



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma

Année Universitaire : 2014-2015

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'obtention du Master de biotechnologie microbienne

**Evaluation du risque de la transmission croisée des
bactéries entre les nouveau-nés et leur environnement dans
un service de néonatalogie et de réanimation néonatale**

Présenté par : Mlle Sahal Jihane

Encadré par : Pr. Bouchra Oumokhtar (FMP)
Pr. Abdelhakim El Ouali Lalami (ISPITSF)

Soutenu le : 26/06/2015

Devant le jury composé de :

Pr. Bouchra Oumokhtar (FMP)
Pr. Abdelhakim El Ouali Lalami (ISPITSF)
Pr. Abdellatif Haggoud (FSTF)
Pr. Mohammed Iraqui Houssaini (FSTF)
Pr. Abdelhak Bouharou (CHU FES)

Stage effectué au laboratoire de microbiologie au sein de la faculté de médecine et de
pharmacie Fès

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

☒ B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES

☎ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14

DÉDICACES

Je dédie ce travail

À MA TRÈS CHÈRE MÈRE,

C'est avec beaucoup de reconnaissance et d'affection
Mon travail est la preuve de ton soutien permanent depuis ma tendre enfance.
Qu'Allah te bénisse et t'accorde encore longue vie.
Que ce travail t'apporte un peu de réconfort et te comble de joie.

À MON PÈRE

Tu as toujours été mon exemple je ne saurais espérer plus.
Qu'Allah t'accueille dans Son Paradis éternel et te bénisse.

À MES SŒURS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon estime et mon amour pour vous.
Je vous souhaite une longue vie pleine de bonheur et de succès.
Qu'Allah vous protège.

À MA TANTE, MES ONCLES ET MES COUSINES ET À TOUS MES PROCHES

Merci pour votre soutien et affection.

À MES AMIES

Que nous restions unis par la grâce de DIEU.

MERCI

REMERCIEMENTS

*Je remercie Dieu le tout puissant qui m'a aidé
à faire ce travail.*

Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce projet.

*Je tiens à remercier, **Pr Bouchra Oumokhtar** responsable du laboratoire de microbiologie à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès pour avoir accepté d'encadrer mon travail, son soutien et son accueil si chaleureux tout au long de la période de stage, J'ai eu le privilège de bénéficier de son savoir et de sa grande expérience qui, alliés à ses qualités humaines resteront pour moi un modèle.*

*Mes remerciements sont adressés au **Dr. A.ELOUALI LALAMI** responsable du laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu de la ville de Fès, je lui exprime toute ma gratitude pour le temps qu'il m'a consacré malgré ses obligations et ses responsabilités Je le remercie également de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de bien vouloir encadrer ce modeste travail. Merci pour votre aide et votre disponibilité.*

*Je remercie de tout mon cœur mon Co-encadrante **Dr. Arhoune Btissam** pour son aide tout au long de ma période de stage, son soutien et ses remarques qui m'ont beaucoup aidé à améliorer la rédaction de ce mémoire, qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance.*

*J'adresse aussi mes vifs remerciements au **Pr. Abdellatif Haggoud**, Professeur de l'enseignement supérieur à la faculté des sciences et techniques de Fès et le responsable du Master Biotechnologie Microbienne, pour les efforts considérables qu'il n'a cessé de déployer pour la réussite de cette formation, et de bien vouloir juger ce modeste travail.*

*J'aimerais aussi exprimer ma gratitude et mes remerciements au **Pr. Mohammed IRAQUI HOUSSAINI**, Professeur de l'enseignement supérieur à la faculté des sciences et techniques de Fès, d'avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire.*

*Mes sincères remerciements s'adressent au **Dr. Abdelhak BOUHARROU** responsable du service de néonatalogie au CHU HASSAN II FES d'avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire malgré ses obligations et ses responsabilités.*

Mes respectueux remerciements aux étudiants du Laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès pour leur aide et leur sympathie.

LISTES DES FIGURES

Figure 1: Schéma des infections d'origine endogène (P 4)

Figure 2: Schéma de la Transmission de l'infection hospitalière (P 6)

Figure 3: Adhésion d'une bactérie à un support inerte et formation d'un biofilm (P 13)

Figure 4: Photo illustrant la méthode d'écouvillonnage (P 21)

Figure 5: *E .coli* productrice de bêta-lactamase dont AMC présente une synergie avec CAZ, CTX, KF (Test de synergie positif) (P 27)

Figure 6: Pourcentage de résistance des entérobactéries vis-à-vis des différents antibiotiques testés (P 36)

Figure 7 : Fréquence des bactéries isolées au niveau de point de prélèvements positifs (P 37)

Figure 8 : Répartition des gènes *bla* chez les EBLSE isolées au niveau des prélèvements rectaux réalisés chez les nouveau-nés (P 37)

Figure 9 : Répartition des gènes *bla* chez les EBLSE isolées au niveau de l'environnement proche des patients (P 38)

Figure 10: Image de l'électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits d'amplification de la PCR des 5 gènes *bla*_{CTXM1,SHV,TEM,CTXM2,CTXM9} (P 38- 39).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Antibiotiques testés pour l'antibiogramme des *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (P 28)

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisés lors de la réalisation de la PCR (P 29)

Tableau 3 : Conditions d'amplification pour chaque gène (P 29)

Tableau 4 : Souches témoins utilisées (P 30)

Tableau 5: Fréquence des bactéries isolées à partir du nouveau-né (P 33)

Tableau 6 : Fréquence des bactéries résistantes à un antibiotique au moins (P 34)

Tableau 7: Fréquence des bactéries isolées à partir des surfaces (P 35)

Tableau 8: Fréquence de résistance des bactéries isolées à partir des surfaces (P 35)

Tableau 9 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission du patient 1 et au niveau de son environnement proche (P 40)

Tableau 10: Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 2 et au niveau de son environnement proche (P 41)

Tableau 11: Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 3 et au niveau de son environnement proche (P 42)

Tableau 12 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission du patient 4 et au niveau de son environnement proche (P 43)

Tableau 13 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission du patient 5 et au niveau de son environnement proche (P 43)

Tableau 14 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission du patient 6 et au niveau de son environnement proche (P 43)

Tableau 15 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 7 et au niveau de son environnement proche (P 44)

Tableau 16 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 8 et de son environnement proche (P 44)

Tableau 17 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 9 et de son environnement proche (P 45)

Tableau 18 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 10 au niveau de son environnement proche (P 46)

Tableau 19 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 11 et au niveau de son environnement proche (P 47)

Tableau 20 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 12 et au niveau de son environnement proche (P 48)

Tableau 21 : Comparaison entre les géotypes des bactéries isolées des patients et ceux des bactéries isolées de l'environnement proche à la sortie (P 49)

Tableau 22 : Comparaison entre les géotypes des bactéries isolées des patients et ceux des bactéries isolées de l'environnement proche à la sortie (P 50)

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **AAF** : Aérobie anaérobie facultatif
- **ABR** : *Acinetobacter baumannii* multirésistante
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **AS** : Aérobie stricte
- **ATB** : Antibiotique
- **BBT** : Bleu de bromothymol
- **BGN** : Bacille gram négatif
- **BLSE** : Bêtalactamases à spectre étendu
- **BMR** : Bactérie multi résistante
- **CD** : *Clostridium difficile*
- **E.COLI** : *Escherichia coli*
- **EBLSE** : Entérobactérie productrice de bêta-lactamase à spectre étendu
- **EMB** : Eosine Bleu de Méthylène
- **IN** : Infection nosocomiale
- **INN** : Infection nosocomiale néonatale
- **Kp** : *Klebsiella pneumoniae*
- **MO** : Microorganisme
- **NN** : Nouveau-nés
- **OMS** : Organisation mondiale de la santé
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **SARM** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
- **SCN** : Staphylocoque coagulase négatif
- **TBE** : Tris, Borate, EDTA.

SOMMAIRE

Introduction	1
Etude bibliographique	3
I. Infection nosocomiale	3
I-1. Définition.....	3
I-2. Facteurs favorisants	3
I-3. Cause des infections nosocomiales.....	3
I-4. Infections nosocomiales néonatales.....	6
II. L'environnement, réservoir potentiel de microorganismes impliqués dans les infections nosocomiales	9
III. Contamination des surfaces	11
III-1. Qualité du bionettoyage	11
III-2. Qualité de l'air	11
III-3. Durée de vie du MO (type pathogène ou opportuniste) sur un support inerte.....	12
III-4. Capacité du Microorganisme à adhérer à la surface et produire un biofilm	12
IV. Transmission croisée	13
VI -1. Réservoirs	13
VI-2 Bactéries multi-résistantes	14
VI-3. Prévention	14
V. Les infections nosocomiales dues aux bactéries multirésistantes	15
V-1. Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases EBLSE.....	16
V-2. Résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
V-3. <i>Acinetobacter baumannii</i> multirésistant (résistant à la ticarcilline).....	16
V-4. <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline.....	16
Matériel et méthodes :	20
I. Lieu et période de l'étude.....	20
II. Prélèvements.....	20
III. Technique par écouvillonnage.....	21
IV. Ensemencement sur des milieux spécifiques.....	21
V. Conservation des souches isolées	22
VI. Tests d'identification biochimique	22
VII. Antibiogramme	26
VIII. La Recherche de la bêta-lactamase à spectre élargi	27
IX. Détection des gènes de résistance par PCR (Polymerase Chain Reaction)	28
X. Statistique khi deux	31

Résultats	32
I. Caractéristiques des nouveau-nés étudiés	33
II. Fréquence des bactéries isolées à partir du nouveau-né	33
III. Fréquence et profil de résistance des bactéries isolées chez les NN	33
IV. Fréquence des bactéries isolées à partir de l'environnement proche du patient	34
V. Fréquence et profil de résistance des bactéries isolées à partir des surfaces	35
VI. Répartition des bactéries en fonctions des points de prélèvements.....	36
VII. Résultat de la recherche de gènes de résistance retrouvés chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases isolées à partir des prélèvements réalisés sur les patients	37
VIII. Résultat de la recherche de gènes de résistance retrouvés chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases isolées à partir de l'environnement proche des patients...	38
IX. Comparaison entre le profil de résistances des bactéries de chaque nouveau-né avec celles de son environnement	40
Discussion	52
Conclusion.....	56
Références bibliographiques	57

INTRODUCTION

L'environnement hospitalier (eau, air, surfaces, matériel) peut jouer le rôle de réservoir de bactéries multirésistantes BMR. Ces agents pathogènes sont souvent résistants à la première ligne d'antibiothérapie et ils sont difficiles à traiter en raison de leur résistance naturelle ou acquise à plusieurs classes d'antibiotiques.

Bien que la principale source d'agents pathogènes nosocomiaux est constituée de la flore endogène du patient, on estime que 20% à 40% des infections associées aux soins ont été attribués à l'infection par les mains du personnel, qui ont été contaminés par contact direct avec le patient ou indirectement par les surfaces contaminées. Plusieurs études suggèrent que la contamination de l'environnement joue un rôle important dans la transmission de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (Ahoyo et *al.*, 2006). Plus récemment, d'autres études suggèrent que la contamination de l'environnement joue également un rôle dans la transmission nosocomiale des bacilles gram négatif sécrétrice de bêta lactamases a spectre élargi (EBLSE) et *Acinetobacter* spp. Multirésistant (Ahoyo et *al.*, 2007) En effet, les SARM et EBLSE sont les BMR les plus impliquées à cause de leur potentiel pathogène élevé, de leur caractère commensal favorisant leur diffusion et leur dissémination. Tous ces agents pathogènes survivent pendant de longues périodes dans l'environnement, et les infections ont été associées à la contamination fréquente des surfaces dans les hôpitaux. Dans certains cas, la mesure de transmission de patient à patient a été trouvé comme étant directement proportionnel au niveau de contamination de l'environnement. Cela a conduit à une focalisation accrue sur l'importance du nettoyage et de la désinfection des surfaces de l'hôpital et de l'équipement médical et les efforts pour évaluer et améliorer l'efficacité de ces pratiques.

En néonatalogie, le risque d'infection nosocomiale à BMR est plus important du fait de l'incompétence immunitaire et de la prématurité des nouveau-nés. Le nouveau-né doit alors être protégé et faire l'objet de soins spécifiques, il est placé en couveuse, pour éviter tout contact avec les agents infectieux. Le personnel soignant et les parents doivent prendre des précautions particulières pour éviter de transmettre des germes au bébé telque: port d'un masque, hygiène des mains, blouse, chaussons, charlotte...etc.

L'amélioration de nettoyage / désinfection des surfaces de l'environnement et l'application des mesures d'hygiène des mains ont été confirmées pour réduire la transmission des BMR. En plus, la maîtrise de la dissémination des agents pathogènes par des programmes

de lutte contre les BMR, contribue certainement à la prévention de l'infection nosocomiale liée à l'environnement.

