbze C. Infections bactériennes de la peau et des tissus mous chez le nouveau-né. Elsevier SAS 2001

Shete V B, Ghadage D P, Muley V A, Bhore V A. *Acinetobacter* Septicemia in Neonates Admitted to Intensive Care Units. Pub Med 2009;

Wachino J et al.. Nosocomial Spread of Ceftazidime-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Producing a Novel Class A β -Lactamase, GES-3, in a Neonatal Intensive Care Unit in Japan. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 2004;

Wexler H M. Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clinical Microbiology Reviews* 2007 ;

M.R. Tagajdid M R, Boumhil L, Iken M, Adnaoui M, Benouda A. Étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. Elsevier SAS 2008

Vaillant L, Ramarokoto C E, Randrianasolo L, Andrianirina F, Richard. Étude épidémiologique de la multirésistance aux antibiotiques des entérobactéries à Madagascar en milieu hospitalier. Elsevier SAS 2009

Ouvrages :

Avril J L, Dabernat H, Denis F, Monteil H, Biologie Cliniques, Paris : Ellipses, 1992 : 184

Bryskier A. Antibiotiques Agents Antimicrobiens Et Antifongiques, Paris : Ellipses, 1999 : 105-120

Guy B, Chantelot D, Salle B. Néonatalogie, 4^{ème} édition, Paris : Anette, 2003 : 1

Kayer F H, Bottger E C, Zinkernagel R M, Haller O, Eckert J, Deplazes R. Manuel de poche de microbiologie médicale, 5^{ème} édition, Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 2008 : 8-26

Ducel G, Fabry J, Nicolle L. Prévention des infections nosocomiales : Guide pratique. Organisation mondiale de la santé, 2008 : 5-7

Prescott, Harley, Klein. Microbiologie, 3^{ème} édition, Bruxelles : Be Boeck, 2010 : 59-802

Mémoire :

Simon Tremblay. Etude moléculaire du recrutement des gènes de résistance aux antibiotiques. Mémoire Biochimie. Paris : Université de Laval, 2007. (103 p)

Critères CDC des infections nosocomiales :

CDC. Definition of HAI and Criteria For Specific Types of Infections. 2012.

Recommandations pour limiter l'émergence des bactéries résistantes :

Haute autorité de santé. Recommandations : Stratégie d'antibiothérapie et prévention des résistances bactériennes en établissement de santé. 2008.

Guide des bonnes pratiques de l'antisepsie chez l'enfant :

SFHH. Guide des bonnes pratiques de l'antisepsie chez l'enfant. 2007

Recommandations de CDC pour l'hygiène des mains :

CDC. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. 2002

Annexes

Annexe 1 : Définitions des infections nosocomiales chez le nouveau-né

1. Septicémies nosocomiales :

La septicémie est caractérisée par la présence d'hémoculture(s) positive(s). S'il s'agit d'un germe pathogène, une seule hémoculture suffit. S'il s'agit d'un germe commensal de la peau (staphylocoques à coagulase négative, *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* spp., *Propionibacterium* spp, bacilles à Gram négatif aérobies et oxydatifs tels qu'*Aeromonas*, *Pseudomonas* autres qu'*aeruginosa*...) : le CDC, pour un enfant âgé de 12 mois ou moins, exige l'apparition d'au moins un des signes cliniques suivants : hyperthermie (plus de 38 °C), hypothermie (moins de 37 °C), apnée, bradycardies ; pour les enfants ne présentant pas les critères cliniques du CDC, on retient le diagnostic de septicémie si le clinicien est convaincu du diagnostic sur la foi d'autres signes cliniques, si l'antibiothérapie est maintenue pendant plus de 4 jours et s'il existe au moins une hémoculture positive si l'enfant a un cathéter veineux central et au moins deux hémocultures positives si l'enfant n'a pas de cathéter veineux central. (Guibert et Boithias., 1999)

2. Pneumopathies nosocomiales :

La définition des pneumopathies nosocomiales est basée sur des critères cliniques, radiologiques et microbiologiques observés après 48 heures d'admission à l'hôpital qui sont : opacités radiologiques récentes et progressives au niveau du parenchyme pulmonaire, toux expectorations purulentes et fièvre d'apparition récente avec l'isolement d'un microorganisme à partir d'un échantillon obtenu par aspiration trans-trachéale ou biopsie. (Ducel et al., 2008)