Ce travail a été réalisé dans un service de néonatalogie et de réanimation néonatale du CHU Hassan II de Fès. L'objectif de notre étude a été de comparer la flore du nouveau-né avec la flore de son environnement immédiat. Ceci dans le but d'établir une éventuelle transmission croisée entre le nouveau-né et son environnement proche.

Pour s'y faire, nous avons procédé à :

- Etude du portage intestinale chez les nouveau-nés au 1^{er} jour d'hospitalisation et à la sortie du service.
- Etude microbiologique des surfaces de l'environnement immédiat de chaque nouveau-né et ce à l'admission du patient et à la sortie du service.
- Etude du profil de résistance aux antibiotiques de toutes les bactéries identifiées.
- La recherche génotypique des différents gènes de résistance des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi.
- Comparaison des bactéries isolées en portage chez les nouveau-nés avec celles isolées à partir leurs environnements, ainsi que leurs déterminants phénotypiques et génotypiques de la résistance aux antibiotiques.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Infection nosocomiale

I-1. Définition

Les infections nosocomiales (IN) constituent un problème majeur de santé publique, elles induisent une morbidité, une mortalité importante et des coûts importants (Guibert et *al.*, 1999). L'infection est dite nosocomiale si elle survient après 48 heures d'hospitalisation et qui était absente au moment de l'admission (SMS., 2005). Pour les infections de la plaie opératoire, on qualifie d'infections nosocomiales celles survenues dans les 30 jours suivant l'intervention. Une infection nosocomiale peut également survenir après une année suite à l'introduction d'un implant ou d'une prothèse chez un patient.

I-2. Facteurs favorisants

Les patients les plus vulnérables aux infections nosocomiales sont :

- Les personnes âgées, les nouveaux -nés qui sont prématurés, les personnes présentant une pathologie chronique ou bien un polytraumatisme, et ceux qui ont reçus un acte invasif (la mise en place par exemple d'une sonde urinaire, cathéter..).
- Les personnes ayant reçu certains traitements (antibiotiques qui entraînent un déséquilibre de leur flore) (SMS., 2005).

I-3. Cause des infections nosocomiales

Pour développer une infection nosocomiale, trois éléments sont réunis :

- Un agent infectieux ;
- Un mode de transmission ;
- Un sujet réceptif.

I-3-1. Agents infectieux

Les agents infectieux regroupent :

A- Flore du malade (la flore saprophyte modifiée)

La flore saprophyte représente la flore qui se trouve naturellement sur le corps humain notamment au niveau de la peau, du tube digestif ..., Au cours d'hospitalisation, cette flore va subir certaines modifications.

B- Flore du personnel soignant

Les instruments ou les mains souillées du personnel soignant représentent un réservoir important des germes qui seront par la suite transmis d'un patient à l'autre.

C- Germes de l'environnement

Ces germes se trouvent naturellement sur les sols, dans l'air ambiant, la nourriture, le linge, dans certains appareillages, les instruments (stéthoscope, tensiomètre, ciseaux ...), les lavabos et qui peuvent constituer un réservoir.

I-3- 2. Modes de transmission

Il existe quatre grands modes de transmission :

A- Auto-infection

Dans ce cas d'infection le malade peut soit s'infecter avec ses propres germes (in situ) : sont ceux qui se trouvent naturellement sur la peau, le tube digestif, et les muqueuses. A la faveur d'un acte invasif (porte d'entrée) et / ou une raison d'une fragilité particulière. Soit à partir de l'endroit (environnement) où la propagation des germes s'effectue.

Parfois le médecin facilite l'auto –infection en administrant un médicament sélectionnant certaines bactéries ou levures (antibiotique) ou en diminuant la résistance du patient (Immunosuppresseur).

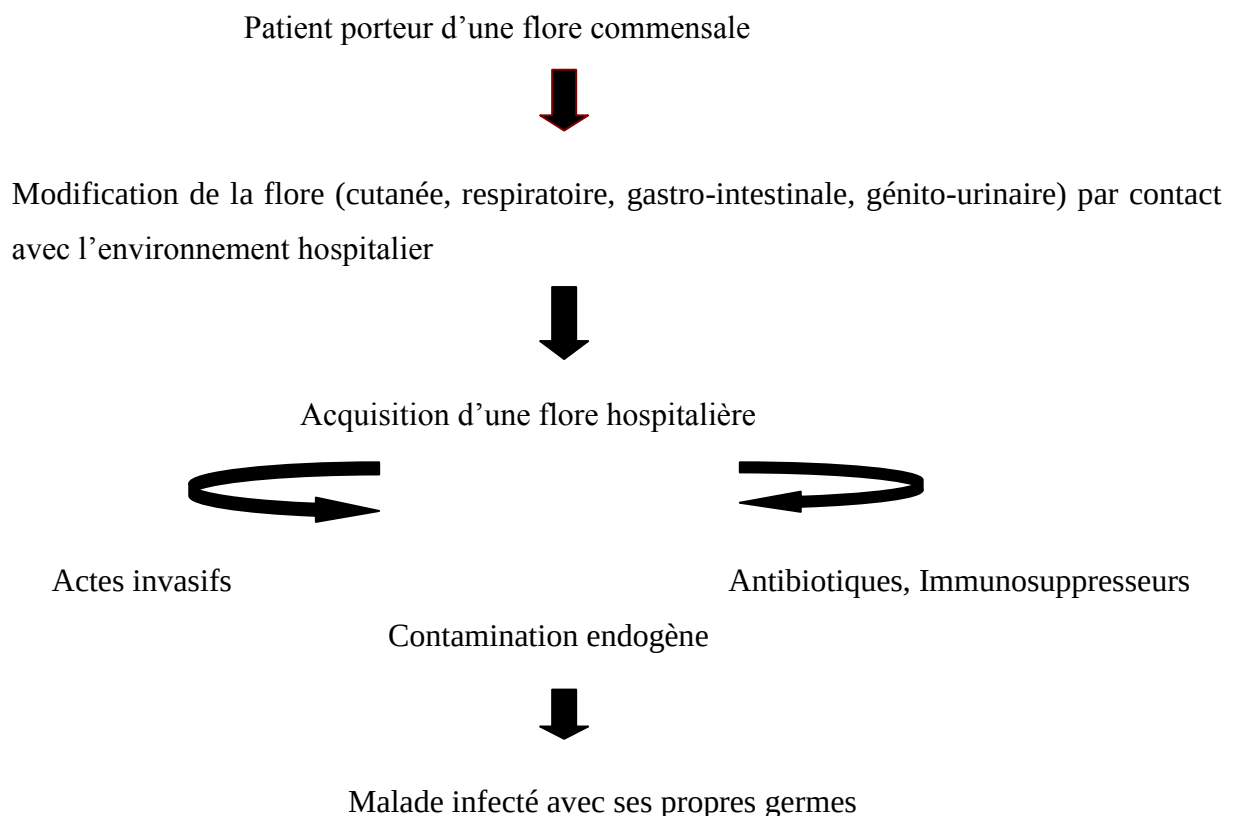


Figure 1 : Schéma des infections d'origine endogène.

B- Hétéro – infection

C'est le mode de contamination observé lors de nombreuses épidémies, l'agent infectieux dans ce cas peut être transmis chez un autre malade et provoquer une infection dite croisée ou hétéro infection.

Le personnel, ses mains et ses instruments de travail sont les plus souvent les facteurs responsables de ce type d'infection. Cette dernière représente alors une infection manuportée ou d'infection transmise par le matériel de soins.

C- Xéno infection

C'est le cas où les agents pathogènes sont importés par des personnes (personnel, malades, visiteurs ...) venant de l'extérieur, par contact direct ou indirect ou bien par voie aérienne et ayant une pathologie infectieuse, déclarée ou en cours d'incubation, touchant des victimes particulièrement réceptives et présentant des conditions de transmission facilitées.

D- Exo infection

Ce mode d'infection correspond à la contamination par des germes en principe exclus du contact avec le malade, importés dans la biocénose hospitalière. Le plus souvent à cause des erreurs ou des avaries techniques : un dysfonctionnement technique d'un matériel (filtre à air fracturé, stérilisation inefficace, eau polluée ...) destiné à la protection des patients, soit à une erreur commise dans l'exécution des procédures de traitement du matériel médicochirurgical.

I-3-3- Réceptivité du sujet

Les malades à risque sont : les immunodéprimés, les brûlés, les diabétiques, les grabataires avec des escarres étendues, ainsi que les patients portant des actes invasifs tels que (assistance respiratoire, sonde urinaire, cathéters divers), les nouveau-nés surtout les prématurés présentant des défenses immunitaires affaiblies et donc seront beaucoup plus exposés aux infections nosocomiales.

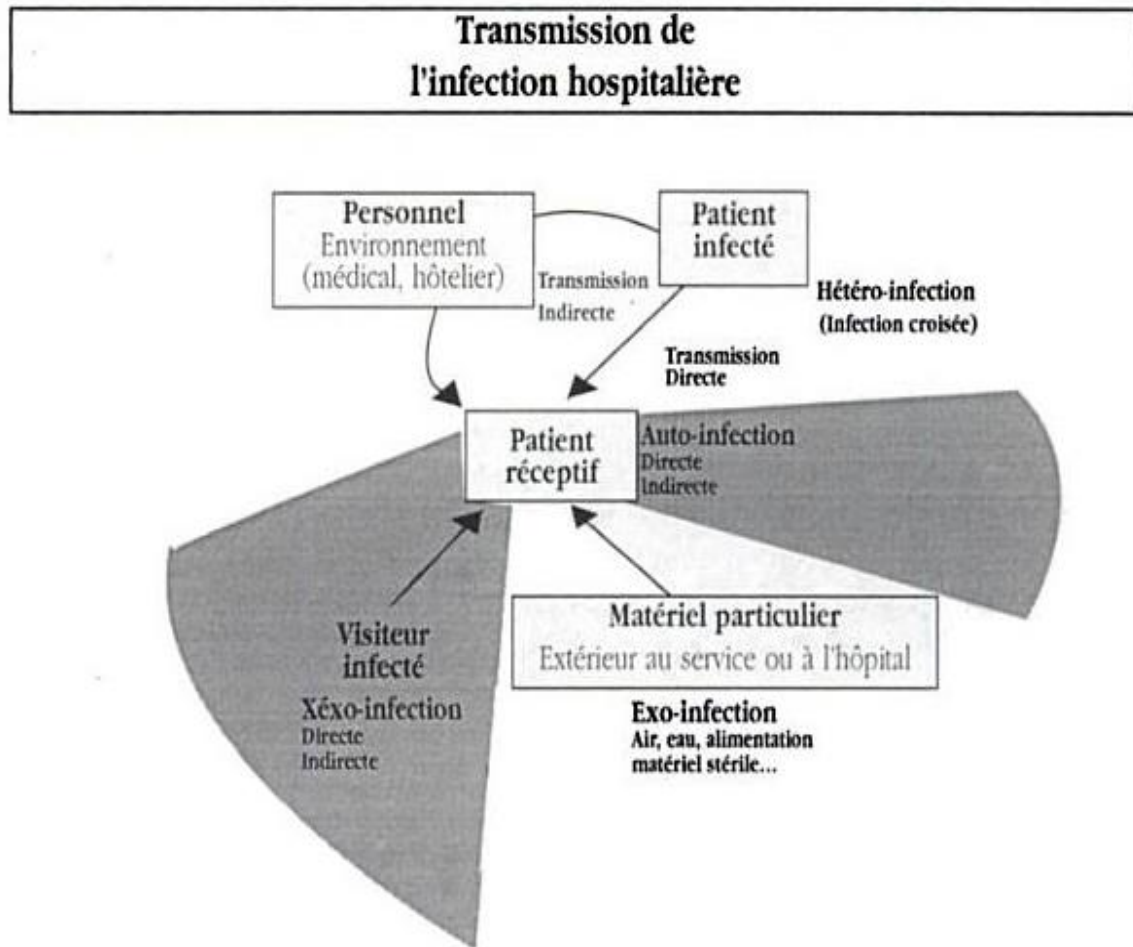


Figure 2 : Schéma de la Transmission de l'infection hospitalière (Clermont –Ferrand ,1994).

I-4. Infections nosocomiales néonatales

En raison de l'augmentation de taux de mortalité et de morbidité, les IN ont toujours occupé une place importante dans le service de néonatalogie (Ahoyo et *al.*, 2006) chez des nouveau-nés âgés de plus de 2 jours, souvent hospitalisé en unité de soins intensifs ou dans une maternité (Guibert et *al.*, 1999). La survenue de ces infections est due essentiellement à la pénétration et le développement d'un microorganisme nocif ou à la pullulation d'une bactérie commensale, touchant le nouveau-né avant, pendant ou après la naissance.

I-4-1. Epidémiologie

Le nouveau-né est le plus vulnérable de la société. Malgré la mise en place des interventions et des améliorations toujours plus nombreuses ainsi que l'aide que le personnel confère pour eux, il y a toujours une augmentation de l'incidence des infections nosocomiales néonatales (Habzi et *al.*, 2001) et plus particulièrement en Afrique ce qui représente un problème de santé de plus en plus inquiétant.

Selon une étude réalisée en 2005 par l'OMS : 4 millions de nouveau-nés décèdent dans les quatre premières semaines de vie parmi 130 millions de naissances chaque année, à cause des infections nosocomiales bactériennes, parmi ces 4 millions de décès 99% se trouvent dans les pays en voie de développement contre 1% dans les pays développés (Labie, 2005).

En fait l'étiologie ainsi que l'incidence des infections nosocomiales néonatales varie d'un continent à un autre.

Au Maroc l'incidence des infections nosocomiales néonatales était estimé à 21,9 % (25,3 pour 1000 jours d'hospitalisation) en réanimation mixte néonatale et pédiatrique, aux états unis l'incidence était de 5,7 % chez les enfants en réanimation pédiatrique alors que l'incidence était de 8,2 % en France dans les unités de réanimation mixtes néonatales et pédiatriques (Ben Jaballah et *al.*, 2006).

En réanimation néonatale, une étude réalisée dans plusieurs centres en Colombie, a révélé une incidence des infections nosocomiales de 6,5 % (Efird et *al.*, 2005).

Au Cameroun, une étude a été réalisée en 2007 a montré une incidence des INN de 34,71%

Selon une étude de prévalence récente réalisée en unité de soins intensifs, les septicémies ont présenté 52,6% des infections, 12,9 et 8,6 % d'infections respiratoires hautes ou basses alors que les infections urinaires ont représenté 8,6 % d'infections urinaires (Lachassinne et *al.*, 2004).

Le statut immunitaire affaibli du nouveau-né, l'existence d'une prothèse et le recours à des procédures invasives les premiers jours de sa vie entraîne une augmentation de l'incidence des INN, en effet, il a été démontré dans une étude que le taux observé en réanimation néonatale est de 1% pour un taux moyen de 6 % dans le même hôpital pédiatrique (Aujard et *al.*, 1995).

I-4-3. Facteurs de risque

A sa naissance, le tube digestif du nouveau-né est stérile et sera très rapidement colonisé par des germes (par plus de 10^{10} germes en moins de 10 jours) provenant de sa mère ou par l'environnement notamment par les contacts manuels directs (Aujard et *al.*, 1995).

Sa flore à la fois digestive (bifidobactéries, entérobactéries et des entérocoques) et cutanée (constituée par du Staphylocoque à coagulase négatif) et rhinopharyngée (représentée par le Streptocoque alpha hémolytique) va être rapidement formée au bout de quelques jours.

La réunion de plusieurs facteurs va provoquer la perturbation de cette flore « normale » ce qui favorise l'augmentation des infections néonatales acquises principalement nosocomiales.

Parmi ces principaux facteurs on distingue :

A- Usage inapproprié de traitements des antibiotiques

La flore normale du nouveau-né, peut être perturber et déséquilibrer, à cause de l'utilisation des ATB. Il a été démontré que les bactéries présentent une résistance fréquente aux ATB conventionnels comme le céfotaxime, la ceftriaxone, la gentamicine et la nétilmicine ce qui explique la gravité des INN (Nejjari et *al.*, 2000).

B- Statut immunitaire des patients

Plus l'enfant est immature, plus le risque d'infection nosocomiale est grand. C'est pour cela qu'on observe une fréquence élevée de ces infections pendant cette période de vie qui s'explique par le fait qu'à cette période le système immunitaire est immature et par conséquent déficitaire.

C- Augmentation de la durée de séjour

L'augmentation de la durée de séjour, entraîne une colonisation par des bactéries pathogènes opportunistes qui se trouvent au niveau du milieu hospitalier.

Plus l'hospitalisation sera longue plus le risque de la survenue d'une bactériémie nosocomiale sera multiplier (10,9 % des bactériémies surviennent après deux semaines d'hospitalisation alors que 50 % surviennent après un mois) (Gayvallet et *al.*, 2002).

D- Utilisation de procédures invasives

Les incubateurs en créant un environnement chaud ou humide, l'utilisation des matériels tels que les cathéters, sonde urinaire et les interventions chirurgicales représentent des procédures invasives qui provoquent la prolifération des microorganismes suivie d'une invasion bactérienne.

E- Environnement : local et personnel

Le risque de contamination est dominé par le non respect des règles d'hygiène de base, plus particulièrement le lavage des mains. Les antiseptiques contaminés, le matériel de réanimation en salle de travail, l'eau du robinet et les incubateurs ainsi que le personnel, peuvent représenter des facteurs de risque des infections nosocomiales néonatales.

Une inadéquation entre la surcharge du travail et le nombre d'effectif du personnel, la formation insuffisante du personnel soignant et l'absence de procédure de sensibilisation aux infections nosocomiales constituent des facteurs contribuant à la survenue du risque nosocomial.

II. Environnement, réservoir potentiel de microorganismes impliqués dans les infections nosocomiales

L'environnement hospitalier est représenté par les surfaces, l'eau, l'air, le linge, les aliments, les dispositifs médicaux et les déchets. En effet sa surveillance microbiologique représente une des étapes essentielles permettant le contrôle des infections nosocomiales.

Cet environnement peut constituer un réservoir potentiel de microorganismes, notamment des bactéries multirésistantes aux antibiotiques (Rutala et *al.*, 1997).

La contamination de l'environnement hospitalier est diffuse et sa maîtrise, qui nécessite des techniques contraignantes, complexes et coûteuses, n'est que partielle et éphémère et elle varie qualitativement et quantitativement au niveau du même service ou bien d'un service à l'autre en fonction des techniques médicales utilisés d'une part et les patients d'autre part.

Les agents infectieux responsables des IN au niveau des hôpitaux sont plus fréquemment bactériennes, et plus occasionnellement virales, fongiques ou parasitaires.

➤ Entérobactéries

Les entérobactéries et les bactéries à Gram négatif occupent une place importante en pathologie humaine infectieuse et surtout en milieu hospitalier car elles causent des maladies sévères à cause de mécanismes pathogéniques distincts.

A. *E. coli*

Escherichia coli peut coloniser les voies respiratoires supérieures et être par conséquence à l'origine d'infections pulmonaires, elle peut coloniser aussi l'appareil génitale ce qui va causer de méningites néonatales lors du passage du nouveau-né par cette appareil, ou suite à l'infection du liquide amniotique consécutive à une rupture prolongée des membranes.

B. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, constitue un agent important dans l'hospitalisme infectieux (Farah et *al.*, 2007). Elle peut provoquer des infections urinaires et des surinfections des bronches chez les bronchitiques chroniques. Elle a été retrouvée chez des patients hospitalisés dans des unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques (Carrer et *al.*, 2011) aussi bien dans les services de néonatalogie (Quinet et *al.*, 2010)

Staphylococcus aureus

Les infections staphylococciques apparaissent sous des aspects cliniques très variés, elles sont très élevées et fréquentes aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire et constitue un problème majeur de santé publique en raison de la virulence de ces bactéries ainsi que de leur résistance aux antibiotiques.

Staphylocoques coagulase négatif

La majorité des SCN peuvent être à l'origine des infections cutanées, bactériémies, endocardites, infections sur cathéter, infections ostéo-articulaire. *S. epidermidis* est l'espèce la plus fréquemment isolée en milieu hospitalier, elle est également responsable de septicémies notamment dans les services d'oncologie et de néonatalogie.

Pseudomonas aeruginosa

Microorganisme responsable d'infections nosocomiales sévères allant jusqu'à 15 % dans les services de réanimation au sein des établissements de santé. Le portage endogène à l'admission des patients, l'acquisition des souches en cours d'hospitalisation à partir de l'environnement hydrique et la transmission croisée de patient à patient représentent les différents modes de transmission de cet agent (Bertranda et *al.*, 2011).

Acinetobacter baumannii

Appartenant au groupe des non fermentants, cet agent représente un agent commensal des muqueuses de l'homme et se caractérise par sa survie d'une manière prolongée dans l'environnement hospitalier (Lahsoun et *al.*, 2007).

Clostridium difficile

La contamination par CD se fait par la voie oro fécale; les mains des travailleurs de la santé peuvent être facilement contaminés par des contacts minimaux avec l'environnement du patient et par conséquence d'autres patients vont être infectés à cause de leur promiscuité (hospitalisation dans la même chambre qu'un patient infecté par CD) (Wilcox, 2003).

Virus

L'environnement hospitalier peut être contaminé par les virus, le plus souvent à partir du réservoir humain des malades et le personnel hospitalier.

Rotavirus : ce virus est responsable des diarrhées nosocomiales dans 50 % des cas. touchant bien spécifiquement les enfants malnutris et immunodéprimés en leur causant des gastroentérites aiguës (Gouyon et *al.*, 1989 ; Fournel et *al.*, 2010).

Virus respiratoire syncytial : virus oro fécale dont la transmission se fait par le biais des mains du personnel lors des contacts directs avec les malades infectés, par les gants, et les surfaces environnant du malade (Gouyon et *al.*, 1989 ; Fournel et *al.*, 2010).

Norovirus : La transmission de ce virus se fait par des aérosols en causant des diarrhées, vomissement, nausées, crampes abdominales, fièvre (Marks et *al.*, 2000 ; Cheesbrough et *al.*, 2000 ; Simmons et *al.*, 2001). D'autres virus peuvent conduire aux infections nosocomiales notamment les rhinovirus, coronavirus, adénovirus, entérovirus, virus de l'hépatite B qui est

souvent observé en période néonatale, virus Influenza (virus de la grippe), Cytomégalovirus, virus des fièvres hémorragiques (Ebola par exemple).

Champignons

Les champignons filamenteux environnementaux (*Aspergillus* spp) sont très bien adaptés à la survie et la multiplication dans l'environnement responsable d'aspergillose invasive chez l'immunodéprimé (Brun et *al.*, 2000).

Levures

Candida sp est le groupe de champignons commensale de l'homme, il est majoritaire au cours des infections fongiques nosocomiales en provoquant des candidoses dont la plus importante espèce est *Candida albicans* bien que *Candida glabrata* et *Candida parapsilosis* eux aussi représentent des agents impliqués dans les infections (Lachassinne et *al.*, 2004)

III. Contamination des surfaces

La contamination d'une surface donnée par des micro-organismes, leur multiplication, et donc la colonisation de cette surface sont les étapes préalables qui se réunissent pour déclencher une infection.

Cependant l'environnement proche d'un patient porteur de bactéries multirésistantes aux antibiotiques peut se retrouver à son tour contaminer et servir de réservoir secondaire (Durocher et *al.*, 2002).

La contamination des surfaces et donc la survenue d'une infection dépend de l'association de nombreux facteurs, outre que la présence du MO dans le réservoir environnemental. En plus de la virulence et la concentration de l'inoculum au niveau des surfaces et sa capacité à présenter une résistance aux conditions défavorables comme le cas par exemple au *Clostridium difficile*, on distingue autres facteurs notons :

III-1. Qualité du bionettoyage

Les MO s'ils trouvent les nutriments qui leur sont nécessaires ils peuvent survivre au niveau des surfaces d'une manière prolongée en absence d'un bionettoyage très efficace : une semaine pour *Staphylococcus aureus* (Barbut et *al.*, 2006).

III-2. Qualité de l'air

L'air a été régulièrement mis en cause lors d'infections, voire d'épidémies contractées à l'hôpital. Elle représente une des composantes de l'environnement hospitalier, contenant naturellement des particules inertes et des microorganismes pouvant être la source d'infections nosocomiales.

Ces MO peuvent être véhiculés par des poussières, les squames cutanées, les gouttelettes ou les microgouttelettes de salive, qui vont finir inévitablement par se déposer au niveau des surfaces, et plus les particules sont volumineux plus elles vont finir par se sédimenter rapidement, alors que les plus légères particules « droplets nuclei » flottant dans l'air vont véhiculer des agents infectieux, rester plusieurs heures, diffuser à distance et pénétrer par inhalation dans les alvéoles pulmonaires des patients. Donc les prélèvements des surfaces d'un local vont nous donner à part de la qualité du bionettoyage une idée sur l'efficacité ou les défaillances d'un système de traitement d'air (Durocher et *al.*, 2002 ; Barbut et *al.*, 2006).

Aucune étude et aucune recommandation ne propose de traitement spécifique de l'air en réanimation. Cependant dans le cas où la chambre va contenir des patients immunodéprimés il est nécessaire de réaliser une filtration de l'air afin de prévenir le risque aspergillaire (Durocher et *al.*, 2002).