3. Pneumopathies associées à la ventilation :

On parle de pneumopathie associée à la ventilation chez un patient qui a subi une ventilation mécanique pour 48 heures ou plus avec une production de crachat progressive qui a été absente lors de radiographie et isolement d'un microorganisme à partir d'un échantillon obtenu par aspiration trans-trachéale ou biopsie. (Almuneef et al., 2002)

4. Bactériémies nosocomiales :

Une bactériémie nosocomiale est définie comme une hémoculture positive documentée plus de 48 heures après l'admission du patient associée à la présence de signes cliniques évocateurs d'un état septique. (Pittet et al., 1998)

Une pseudobactériémie est définie comme une seule hémoculture positive en absence de symptômes ou des signes cliniques, elle est considérée comme une contamination. (Pittet et al., 1998)

Elle n'est pas incluse dans les bactériémies nosocomiales. (Josette et al., 2000)

Les Types de bactériémies sont :

- Bactériémies primaires :

Elles surviennent en absence de source d'infection au niveau d'un autre site anatomique. Selon le CDC, lorsqu'un patient développe une bactériémie dont la source n'est pas identifiée et qu'il est porteur d'un cathéter intraveineux ou intra - artériel, l'infection est dite bactériémie primaire associée au cathéter. (Pittet et al., 1998)

- Bactériémies secondaires :

Elles compliquent les infections documentées au niveau d'un autre site anatomique (pneumonie, infection urinaire, infection de plaie, ...). Elles constituent 30% de tous les épisodes bactériémiques.

Il est possible que l'infection source soit polymicrobienne et que la bactériémie secondaire soit monomicrobienne. (Pittet et al., 1998)

5. Infection urinaire nosocomiale :

Elle est définie par un examen cyto bactériologique des urines positif (moins de 100000 UFC/ml, la culture étant mono-microbienne ou, au plus, bi-microbienne).

6. Gastro-entérites nosocomiales :

Elle est définie comme une installation de diarrhée absente à l'admission (selles liquides pendant plus que 12 heures), avec ou sans vomissement ou fièvre (température >38°C) et après avoir éliminé les causes non infectieuses. (Guibert et Boithias., 1999)



7. Infections de la peau et des tissus mous :

L'omphalite est habituellement provoqué par *S. aureus* ou des entérobactéries. Il peut y avoir une dissémination locorégionale (abcès, péritonite septique) ou systémique à type d'arthrite de hanche ou d'abcès du cerveau (*Proteus mirabilis*). (Sarlangue et al., 2001)

Annexe 2 : Critères CDC des infections nosocomiales néonatales

Infections urinaires symptomatique :

Selon le CDC, le nouveau-né a **au moins un** des signes ou symptômes suivantes avec aucune autre cause connue : fièvre ($>38^{\circ}\text{C}$), hypothermie ($< 37^{\circ}\text{C}$), apnée, bradycardie, dysurie, léthargie, ou vomissement.

Et au moins 1 des suivants :

- a. Bandelette positive pour leucocyte estérase et/ou nitrate ;
- b. Pyurie (échantillon d'urine avec ≥ 10 leucocytes/ mm^3) ;
- c. Observation des bactéries à Gram positif ou négatif dans l'urine ;
- d. Au moins 2 cultures d'urine avec isolation répétée de même uropathogène (bactérie à Gram négatif ou *S. saprophyticus*) avec $\geq 10^2$ colonies/mL dans un échantillon acceptable ;
- e. $\leq 10^5$ colonies/mL d'un seul uropathogène chez (bactérie à Gram négatif ou *S. saprophyticus*) un patient traité avec un antibiotique pour l'infection de tractus urinaire ;
- f. Diagnostic d'une IU fait par le médecin ;
- g. Thérapie pour une IU établie par l'hôpital.

Autres infections de tractus urinaire :

Selon le CDC, le nouveau-né a **au moins un** des signes ou symptômes suivantes avec aucune autre cause connue : fièvre ($>38^{\circ}\text{C}$, rectale), hypothermie ($< 37^{\circ}\text{C}$, rectale), apnée, bradycardie, léthargie, ou vomissement.