III-3. Durée de vie du MO (type pathogène ou opportuniste) sur un support inerte

Certaines Entérobactéries comme *Serratia marcescens* ainsi que les Entérocoques ont la capacité de survivre plus d'une semaine (Wendt et *al.*, 1998).

Staphylococcus aureus et *Acinobacter baumannii* représentent des espèces présentant une certaine résistance à la dessiccation et peuvent survivre plusieurs semaines sur les surfaces sèches devant *Pseudomonas aeruginosa*.

Escherichia coli, entérobactérie la plus fréquente dans les infections nosocomiales est beaucoup moins résistante à la dessiccation (Wendt et *al.*, 1998).

Mycobacterium xenopi, microorganisme habituellement peu pathogène, et qu'au cours d'un acte invasif peut aboutir à une infection par le biais d'un matériel rincé avec une eau contaminée.

III-4. Capacité du Microorganisme à adhérer à la surface et produire un biofilm

L'adhésion et la multiplication des bactéries sur nombreux supports (matériels, équipement, surfaces, sols, eau, ...) représentent le facteur clé de la contamination microbiologique de l'environnement, tout cela contribue à la formation du biofilm qui constitue un réservoir important de MO, qui après sa fragmentation peut être véhiculé d'un point à un autre par l'intermédiaire de l'homme, les liquides, plus particulièrement l'eau, l'air sous forme d'aérosols constitués de poussières et de gouttelettes de liquides (Squinazi, 2006).

Lorsque les conditions environnementales sont favorables : la nature du germe, la température, le taux d'humidité, le type de surface il y aura la sécrétion des glycoprotéines

ceci va aboutir à la formation d'une pellicule au niveau des surfaces pour assurer une bonne adhésion, et conférer aussi une certaine résistance contre les détergents et les désinfectants grâce à la formation de cette couche qui est de nature glycoprotéique.

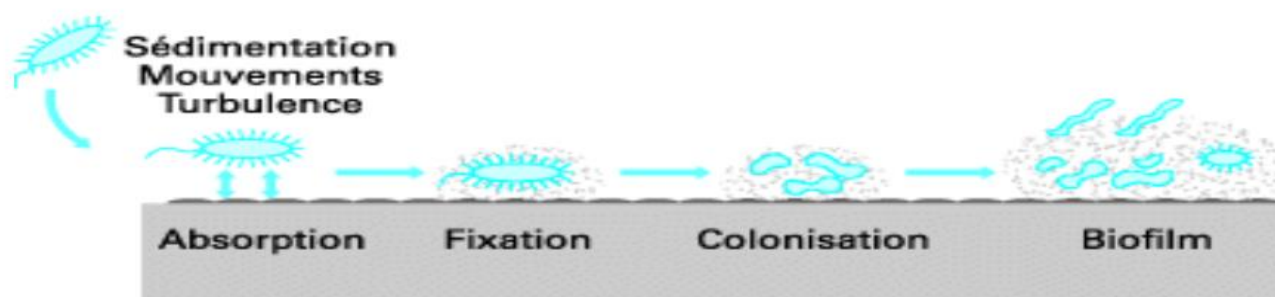


Figure 3 : Adhésion d'une bactérie à un support inerte et formation d'un biofilm.

IV. Transmission croisée

VI -1. Réservoirs

L'environnement peut être à la fois émetteur (de l'environnement au patient ou personnel soignant) ou récepteur (du patient ou personnel soignant à l'environnement). Il est ainsi admis qu'il existe un risque potentiel. Le risque réel d'acquérir une infection liée à la contamination de l'environnement est rarement démontrable car il est souvent difficile d'établir un lien épidémiologique entre l'agent infectieux de l'environnement et la survenue de l'infection. Des études dans les années 1970 et 1980 indiquent que la contamination de la surface de l'environnement a joué un rôle non négligeable dans la transmission endémique des infections nosocomiales. Bien que les objets contaminés et l'air peuvent être directement ou indirectement impliqués dans la voie de transmission. Cependant, les agents majeurs pathogènes nosocomiaux sont dispersés par les patients et contaminent les surfaces de l'hôpital à des concentrations suffisantes pour la transmission, de survivre pendant de longues périodes, persistent malgré les tentatives réalisées dans le but de les désinfecter ou de les supprimer (Jonathan et *al.*, 2011).

Un certain nombre d'études ont démontré que les professionnels de santé peuvent contaminer leurs mains ou leurs gants en touchant des surfaces contaminées de l'environnement hospitalier, et seront donc susceptibles d'entraîner la transmission bactérienne aux patients. Les agents pathogènes peuvent également être transférés directement des surfaces contaminées aux patients sensibles (John et *al.*, 2007). Les épidémies d'infections nosocomiales sont presque toujours associées à une transmission interhumaine, ou à la

contamination de dispositifs médicaux ou d'un liquide normalement stérile. La place de la transmission directe interhumaine est reconnue comme prépondérante par rapport à la transmission liée à l'environnement.

VI-2 Bactéries multi-résistantes

L'émergence et la propagation croissante des bactéries multirésistantes dans les hôpitaux est de grande préoccupation et continue à contester le contrôle de l'infection et de la pratique de l'épidémiologie de l'hôpital dans le monde entier. La fréquence des transmissions croisées varie entre 13 et 34,6 %, et est particulièrement élevé dans les unités de soins intensifs (Lemmen et *al.*, 2004). La contamination de l'environnement inanimé à l'hôpital par des agents pathogènes Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) ou les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE), en particulier dans une situation d'épidémie, a été souvent abordé (Lemmen et *al.*, 2004. John et *al.*, 2007) Cependant des directives d'isolement rigoureux ont été proposées pour prévenir la transmission croisée des bactéries multirésistantes , sans faire de distinction entre des organismes Gram positif et Gram- négatif (Lemmen et *al.*, 2004).

VI-3. Prévention

L'importance de l'hygiène des mains dans les hôpitaux, l'utilisation des gants qui doit être améliorée ainsi que la mise en place des produits hydroalcooliques devraient être un outil supplémentaire pour lutter efficacement contre la transmission croisée au niveau des services ou il ya une proximité entre les patients, le nombre de patients infectés et la fréquence des gestes invasifs font des services des hôpitaux un secteur particulièrement à risque. Il faut aussi veiller au respect strict des précautions standard, De plus, l'isolement des patients infectés par les bactéries multi résistants doit être maintenu (Lashéras et *al.*, 2006). La présence de micro-organismes dans l'environnement peut être réduite par des procédures de nettoyage des surfaces et des sols avec des produits détergents / désinfectants. Néanmoins les micro-organismes varient dans leur résistance aux désinfectants, les agents désinfectants doivent donc être choisis avec soin pour leur efficacité, en particulier pour les spores de *C. difficile*. En outre, le milieu hospitalier est complexe et souvent difficile à nettoyer, et l'utilisation d'un agent de nettoyage qui ne sont pas efficaces contre l'organisme cible peut entraîner la propagation des agents pathogènes sur d'autres surfaces (Barker et *al.*, 2004).

Des études préliminaires suggèrent que la technologie de bio-décontamination par vapeur de peroxyde d'hydrogène mérite une évaluation plus poussée comme une méthode pour la décontamination de l'environnement dans les établissements de santé (John et *al.*, 2007). Bien que l'antiseptique gluconate de chlorhexidine comme étant un biocide toléré par

les patients, selon des études celui-ci apparaît efficace dans la réduction de la propagation des agents nosocomiaux en réduisant la charge microbienne sur la peau des patient.

V. Infections nosocomiales dues aux bactéries multirésistantes

La lutte contre les bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR) s'intègre dans une politique globale de prévention des infections nosocomiales (IN) et repose, en particulier, sur le respect par le personnel de précautions d'hygiène. Ces précautions, regroupées sous le terme générique de précautions « standard », doivent être appliquées pour tous les patients. Elles visent à assurer une protection systématique des patients et du personnel vis à vis des risques infectieux liés aux fluides biologiques. Elles comportent, en particulier, l'hygiène des mains (lavage simple ou utilisation d'une solution hydro-alcoolique pour friction) avant tout soin à un patient.

Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques (BMR) lorsque, du fait de l'accumulation des résistances naturelles et acquises, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique.

V-1. Entérobactéries productrices de bêta-lactamases EBLSE

Les entérobactéries dans leur ensemble représentent 35 à 40% des bactéries responsables d'IN. Les souches d'EBLSE (principalement *K. pneumoniae*, mais aussi *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter sp*). sont résistantes à l'ensemble des β -lactamines (sauf les céphamycines et l'imipénème), aux aminosides et très souvent aux fluoroquinolones (Doit et *al.*, 2010). Les EBLSE représentent environ 1% des bactéries isolées des IN. Les infections à EBLSE s'observent sous la forme de cas apparemment isolés, de cas groupés, ou de véritables épidémies. La tendance à la diffusion clonale des EBLSE est bien démontrée.

Les gènes de résistance des bêta-lactamases se situent soit au niveau du chromosome bactérien, soit sur des éléments extra-chromosomiques. TEM, SHV, CTX-M, OXA représentent les 4 BLSE majeures (Hissri, 2013).

En 1960, la découverte des premières bêta-lactamases plasmidiques TEM conférant une résistance aux aminopénicillines a contribué à la création de nouvelles ATB résistant à l'hydrolyse par ces enzymes, ces ATB sont les céphalosporines notamment la ceftriaxone, céfotaxime, céftazidime, ceux –ci entraînent une certaine stabilité vis-à-vis des bêta-lactamase TEM-1 et SHV-1 fréquemment produites par les entérobactéries comme *Kp* et *E.coli*.

Néanmoins d'autres beta-lactamases ont été obtenues à partir des TEM ou SHV-1 par mutation ponctuelle. (Ce qui a contribué à une augmentation de résistances aux céphalosporines de 3^{ème} génération et l'aztréonam (Dubouix et *al.*, 2004).

En fonction de la nature des mutations que les bêta-lactamases subissent il y a l'émergence de 2 groupes de BLSE : (TEM-5, TEM-24, SHV-4, SHV-5 : ceftazidimases) qui donnent un taux élevé de résistance à la céftazidime et au céfotaxime, ou équivalent à ces deux molécules (TEM-3, SHV-2 : les céfotaximases).

En 2000, l'émergence explosive de souches d'*Escherichia coli* produisant un nouveau type de BLSE notamment les CTX-M 1 a été remarquée tant en milieu communautaire qu'en milieu hospitalier conférant un plus haut niveau de résistance au céfotaxime d'où leur nom céfotaximases (Coque et *al.*, 2008).

V-2. Résistance de *Pseudomonas aeruginosa*

Les *P. aeruginosa* représentent 10 à 11% des bactéries responsables d'IN. Les souches de *P. aeruginosa* résistantes aux β -lactamines (ticarcilline, ceftazidime ou imipénème), qui ont tendance à être résistantes aussi aux aminosides et aux fluoroquinolones, devront faire l'objet d'une stratégie spécifique, notamment une politique de prescription raisonnée des antibiotiques pour éviter leur émergence et des mesures de contrôle de l'environnement pour éviter leur diffusion qui se produit par petites épidémies

V-3. *Acinetobacter baumannii* multirésistant (résistant à la ticarcilline)

A. baumannii représentent 2 à 4% des bactéries responsables d'IN. Les ABR jouent un rôle croissant dans les IN dans certains secteurs hospitaliers (unité de soins intensifs) et sont souvent à l'origine de bouffées épidémiques dans lesquelles est impliquée la forte contamination de l'environnement des patients porteurs. Certaines souches épidémiques résistantes à l'imipénème conduisent à des impasses thérapeutiques.

V-4. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM) : *S. aureus* est une des deux principales espèces responsables d'IN. Le développement incontrôlé des épidémies de SARM et les preuves répétées de leur diffusion clonale justifient à eux seuls la mise en place d'un programme de lutte contre les BMR. Les SARM représentent 5 à 10% des bactéries isolées des IN. Les SARM sont principalement impliquées dans les IN cutanées, du site opératoire (30%), des voies urinaires et respiratoires (20%) et les bactériémies (10%). Le délai moyen d'acquisition (délai entre l'admission et le premier prélèvement à visée diagnostique positif) est d'environ 17 jours. Les SARM, résistants à

toutes les β -lactamines, sont très souvent résistants aussi aux aminosides, aux macrolides et aux fluoroquinolones. Depuis quelques années, les souches de SARM se sont diversifiées (ex : souches de SARM sensibles à la gentamicine) ce qui ne résout pas pour autant les problèmes thérapeutiques et ne doit en rien modifier la stratégie de lutte contre leur diffusion. En effet, les souches de SARM sensibles à la gentamicine, mais résistantes au moins aux fluoroquinolones ont rapidement diffusé dans les hôpitaux français, ce qui montre bien la nécessité absolue de lutter globalement contre le phénomène de diffusion épidémique des SARM. Le fait que les SARM de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) aient essentiellement été rapportés dans trois pays à forte incidence de SARM (Japon, USA, France), justifie aussi cette attitude.