Et au moins 1 des suivants :

- a. Drainage purulent provenant de site affecté ;
- b. Microorganismes cultivés à partir de sang et qui sont compatible avec le site d'infection suspecté ;
- c. Argument radiologique d'infection ;
- d. Diagnostic d'une infection de rein, urètre, vessie, uretère ou tissus périphériques effectué par le médecin ;
- e. Thérapie pour une infection de rein, urètre, vessie, uretère ou tissus périphériques, établie par l'hôpital.

Infection systémique confirmée par le laboratoire :

Selon le CDC, le nouveau-né a **au moins un** des signes ou symptômes suivantes avec aucune autre cause connue : fièvre ($>38^{\circ}\text{C}$, rectale), hypothermie ($< 37^{\circ}\text{C}$, rectale), apnée, bradycardie.

Et signes et symptômes et résultats de laboratoire positifs qui ne sont pas reliés à une infection dans un autre site.

Et contaminants de la peau cultivés à partir de 2 ou plus hémocultures collectées dans un intervalle de 2 jours.

Sepsis clinique :

Le nouveau-né a **au moins un** des signes ou symptômes suivantes avec aucune autre cause connue : fièvre ($>38^{\circ}\text{C}$, rectale), hypothermie ($< 37^{\circ}\text{C}$, rectale), apnée, bradycardie.

Et aucune hémoculture faite ou pas de détection des microorganismes dans le sang.

Et aucune infection dans un autre site.

Et un traitement établi par le médecin.

Infection de système nerveux central :

Cela incluse l'abcès de cerveau et l'encéphalite.

Selon le CDC, le nouveau-né a **au moins 2** des signes ou symptômes suivantes avec aucune autre cause connue : fièvre ($>38^{\circ}\text{C}$, rectale), hypothermie ($< 37^{\circ}\text{C}$, rectale), apnée, bradycardie, signes neurologiques localisés ou changement dans le niveau de conscience.

Et au moins 1 des suivants :

- a. Microorganismes observés par examen microscopique dans un abcès ou tissu du cerveau obtenu par biopsie durant une opération chirurgicale ou autopsie ;
- b. Test d'antigène positif effectué à partir d'un échantillon du sang ou d'urine ;
- c. Argument radiologique d'infection ;
- d. Mise en évidence des anticorps IgM ou IgG.

Et si le diagnostic est positif, l'hôpital établie une antibiothérapie.

Méningite :

Selon le CDC, le nouveau-né a **au moins 1** des signes ou symptômes suivantes avec aucune autre cause connue : fièvre ($>38^{\circ}\text{C}$, rectale), hypothermie ($< 37^{\circ}\text{C}$, rectale), apnée, bradycardie, cou rigide, signes méningés ou irritabilité.

Et au moins 1 des suivants :

Annexes

- a. Examen de liquide céphalo-rachidien (LCR) positif avec augmentation de nombre des leucocytes, concentration des protéines élevée et/ou taux de glucose diminué ;
- b. Présence des bactéries à Gram positif ou négatif ;
- c. Culture des microorganismes à partir de LCR ;
- d. Test positif d'antigène de LCR ou d'urine ;
- e. Mise en évidence des anticorps IgG et IgM.

Et si le diagnostic est positif, l'hôpital établie une antibiothérapie.

Annexes

Annexe 3 : Tableau de situations de détermination ou non des marqueurs biologiques

(Rodière et Zebiche, 2002)

Déterminer	<ul style="list-style-type: none">- Suspicion d'infection bactérienne sans foyer identifié- Fièvre en raison de la prédominance des formes évolutives d'infection bactérienne : IMF et méningite- Devant une fièvre chez un sujet suspect d'IU avec positivité des tests de dépistage urinaire rapide (TDUR) en raison de la nécessité de confirmer l'IU- Fièvre sous antibiothérapie ou dans un contexte clinique de sepsis dont l'origine bactérienne est probable
Ne pas Déterminer	<ul style="list-style-type: none">- Devant une fièvre bien tolérée avec ou sans traitement symptomatique- Devant une fièvre d'installation récente (moins de 8 heures)- Devant une fièvre avec une infection localisée, sans signe apparent de gravité ou de complications- Dans les situations cliniques où les MBI ont prouvé qu'ils étaient peu performants