Depuis plus de dix ans *Staphylococcus aureus*, qui semblait auparavant avoir cédé la place aux bacilles à Gram négatif dans l'étiologie des infections nosocomiales, est réapparu sur le devant de la scène.

Une étude réalisée aux États-Unis a montré que les bactéries à Gram positif étaient à l'origine de 50% des infections nosocomiales dans les hôpitaux pédiatriques dont 15% impliquaient des *S. aureus* (Elhamzaoui et *al.*, 2009).

La meilleure solution pour prévenir des SARM est le lavage des mains, car sa transmission se fait essentiellement d'un patient porteur à un autre par le biais des mains contaminées du personnel soignant.

S. aureus a développé de nouveaux mécanismes de résistance, donc il est nécessaire de réaliser une surveillance permanente de l'évolution de la résistance de *Staphylococcus aureus* aux principales antibiotiques pharmacopées.

Deux mécanismes expliquent actuellement la résistance des *Staphylococcus aureus* aux bêta-lactamines : la production de bêta-lactamase et la modification de leur cible.

❖ **Résistance liée à la production de bêta-lactamase : (pénicillinase)**

Plus de 90% des souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline G ceci est associé à la production d'une pénicillinase dont le gène (*blaZ*) est situé sur un plasmide (Novick et *al.*, 1979).

Puisque les *Staphylococcus aureus* sont dépourvus de membrane externe, contrairement aux bacilles Gram négatif, la production de ces bêta-lactamases au niveau du cytoplasme va être excréter dans le milieu extérieur où l'hydrolyse de différentes bêta-lactamines, pénicilline G, ampicilline et ses dérivés, carbénicilline, ticarcilline, acyluréidopénicillines (pipéracilline par exemple) va s'effectuer. Par contre elles ne détruisent pas les pénicillines du groupe M

(méticilline, oxacilline et ses dérivés), les céphalosporines en général et certaines nouvelles molécules comme l'imipénème.

❖ **Résistance à la méticilline (oxacilline et dérivés)**

La particularité de ce type de résistance est liée à son expression « hétérogène ». Dans une population bactérienne présentant une résistance hétérogène, toutes les cellules possèdent les gènes de résistance à la méthicilline, mais seules quelques bactéries parmi des milliers expriment cette résistance à la méthicilline, Ceci veut dire que seule une fraction de la population est capable d'exprimer la résistance en moyenne, 1 bactérie sur 10^4 à 10^6 exprime la résistance. De nombreux facteurs expérimentaux influencent le phénomène de la résistance hétérogène notant le pH, la concentration de NaCl, la température, l'osmolarité et la bêtalactamine utilisée (Annear, 1968).

Les bêta-lactamines ont la propriété de se lier aux protéines de liaison de la pénicilline (PLP), ces derniers représentent des enzymes (transpeptidases, carboxypeptidases), qui sont indispensables à la synthèse de la paroi cellulaire pour les *Staphylocoques*, cette fixation bloque de manière irréversible la croissance bactérienne (Lacey et al., 2001).

Dans les SARM, la résistance à la méticilline est due à la synthèse d'une nouvelle PLP appelée 2a pour laquelle les bêta-lactamines n'auraient qu'une faible affinité. Ceci est dû à l'expression du gène *mecA* (gène de résistance à la méticilline) situé au niveau du chromosome bactérien codant à la synthèse du PLP2a.

***MATERIEL ET
MÉTHODES***

MATÉRIEL ET MÉTHODES :

Cette étude a été réalisée dans l'objectif de comparer les bactéries isolées en portage chez les nouveau-nés avec celles isolées à partir de leurs environnements, ainsi que leurs déterminants phénotypiques et génotypiques de la résistance aux antibiotiques. Ceci dans le but d'établir une éventuelle transmission croisée entre le nouveau-né et son environnement proche.

I. Lieu et période de l'étude :

Il s'agit d'une étude prospective réalisée dans le service de néonatalogie au CHU Hassan II Fès. Ce service est divisé en 2 ailes : un réservé aux prématurés et l'autre de la réanimation néonatale dont chacun possède 9 couveuses. Les analyses microbiologiques et moléculaires ont été réalisées au laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, durant une période allant de 1 Mars au 7 Juin 2015.

II. Prélèvements :

Au 1^{er} jour de son hospitalisation, chaque nouveau-né faisait l'objet d'un prélèvement par écouvillonnage au niveau des fosses nasales et de la muqueuse rectale, ainsi qu'au niveau de son environnement immédiat. Les mêmes types de prélèvements étaient réalisés à la sortie du nouveau-né en question.

Les prélèvements de surface ont concerné 8 points de l'environnement proche du nouveau-né notamment au niveau de différents points de la surface de la **couveuse**: hublot pivotant de la couveuse (17), la surface qui se trouve en dessous du matelas de la couveuse (15) et la surface de l'écran afficheur (11), la table à tiroir (2), le plateau à matériel (2), la surface du scope (18), le poignet de porte de la salle (4), surface de la couveuse (26).



Dessous du
matelas

Surface de la
couveuse

Hublot
pivotant

Ecran afficheur

III. Technique par écouvillonnage

✚ Prélèvements de surfaces

La surface a été frottée à l'aide d'un écouvillon humidifié avec de l'eau physiologique stérile, sur des zones définies en stries parallèles rapprochées en le faisant tourner légèrement, puis sur les mêmes zones en stries perpendiculaires aux premières (Norme ISO/DIS 14698-1), puis nous avons remis les écouvillons dans leur étuis protecteurs et nous les avons transmis au laboratoire dans une glacière maintenue entre 2 et 5°C. Les écouvillons ont été transférés en milieu d'enrichissement BHI concentré pour réaliser les analyses microbiologiques.

✚ Ecouvillonnage du nouveau né

Écouvillonnage nasal: On introduit l'écouvillon dans chaque narine le plus profond possible suivie de rotations sur les parois nasaires.

Écouvillonnage rectal: L'écouvillon est introduit dans le sphincter anal, on le fait tourner, on le retire puis on vérifie la présence de traces de matières fécales (Figure 4).

Chaque écouvillon est placé dans son étui, rebouché et identifié clairement. Les renseignements suivants sont notés: identification du NN, date, heure, site de prélèvement.



Figure 4: Photo illustrant la méthode d'écouvillonnage

IV. Ensemencement sur des milieux spécifiques

Les écouvillons ont été ensemencés par épuisement sur des milieux de culture spécifiques des bactéries

- Pour la recherche des entérobactéries fermentaires et non fermentaires, l'ensemencement a été fait sur des boîtes contenant le milieu EMB (Eosine Methyl Blue), incubées à 37 °C pendant 24 H. Toutes les types et formes de colonies ont été retenues pour identification.
- Pour la recherche des Staphylocoques, nous avons utilisé le milieu Chapman, l'incubation a été faite à 37 °C pendant 48 heures. En raison de la présence d'une forte concentration en NaCl, Ce milieu permet la sélection des Staphylocoques tolérant des fortes concentrations en NaCl.

- Pour la recherche du *Pseudomonas*, nous avons utilisé un milieu sélectif de *Pseudomonas*, et l'incubation a été faite à 37 °C pendant 24 H.

V. Conservation des souches isolées

Nous avons ensemencé la culture isolée, dans un tube contenant de la gélose inclinée pour qu'elle soit conservée afin de réaliser par la suite des tests d'identification.

VI. Tests d'identification biochimique

A. Coloration de Gram

Un étalement aussi mince que possible a été effectué à l'aide d'une anse sur une lame contenant une goutte d'eau, après le séchage de la lame, nous avons déposé quelques gouttes du cristal violet en le laissant agir 30 s à 1 min, puis la lame a été recouverte avec du lugol (1min). En effectuant un rinçage de la lame après chaque étape. Ensuite une élimination du cristal violet a été réalisée à l'aide de l'alcool-acétone (5 à 10 secondes). Après, la lame a été rincée avec de l'eau, puis recouverte de la solution de fuchsine, pendant 30 secondes.

B. Milieu Hajna Kligler

Ce milieu a été utilisé pour l'identification des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, en permettant de révéler la présence de 4 caractères chez la bactérie étudiée : l'utilisation du glucose et du lactose (fermentation du glucose, l'oxydation du lactose), la production de H₂S et la production de gaz. La lecture des résultats se fait après 24h

- L'utilisation du glucose : le culot vire au jaune :
- L'utilisation de lactose : la pente devient jaune :
- Production de gaz : quelques bulles, ou une poche gazeuse qui décolle complètement le milieu gélosé du tube.
- La production de H₂S : précipité noir qui se développe de long de la piqûre.

C. Milieu Citrate de Simmons (CS)

• Principe

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate par les bactéries comme source de carbone et d'énergie, dans ce cas le milieu va virer au bleu, et le BBT permet de mettre en évidence une alcalinisation en cas d'utilisation du citrate. Les bactéries utilisant le citrate comme source de carbone bleuissent normalement le milieu.

D. Test oxydase

• Principe

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase, Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine.

- **Technique**

Avec une pipette pasteur nous avons étalé une colonie de germes à étudier sur un papier pré-imprégné par le N - diméthyl paraphénylène diamine.

- **Résultat**

- ✓ Si la colonie prend une coloration violette. Le germe possède une oxydase : le test est dit positif.
- ✓ Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est dit négatif.

E. Milieu urée – indole

- **Principe**

Le milieu urée-indole ou urée-tryptophane est un milieu synthétique complexe fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification des entérobactéries et autre bactéries.

Il permet la recherche de l'activité de l'uréase et la production d'indole à partir du tryptophane grâce à une tryptophanase.

- **Technique**

Dans un tube à hémolyse, nous avons rempli 500 µl du milieu urée indole, dans lequel nous avonsensemencé richement une suspension de culture, et l'incubation a été faite pendant 24 heures à 37 °C.

- **Résultat**

- ❖ L'addition de réactif de Kovacs se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge qui remonte à la surface, dû à la réaction entre le noyau indole et une des substances du réactif.
- ❖ Les bactéries qui possèdent une uréase active vont transformer urée et H₂O en CO₂ et le NH₃, ces derniers vont ensuite se combiner pour donner du carbonate d'ammonium donc une alcalinisation du milieu.

Milieu devient rose : Bactérie uréase +.

Milieu persiste orange : Bactérie uréase –.

Formation d'un anneau rouge après l'ajout du réactif de Kovacs : indole +.

Absence de coloration rouge : indole –.

F. Milieu MRVP

- **Principe**

Ce test permet de mettre en évidence les voies fermentaires des entérobactéries :

Voie du butan-2,3-diol (VP).

Voie des acides mixtes (RM).

- **Test de RM**

Les bactéries fermentent le glucose par la voie des acides mixtes (acide formique, lactique, pyruvique) Ce qui libère une grande quantité d'acide organique dans le milieu et donc il y aura un abaissement du pH.

L'indicateur de pH utilisé est le Rouge de Méthyle (RM) qui est rouge à un pH inférieur à 5 et jaune à un pH supérieur à 5,8.

- **Test VP**

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone) au cours de la fermentation butylène glycolique: en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d'a-naphtol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.

- **Technique**

Dans un tube à hémolyse, nous avons rempli 1 ml du milieu MRVP, dans lequel nous avonsensemencé richement une suspension de culture à l'aide d'une anse stérile. Après une incubation pendant 24 heures à 37 °C l'ajout du rouge de méthyle au tube a été effectué.

- **Résultat**

Milieu acide ($\text{pH} < 5$) = RM (rouge) = bactérie fermente le glucose par voie des acides mixtes (Suite à une acidification importante du milieu).

Milieu acide ($\text{pH} > 5$) = RM (jaune) = bactérie ne fermente pas le glucose par voie des acides mixtes.

G. Galerie Api 20 E

L'identification d'une bactérie avec le système Api 20 E consiste à réaliser 20 tests avec la galerie Api 20 E, puis à interpréter les résultats obtenus à l'aide de la base de données Api 20^E.

- **Inoculum de la galerie**

Nous avons introduit la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette avec :

- Remplissage des tubes et cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette pasteur.
- Remplissage uniquement les tubes et non les cupules des autres tests.
- Création d'une anaérobiose dans les tests ; ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leurs cupules d'huile d'immersion
- Couverture de la boîte et la placer à l'étuve à 35-37 °C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture de la galerie**

Après 18-24 heures à 35-37° C, la lecture de la galerie a été réalisée en se référant au tableau de lecture, nous avons noté les résultats des tests complémentaires, en ajoutant des réactifs qui sont nécessaires pour la révélation de certains tests.

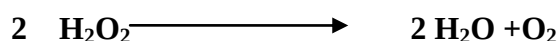
➤ **Tests d'identification des *Staphylocoques***

A. Test catalase

Sur une lame propre et sèche nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée sur laquelle nous avonsensemencé l'inoculum bactérien à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée.

a. Principe

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire (AS et AAF) qui peuvent détruire les peroxydes. La catalase est une enzyme qui catalyse :



b. Lecture

- apparition de bulles, dégagement gazeux : catalase +.
- pas de bulles : catalase –.

B. Test coagulase

La recherche de la Staphylocoagulase constitue un critère absolu d'identification de *Staphylococcus aureus* car elle joue un rôle central dans le pouvoir pathogène des Staphylocoques.

a. Méthode

Le test de détection consiste à incuber, pendant 4 h puis 24 h, à 37 °C, un mélange de 0,5 ml de plasma de lapin et de 0,5 ml de la souche à tester. L'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube à 90 °C.

Lorsque la bactérie possède une coagulase, le plasma de lapin reste en masse au fond du tube.

➤ **Tests d'identification des *Pseudomonas***

Pour confirmer que les souches qui ont été poussées sur milieu sélectif de *Pseudomonas* avec une coloration verdâtre sont bien des souches de *Pseudomonas* nous avons effectué un test oxydase et nous avonsensemencé la souche sur milieu Hajna Kligler.

a. Résultat

Glucose -, lactose-, oxydase + = *Pseudomonas aeruginosa*

VII. Antibiogramme

Méthodes de diffusion : antibiogramme standard en milieu gélosé : selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (Recommandations 2013).

a. Milieu de culture

Pour réaliser la méthode d'antibiogramme nous avons utilisé un milieu non sélectif (le milieu MH). Dont l'épaisseur de la gélose doit être strictement de 4 mm répartie uniformément et les boîtes doivent être séchées 30 minutes avant leur emploi.

b. Réalisation de l'inoculum bactérien

Pour préparer l'inoculum bactérien nous avons travaillé au départ avec une souche pure. A partir d'une colonie bien isolée au niveau de la gélose nutritive qui représente une culture jeune nous avons réalisé une suspension turbide en bouillon échelle 0,5 de Mac Farland en effectuant par la suite une dilution de 1/10 de la culture ainsi préparée.

c. Ensemencement par écouvillonnage

Nous avons effectué un ensemencement en stries sur toute la surface du milieu à 3 reprises selon 3 angles (60 °). Avant de réaliser un écouvillonnage partout autour du bord de la surface de la gélose.

d. Application des disques

Les disques choisis ont été posés à l'aide d'une pince flambée, tout en appuyant légèrement sur les disques pour qu'ils soient bien coller sur la surface de la gélose, une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés au maximum de 30 mm de sorte que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas.

e. Incubation

Les boîtes ont été ensuite portées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures, après incubation chaque disque sera entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne.

f. Choix des antibiotiques

Les antibiotiques testés lors de la réalisation de l'antibiogramme pour les entérobactéries ainsi que leur concentration :

- ✓ Deux aminopénicillines : l'Amoxicilline (AML). (30 µg) et Amoxicilline / Acide clavulanique (AMC) (10µg).
- ✓ Une céphalosporine de première génération : la Céfotaxime (KF) (30 µg).

- ✓ Une céphalosporine de deuxième génération : la Céfoxitine (FOX) (30 µg).
- ✓ Deux céphalosporines de troisième génération : le Céfotaxime (CTX) (30 µg) et la Céfotazidime (CAZ) (30 µg).
- ✓ Deux aminosides : la gentamicine (CN) (10 µg) et l'Amikacine (AK) (30 µg).
- ✓ Trois quinolones : l'acide nalidixique (NA) (30 µg) et la ofloxacin (OFX) (5 µg). ciprofloxacine (CIP) (5 µg).
- ✓ Un sulfamides : Sulfaméthoxazole (SXT) (1,25-23,75 µg).
- ✓ Une carbapénème : Ertapénème (ETP) (10 µg).

VIII. La Recherche de la bêta-lactamase à spectre élargi :

Lors de la réalisation d'un antibiogramme standard, après ensemencement, et au moment de l'application des disques sur la gélose, nous avons placé le disque porteur l'amoxicilline / acide clavulanique (AMC) en face d'un à deux céphalosporines de 3^{ème} génération : Céfotaxime (CTX), Céfotazidime (CAZ).

La réalisation du test de synergie et l'obtention d'une image sous forme de « bouchon de champagne » comme visualisé dans la figure 5 ci-dessous, permet de confirmer qu'il y a la présence de BLSE et alors conclure que la souche est productrice de bêta lactamase à spectre élargi.

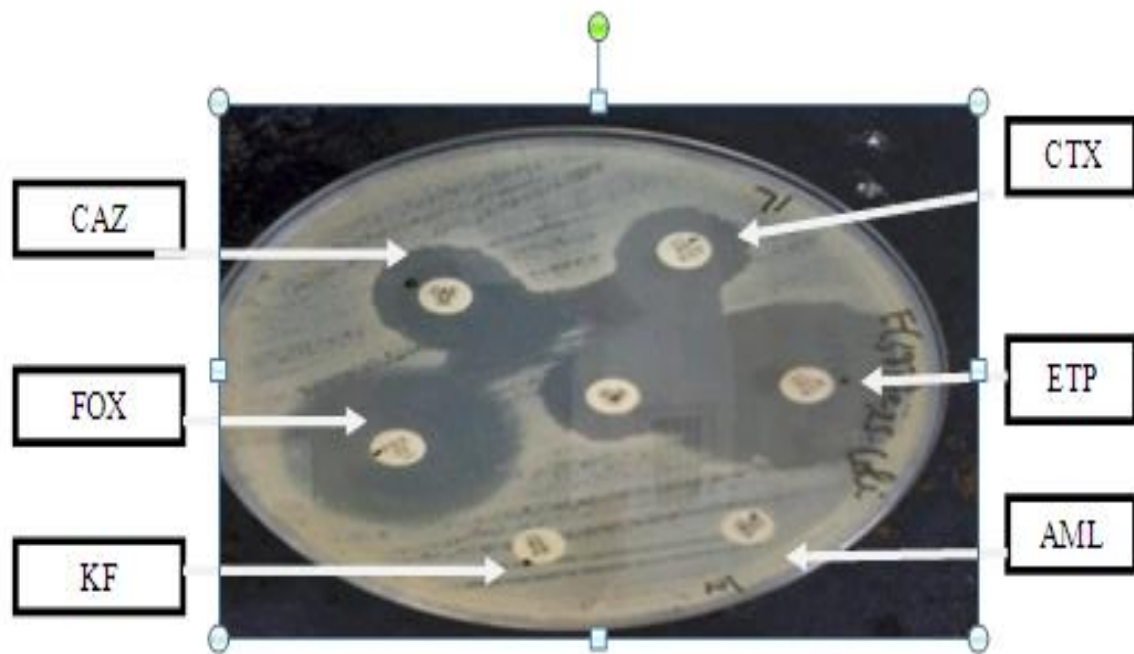


Figure 5 : *E. coli* productrice de bêta-lactamase dont AMC présente une synergie avec CAZ, CTX, KF (Test de synergie positif).

Les antibiotiques utilisés lors de la réalisation de l'antibiogramme pour les *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont illustrés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Antibiotiques testés pour l'antibiogramme des *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*

Les antibiotiques testés pour :	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
✓ Pénicilline G (P). ✓ Vancomycine (VA). ✓ Teicoplanine (Tec). ✓ Gentamycine (CN) (10 µg). ✓ Céfoxitine (FOX) (30 µg). ✓ Sulfaméthoxazole (SXT) (1,25-23,75) ✓ Levofloxacin (Lev). ✓ Rifampicine (RD) (5µg). ✓ Fosfomycine (FOS). ✓ Erythromycine (E). ✓ Lincomycine (MY). ✓ Pristinamycine (PT).	✓ Tobramycine (TOB) (10 µg). ✓ Céftazidime (CAZ) (10 µg). ✓ Ciprofloxacine (CIP) (5 µg). ✓ Colistine (CT) ✓ Imipénème (IPM) (10 µg). ✓ Pipéracilline (PRL) (30 µg). ✓ Ticarcilline (TIC) (75 µg). ✓ Aztréonam (ATM) (30 µg). ✓ Céfépime (FEP) (30 µg). ✓ Pipéracilline + tazobactam (TPZ) (30 - 6 µg).

IX. Détection des gènes de résistance par PCR (Polymerase Chain Reaction)

A. Extraction d'ADN total

La méthode que nous avons utilisée pour extraire l'ADN est celle du choc thermique : pour chaque culture jeune, nous avons prélevé deux à cinq colonies dans des tubes eppendorfs contenant 500µl d'eau distillée stérile. Après, homogénéisation par vortex, ce mélange a été mis dans un bain marie à 100 °C pendant 10 minutes, puis dans la glace immédiatement pendant 2 min. nous avons ensuite réalisé une centrifugation pendant 10 minutes à 14000g.

Les surnagants récupérés vont servir comme extraits d'ADN dans les réactions de PCR et leurs conservation a été faite à – 20 °C.

B. Caractérisation des gènes codant les bêta-lactamases

Nous avons procédé à la recherche des gènes codants les β-lactamases BLSE par PCR: *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M1*, *blaCTX-M2*, *blaCTX-M9* (tableau 2). La polymérisation est réalisé dans un mélange réactionnel contenant de faibles quantités d'ADN possédant la séquence à amplifier (2µl d'ADN), et le mix PCR : 0,5 µl dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP), deux amorces nucléotidiques complémentaires des séquences flanquants la cible à

amplifier (1 µl pour chaque amorce) (Tableau 2), 0,2 µl de la Taq polymérase, 2,5 µl de la solution de MgCl₂, 5 µl tampon d'enzyme, 37,8 µl d'eau ultra pure.

Le mélange réactionnel utilisé pour cette amplification contient, pour chacune des réactions, une concentration 1X du tampon, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 400 nM de chaque amorce, 1 unités (U) de la Taq polymérase (Invitrogen® Taq DNA Polymerase) et 5µL d'ADN extrait. Le volume final est ajusté à 50 µL par ajout de l'eau distillée stérile.

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisés lors de la réalisation de la PCR (Gangoue., 2007)

Gène	Amorces	Séquence d'amorce (5'- 3')	Taille de la séquence amplifiée (pb)
<i>bla_{SHV}</i>	OS-5	CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC	795 pb
	OS-6	TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGT CA	
<i>bla_{TEM}</i>	A-216	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1079 pb
	A-217	GACAGTTACCAATGCTTAATCA	
<i>bla_{CTXM- Groupe1}</i>	CTXM1(+)	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	863 pb
	CTXM1(-)	TTGGTGACGATTTTAGCCGC	
<i>bla_{CTXM- Groupe2}</i>	CTXM2(+)	ATGATGACTCAGAGCATTCG	865 pb
	CTXM2(-)	TGGGTACGATTTTCGCCGC	
<i>bla_{CTXM- Groupe9}</i>	CTXM9(+)	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	869 pb
	CTXM9(-)	CCCTTCGGCGATGATTCTC	

L'ADN a été amplifié pour un volume final de 50 µl, dans un thermocycleur (Applied Biosystem) en respectant les conditions d'amplification (Tableau 3).

Tableau 3 : Conditions d'amplification pour chaque gène (Gangoue., 2007)

Etapas d'amplification	Condition de température/durée	
	<i>bla_{SHV}, CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9,</i>	<i>bla_{TEM}</i>
Dénaturation initiale	94 °C/5 min	94 °C/5 min
Dénaturation cyclique	94 °C/1 min	94 °C/1 min
Hybridation	60 °C/1 min	50 °C/1 min
Elongation cyclique	72 °C/1 min	72 °C/1 min
Elongation finale	72 °C/7 min	72 °C/7 min

Pour chaque PCR, il faut toujours un témoin positif et un témoin négatif (eau distillée). Les souches témoins qui ont été utilisés sont illustrées ci-dessous dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Souches témoins utilisées

<i>Bactérie</i>	<i>Numéro</i>	<i>Caractéristiques</i>
<i>Salmonella</i> sp	U2A1446	SHV/TEM
<i>E. coli</i>	U2A1790	CTX-M-groupe 1
<i>Salmonella</i> sp	U2A2145	CTX-M-groupe 2
<i>E. coli</i>	U2A1796	CTX-M-groupe 9

C. Préparation du gel

Nous avons préparé 1g de poudre d'agarose pour 100 ml de TBE 0.5X, L'agarose a été ensuite solubilisé dans un four à micro-ondes. Une fois un peu refroidi, nous avons ajouté 1,5 µl de Bromure d'éthidium pour 100 ml de TBE, nous avons versé l'agarose dans un moule pourvu d'un peigne creusant des puits, permettant de déposer les échantillons. Lorsque le gel se solidifie, nous avons retiré le peigne et les rubans adhésifs qui fermaient les extrémités du moule. Ensuite, l'ensemble du gel et moule est placé dans la cuve d'électrophorèse, puis la cuve à électrophorèse est alors remplie avec le tampon TBE à 0.5X jusqu'à ce que le gel soit complètement immergé.