Annexe 4 : Tableau des caractéristiques de la PCT chez le nouveau-né

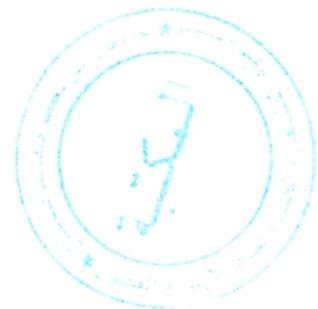
(Gendrel, 2004)

Objectifs	<ul style="list-style-type: none"> - Différencier les infections bactériennes des infections virales - Déterminer la sévérité d'une infection bactérienne - Prédire les lésions - Aide à interrompre des traitements antibiotiques inutiles - Ajoute une information et aide à prendre une décision
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Grande sensibilité et grande spécificité
Utilisations	<ul style="list-style-type: none"> - En cas d'infection virale, sans surinfection bactérienne, la PCT est toujours basse (< 1 ng/ml ou < 0,5 ng/ml) - Dans les cas d'infection grave, septicémie ou bactériémie, la PCT est toujours élevée. Son élévation est un bon signe d'invasivité - PCT >10 ou 20 ng/ml est toujours associée à un syndrome infectieux sévère qu'il est urgent de traiter - PCT >1 ou 2 ng/ml est un facteur de gravité d'une infection urinaire, plus la PCT est élevée plus les cicatrices rénales sont importantes - Baisse rapide de PCT après l'introduction d'un antibiotique indique l'efficacité de traitement

Annexes

Annexe 6 : Procédés diagnostiques (Kayser et al., 2008)

Mise en évidence de la bactérie	<ul style="list-style-type: none">➤ Techniques classiques<ul style="list-style-type: none">• Microscopie• Culture• Identification<ul style="list-style-type: none">✓ Morphologie✓ Métabolisme✓ Antigène➤ Techniques de biologie moléculaire
Mise en évidence d'un constituant ou d'une production de la bactérie	<ul style="list-style-type: none">➤ Séquence spécifique du génome bactérien➤ Antigène➤ Toxine
Mise en évidence d'une réaction immunologique spécifique contre la bactérie	<ul style="list-style-type: none">➤ Anticorps➤ Réaction de fixation de complément



Annexe 7 : Recommandations pour limiter l'émergence des bactéries résistantes

L'HAS (Haute Autorité de Santé) a établie des règles d'utilisation d'antibiotiques permettent de limiter l'émergence des bactéries résistantes.

1. Recommandations concernant l'antibiothérapie curative :

- a. Limiter l'antibiothérapie aux infections dont l'origine bactérienne est documentée ou probable ;
- b. Eviter le sous-dosage qui est une des causes d'échec et le surdosage à l'origine de pathologies iatrogènes ;
- c. Dans les infections sévères, débiter le traitement le plus rapidement possible après l'hypothèse diagnostique et les prélèvements microbiologiques ;
- d. Respecter la durée de l'antibiothérapie car l'antibiothérapie prolongée résulte des résistances bactériennes augmentées et une toxicité accrue.

2. Recommandations relatives aux associations d'antibiotiques :

Les prescriptions d'associations doivent être strictement limitées à des situations qui nécessitent l'élargissement de spectre d'activité (infections sévères et microbiologiquement non documentées, infections à *P. aeruginosa*) car ils peuvent contribuer à augmenter la pression de sélection sur la flore commensale.

Annexe 8 : Matériel utilisé

1) Matériel :

- Ecouvillons
- Tubes à essai
- Boîtes de Pétri
- Anse de platine
- Pipettes Pasteur
- Pipettes graduées
- Seringues
- Lames
- Tubes à hémolyse
- Colorimètre
- Vortex

2) Produits :

2.1. Milieux de culture :

2.1.1. Milieux liquides :

- Bouillon cœur-cerveille ou bouillon BHIB ;
- Bouillon nutritif.

2.1.2. Milieux solides :

- Mac Conkey ;
- Muller Hinton ;
- Gélose nutritive ;

2.2. Autres produits :

- Eau distillée ;
- Eau physiologique
- Violet de gentiane ;
- Lugol ;
- Fuchsine.