D. Electrophorèse

Dans les puits du gel, nous avons déposé 12 µl d'un mélange contenant 10 µl de la solution, d'ADN et 2 µl de bleu de bromothymol.

E. Révélation

Après la migration, le gel a été immergé dans une solution de TBE. La lecture s'est faite sous UV.

X. Statistique khi deux :

La statistique du Khi-deux χ^2 consiste à mesurer l'écart qui existe entre la distribution des effectifs théoriques e_i et la distribution des effectifs observés o_i et à tester si cet écart est suffisamment faible pour être imputable aux fluctuations d'échantillonnage. Pour cela nous sommes intéressé à calculer le test ki deux pour chaque souche bactérienne isolée à l'entrée et à la sortie des patients afin de savoir est ce que la différence est significative ou non sachant que $\alpha = 0,05$. Selon la formule suivante :

$$\sum_{i=1}^m \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

RÉSULTATS

I. Caractéristiques des nouveau-nés étudiés

Dans cette étude, la moyenne d'âge des patients étudiés a été de 2 jours. Les filles représentaient 33,3%. La majorité des patients (66,6%) sont nés dans la maternité du CHU, 83,3% proviennent d'un établissement hospitalier tandis que 16,6% proviennent de leurs domiciles. Plus que la moitié des patients (58,3%) ont été hospitalisés à cause d'une détresse respiratoire et prématurité. Tandis que 41,6% des patients avait un ictère, dénutrition et souffrances néonatales.

II. Fréquence des bactéries isolées à partir du nouveau-né

Chez les nouveau-nés (n=12), 20 prélèvements rectaux répartis entre l'entrée et la sortie du patient ont été réalisés. Nous avons isolé et identifié 24 bactéries, *E.coli* était l'espèce majoritaire avec 53,8% à l'admission des nouveau-nés et 45,5% à la sortie, suivi de *klebsiella pneumoniae* avec 27,03% à l'admission des patients et 27,27% à la sortie, puis *Pseudomonas aeruginosa* qui a présenté 15,38% à l'admission et 9,09% à la sortie, alors que *Acinetobacter baumannii* a été isolé deux fois à l'admission et à la sortie. *Klebsiella oxytoca* a été isolée seulement à la sortie d'un patient (Tableau 5).

Tableau 5: Fréquence des bactéries isolées à partir des prélèvements des nouveau-nés

Bactéries	<i>E .coli</i> (%)	<i>K.pneumoniae</i> (%)	<i>A.baumannii</i> (%)	<i>P.aeruginosa</i> (%)	<i>K.oxytoca</i> (%)
Entrée	7 (53,84)	3 (23,07)	1 (7,69 %)	2 (15,38%)	0
Sortie	5 (45,45)	3 (27,27)	1 (9,09%)	1 (9,09%)	1 (9,09%)

On remarque que le nombre de souche d'*E.coli* isolée à partir des prélèvements réalisés à l'entrée des patients est supérieur à ceux réalisés à leur sortie, la même chose pour *pseudomonas aeruginosa*, Mais cette différence reste statistiquement non significative ($p < 0,05$).

III. Fréquence et profil de résistance des bactéries isolées chez les NN

A l'admission des patients, *E.coli* a représenté une fréquence de résistance élevée (62,50%) par rapport à *K. pneumoniae* avec 25% et *A. baumannii* 12,5% (Tableau6).

Pour les prélèvements de sortie, *E.coli* et *Klebsiella pneumoniae* ont représenté la même fréquence de résistance (37,5%) alors que *K. oxytoca* qui a été isolée à la sortie d'un nouveau-né a présenté une fréquence de résistance de 12,50%. Les 2 isolats d'*A. baumannii* ont été résistantes à tous les antibiotiques testés alors que *P. aeruginosa* étaient toutes sensibles vis-à-vis des antibiotiques testés que ça soit à l'admission ou à la sortie des patients (Tableau 6).

Tableau 6 : Fréquence de résistance des entérobactéries isolées à partir des prélèvements rectales

Souches	<i>E. coli</i> (%)	<i>K. pneumoniae</i> (%)	<i>A.baumannii</i> (%)	<i>K.oxytoca</i> (%)
Entrée	5 (62,50)	2 (25)	1 (12,5)	0
Sortie	3 (37,5)	3(37,5)	1(12,50)	1(12,50)

A partir des prélèvements de la muqueuse rectale, les *E.coli* isolées ont présenté 71,42% de résistance à l'amoxicilline, 42,85% à l'amoxicilline-acide Clavulanique, 42,85% à la cefotaxime et ceftazidime, 14,28% à la cefoxitine, et 42,8% à la ciprofloxacine, l'ofloxacine, l'acide nalidixique et le cotrimoxazole. Tandis que 84% des entérobactéries ont été productrices de β -lactamases à spectre étendu (à l'admission: 25% de *Kp*, 75% d'*E.coli*. et à la sortie: 43% de *Kp*, 43% d'*E.coli* et 14% de *klebsiella oxytoca*).

Le nombre de chaque souche d'entérobactérie résistante isolée à partir des prélèvements réalisés à l'entrée et à la sortie des patients est différent (sauf pour *Acinetobacter baumannii*). La différence reste statistiquement non significative avec un $p < 0,05$.

IV. Fréquence des bactéries isolées à partir de l'environnement proche du patient :

A partir des 95 prélèvements de surface réalisés, nous avons identifié 67 entérobactéries, 27 souches de *Pseudomonas aeruginosa* et 3 souches de *Staphylococcus aureus*. En raison de l'abondance des Staphylocoques coagulase négatives dans les prélèvements de surface (une centaine), nous avons été contraints de les étudier ultérieurement.

klebsiella pneumoniae a été majoritaire avec (39,34% à l'admission et 42,42% à la sortie) suivie d'*Escherichia coli* avec (29,50% à l'admission et 21,21 % à la sortie), puis 4 souches de *Raoultella terrigena* (3,27% à l'admission et 6,06 % à la sortie). Vingt sept isolats de *Pseudomonas aeruginosa* soit 15,60 % et 8 isolats n'ont pu être identifiés (Tableau 7).

Tableau 7: Fréquence des bactéries isolées à partir des surfaces

Isolats	<i>E .coli</i> (%)	<i>K. pneumoniae</i> (%)	<i>P. aeruginosa</i> (%)	<i>Raoutella terrigena</i> (%)
Entrée	18 (29,50)	24 (39,34)	17 (27,86)	2 (3,27)
Sortie	7(21,21)	14(42,42)	10(30,30)	2(6,06)

Pour *Kp*, *P.aeruginosa*, *Raoutella terrigena* il n'y a pas de différence significative avec ($p < 0,05$). Alors que le nombre de souches d'*E.coli* isolées à partir des prélèvements de surface réalisés à l'entrée est supérieur à celui obtenu à la sortie, cette différence est statistiquement significative avec un $p < 0,05$.

V. Fréquence et profil de résistance des bactéries isolées à partir des surfaces

Trois souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de 3 points (poignet, scope et hublot pivotant) ont été toutes résistantes à la pénicilline G.

L'analyse du profil de résistance des entérobactéries isolées à partir de l'environnement a montré que *Klebsiella pneumoniae* est la souche qui a représentée une haute fréquence de résistance aux antibiotiques (57,15% à l'entrée et 66,66% à la sortie) par rapport à *E.coli* qui a présentée une fréquence de résistance de 42,85% à l'admission et 33,33% à la sortie. Toutes les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont présenté une sensibilité totale vis-à-vis des différents antibiotiques testés (Tableau 8).

Tableau 8: Fréquence de résistance des entérobactéries isolées à partir des surfaces

Souches	<i>E .coli</i> (%)	<i>K. pneumoniae</i> (%)
Entrée	18 (42,85)	24 (57,15)
Sortie	7 (33,33)	14 (66,66)

Le nombre d'entérobactéries résistantes *Kp* et *E.coli* isolées à partir des différents points de surface à l'entrée est supérieur à celui observé à la sortie. Cette différence est statistiquement significative pour *E .coli* seulement avec $p < 0,05$.

Sur les 63 isolats d'entérobactéries isolée à partir des surfaces, 3 souches d'*E.coli* sont résistantes seulement à l'amoxicilline alors que 95% ont été productrices de β -lactamases à spectre étendu BLSE confirmée par l'analyse moléculaire: 22 *E. coli*, et 38 *K. pneumoniae*.

Le taux de résistance des entérobactéries vis-à-vis des bêta-lactamines utilisés est de : 46% pour l'Augmentin, 40% pour l'Amoxicilline, 95 % pour la Céfotaxime, des pourcentages de résistance de 95 % vis-à-vis de la Céfotaxime et de la Céfotaxime, 0 % pour la Céfoxitine, et 2 % pour l'Ertapénème ont été observés. Alors que pour les fluoroquinolones (Acide nalidixique, Ciprofloxacine, Ofloxacine) nous avons observé une résistance de 95 % pour chacun d'eux. 95 % pour le sulfaméthoxazole et 0% pour la fosfomycine (Figure 6).

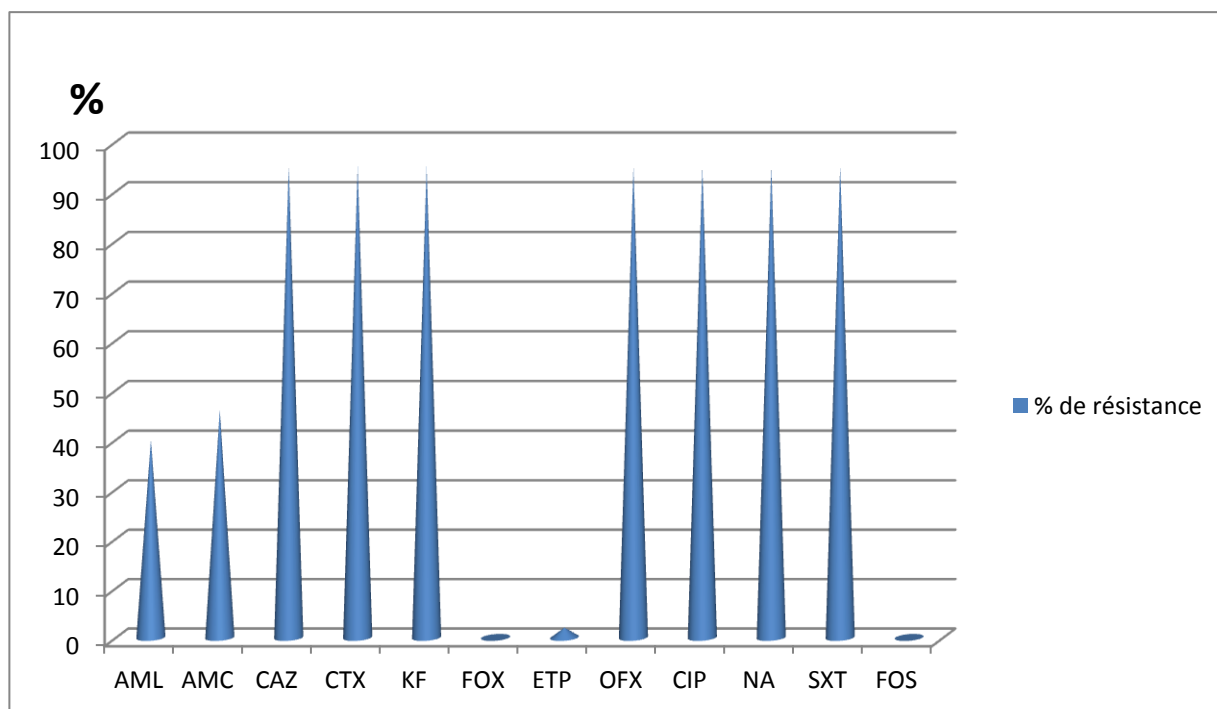
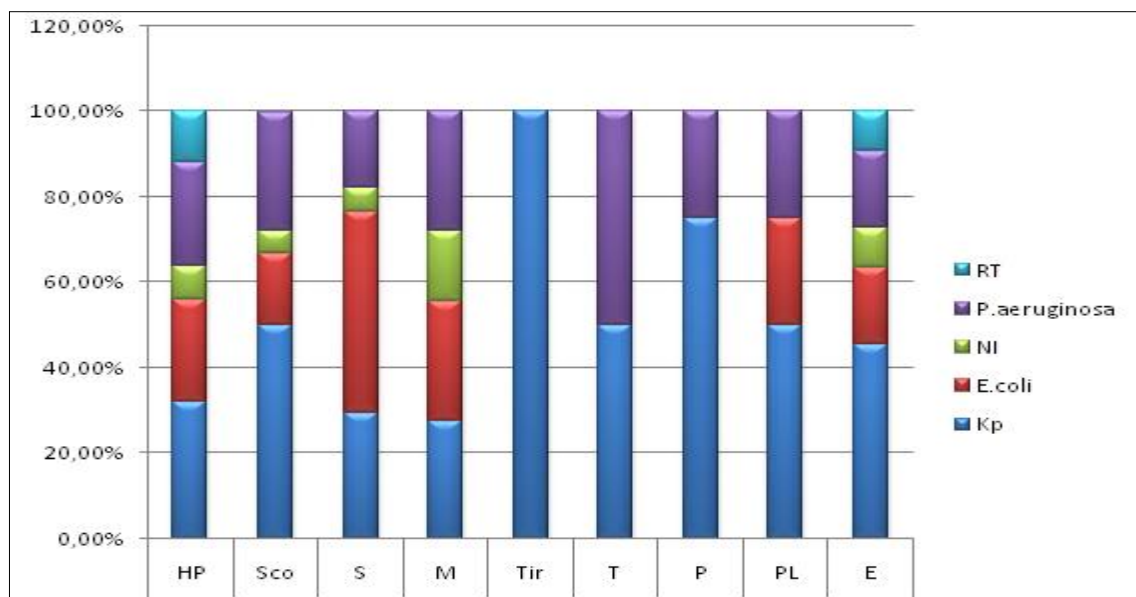


Figure 6: Pourcentage de résistance des entérobactéries vis-à-vis des différents antibiotiques testés

VI. Répartition des bactéries en fonctions des points de prélèvements

Les prélèvements de surface ont concerné 8 points : hublot pivotant de la couveuse (17), la surface qui se trouve en dessous du matelas de la couveuse (15) et la surface de l'écran afficheur (11), la table à tiroir (2), le plateau à matériel (2), la surface du scope (18), le poignet de porte de la salle (4), surface de la couveuse (26).