2.3. Réactifs :

- Kovacs
- Voges Proskauer I
- Voges Proskauer II

- Nitrate réductase I
- Nitrate réductase II

2.4. Antibiotiques :

Tableau 10 : Liste des antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme

Famille d'antibiotiques	Antibiotiques	Signes	Charge du disque (μg)
Fluoroquinolones	Oflaxacine	OFX	5
Aminosides	Gentamycine	CN	10
Céphalosporines	Cefoxitine	FOX	30

Annexes

Annexe 9 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-β-D-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incoloré	jaune (1)
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
CIT	sodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
H ₂ S	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incoloré / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orange (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	TDA / immédiat	
				jaune	marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	JAMES / immédiat	
				incoloré vert pâle / jaune	rose
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétolne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				incoloré / rose pâle	rose / rouge (5)
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOSitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAmnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARAbinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune

Annexes

Annexe 10 :

Tableau 1 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition pour les *Enterbacteriaceae*

Antibiotiques testés	Charge de disque (μg)	Diamètres critiques (mm)		
		S	I	R
Ofloxacin	5	≥ 16	13-15	≤ 12
Gentamycine	10	≥ 15	13-14	≤ 12
Cefoxitine	30	≥ 18	15-17	≤ 14

Tableau 1 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition pour *P. aeruginosa*

Antibiotiques testés	Charge de disque (μg)	Diamètres critiques (mm)		
		S	I	R
Ofloxacin	5	≥ 16	13-15	≤ 12
Gentamycine	10	≥ 15	13-14	≤ 12

ملخص

وجود البكتيريا سلبية الغرام قد يكون مسؤولا عن الاستعمار او حتى العدوى عند حديثي الولادة. الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على البكتيريا سلبية الغرام المسؤولة عن الاستعمار الخارجي لحديثي الولادة و تحديد مستوى مقاومتها للمضادات الحيوية. مجموع 18 سلالة من البكتيريا سلبية الغرام تم عزلها من ابط و انزع حديثي الولادة الموجودين على مستوى خنمة حديثي الولادة الامومة و الطفولة بتلمسان. اختبار حساسية سلالات البكتيريا للمضادات الحيوية تم وفقا لطريقة التحليل في وسط صلب API 20 التعرف على السلالات تم عن طريق و وفقا للمعايير المقترحة من قبل CLSI. اكثر السلالات المتعرف عليها كانت *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* و *Pseudomonas aeruginosa*. نسب مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية كانت : سيفوكسيبتين 87% ، جونتامسين 66,66% ، اوفلوكسامين 28%. الكلمات المفتاحية : البكتيريا سلبية الغرام ، استعمار ، حديثو الولادة ، مقاومة.

Résumé

La présence des bactéries à Gram négatif est responsable de la colonisation voire de l'infection chez les nouveaux nés.

L'objectif de notre étude prospective est d'identifier les bactéries à Gram négatif responsables de colonisation exogène des nouveau-nés et de déterminer leur niveau actuel de résistance aux antibiotiques.

Un total de 18 souches des bactéries à Gram négatif ont été collectées à partir des aisselles et des avant bras des nouveau-nés au service de néonatalogie E.H.S Mère et enfant de Tlemcen.

L'identification des souches a été réalisée par le système API 20 E. La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé, selon les normes du CLSI.

Les souches les plus rencontrées étaient *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les taux de résistance aux antibiotiques testés ont été : cefoxitine (87%), gentamycine (66,66%) et ofloxacine (28%).

Mots clés : Bactéries à Gram négatif ; colonisation ; néonatalogie ; résistance

Abstract

The presence of Gram-negative bacteria is responsible of colonization or infection in neonates.

The aim of this prospective study was to identify Gram-negative bacteria that are responsible of exogenous colonization of neonates and to evaluate their current level of resistance to antibiotics.

A total of 18 strains of Gram-negative bacteria were collected from axilla and forearms of neonates at the service of neonatology S.H.E mother and child of Tlemcen.

Strains identification was realized by the API 20 E system. Susceptibility test was measured by the agar dilution method according to CLSI standards.

The most identified strains were *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*.

The percentages of antibiotics resistance were : cefoxitin (87%), gentamycin (66,66%) and ofloxacin (28%).

Key words : Gram-negative bacteria ; colonization ; neonatology ; resistance