Sur les 95 prélèvements de surface, 2% ont été négatif et 21% échantillons ne renfermaient que des SCN alors que 73 prélèvements ont été positifs aux autres bactéries réparties entre *K. pneumoniae* majoritairement isolée dans toutes les surfaces analysées (100%) (Figure 7).



Hp : hublot pivotant, **SCO** : scope, **S** : surface de la couveuse, **M** : dessous du matelas **Tir** : Tiroir, **T** : Table, **P** : poignet de porte, **PL** : plateau, **E** : Ecran.

Figure 7 : Fréquence des bactéries isolées au niveau de point de prélèvements positifs

VII. Résultat de la recherche de gènes de résistance retrouvés chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases isolées à partir des prélèvements réalisés sur les patients

Nous avons isolé 10 entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à partir des différents prélèvements réalisés sur les nouveau-nés. Ces EBLSE ont fait l'objet d'une étude génotypique des 5 gènes de résistances *bla*_{CTXM1}, *bla*_{CTXM2}, *bla*_{CTXM9}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, le gène *bla*_{CTXM1} était le plus retrouvé par rapport aux autres gènes (Figure 8).

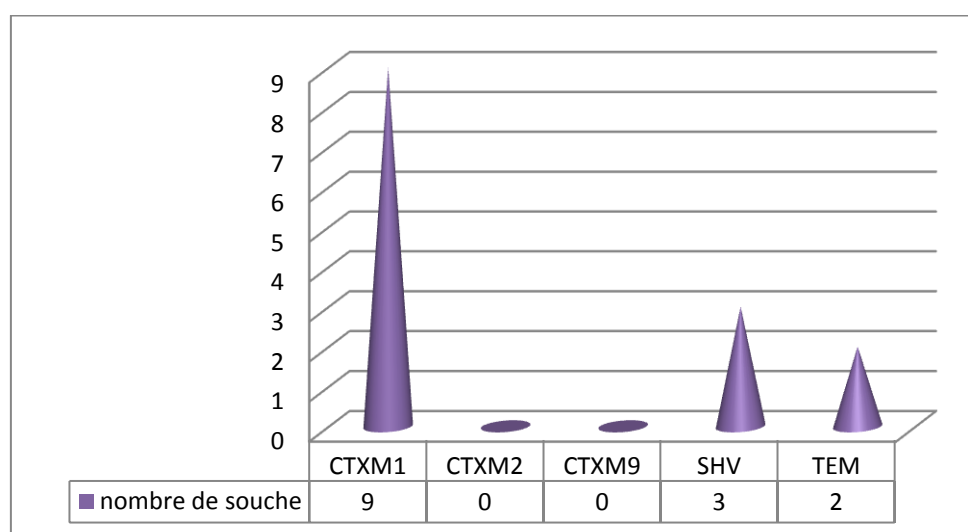


Figure 8: Répartition des gènes *bla* chez les EBLSE isolées au niveau des prélèvements rectaux réalisés chez les nouveau-nés

VIII. Résultat de la recherche de gènes de résistance retrouvés chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases isolées à partir de l'environnement proche des patients

Nous avons isolé 60 entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi au niveau des différents points de surface avoisinants les nouveau-nés. Celles-ci ont fait l'objet d'une PCR dans le but de détecter les 5 gènes de résistances *bla*_{CTXM1}, *bla*_{CTXM2}, *bla*_{CTXM9}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}.

Le gène *CTX-M1* a été le plus fréquent, retrouvé chez 81,6% des entérobactéries analysées. Les SHV et TEM ont été retrouvés chez 68,3% des isolats. Cependant le *CTX-M9* n'a pas été détecté chez aucune des entérobactéries analysées (Figure 9).

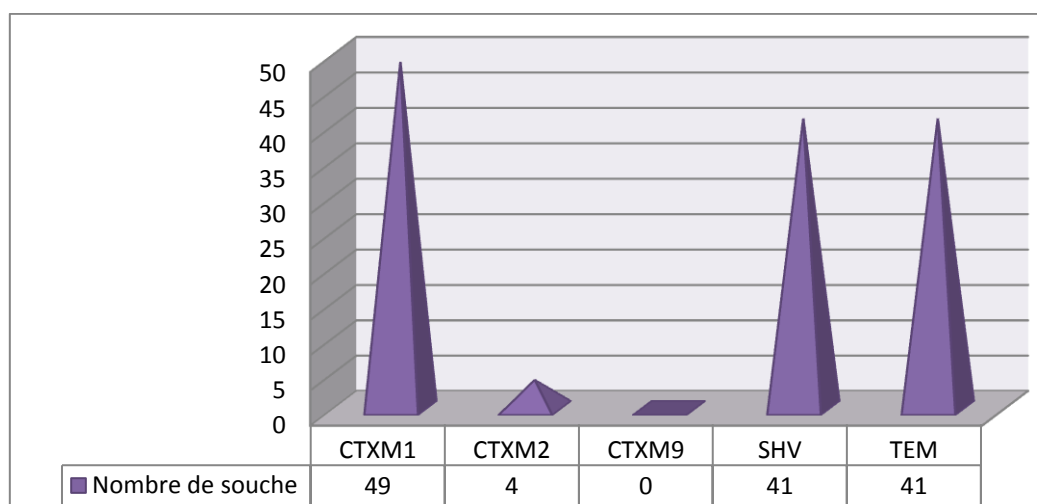


Figure 9: Répartition des gènes *bla* chez les EBLSE isolées au niveau de l'environnement proche des patients

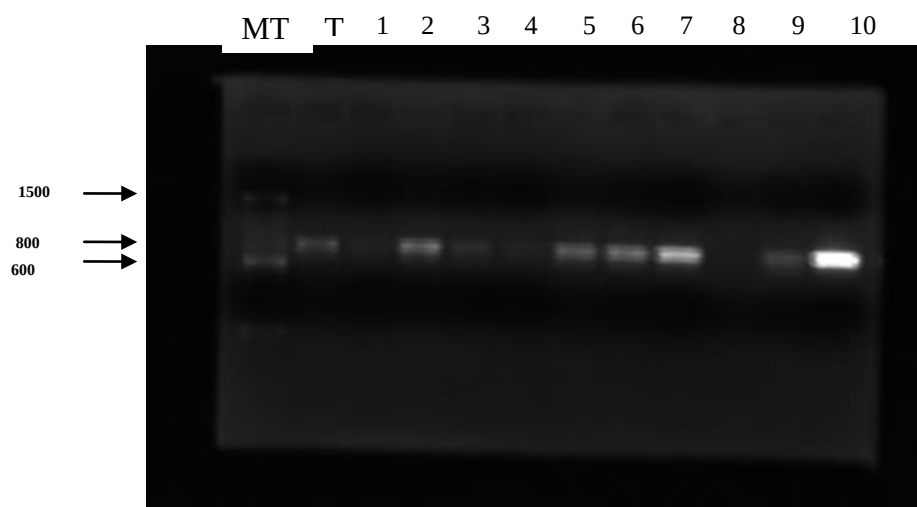


Figure 10 a : Image de l'électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits d'amplification de la PCR du gène *bla*_{CTXM1}

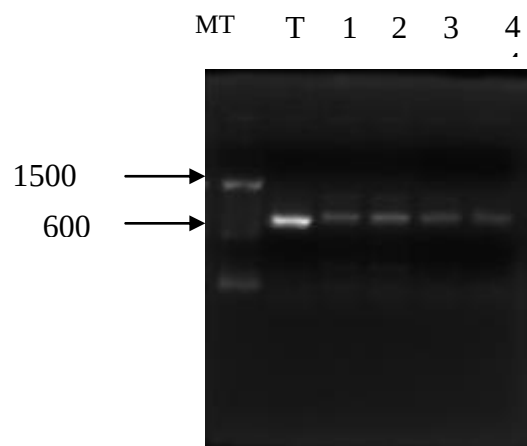


Figure 10 b : Image de l'électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits d'amplification de la PCR du gène *bla_{CTXM2}*

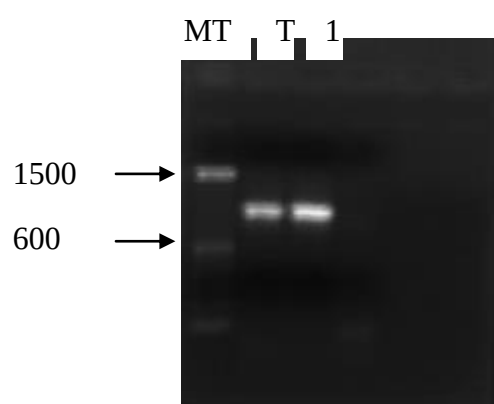


Figure 10 c : Image de l'électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits d'amplification de la PCR du gène *bla_{TEM}*

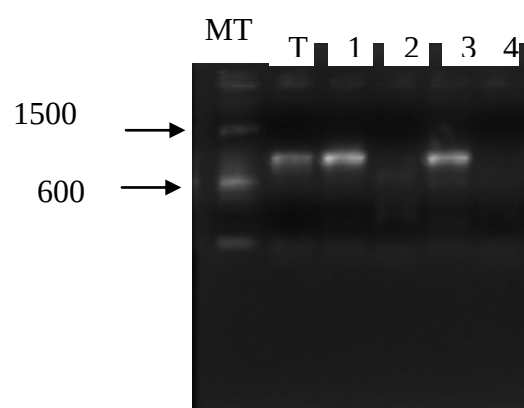


Figure 10 d : Image de l'électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits d'amplification de la PCR du gène *bla_{SHV}*

IX. Comparaison entre le profil de résistances des bactéries de chaque nouveau-né avec celles de son environnement

Pour 10 entérobactéries isolées à partir des prélèvements rectaux réalisés sur les nouveau-nés, le profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés a été étudié. Soixante trois entérobactéries isolées des prélèvements de l'environnement proche de chaque patient, ont fait l'objet aussi d'un antibiogramme. Les tableaux (9- 20) nous montrent la comparaison entre le profil de résistances obtenu chez les bactéries isolées de chaque nouveau-né avec celles de son environnement.

Tableau 9 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission du patient 1 et au niveau de son environnement proche

	Admission	Profil de résistance
	Espèces / site de prélèvement	
Patient 1	<i>E.coli</i> / rectal	Sensible
	<i>Kp</i> / rectal	Sensible
Environnement	<i>Kp</i> / Scope	R : AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	<i>E.coli</i> / Scope	R : AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	<i>E.coli</i> / Surface de la couveuse	R : AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT

E.coli et *Kp* isolées à l'admission du patient 1 ont présenté une sensibilité vis-à-vis des différents antibiotiques testés, alors que les mêmes germes (*E.coli* et *Kp*) isolés de son environnement proche (Scope, Surface de la couveuse) se sont retrouvés multi résistants (Tableau 9).

Tableau 10: Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 2 et au niveau de son environnement proche

	Admission		Sortie	
	Espèces / site de prélèvement	Profil de résistance	Espèces / site de prélèvement	Profil de résistance
Patient 2	<i>E.coli</i> /Rectal	R : AML-AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	<i>Kp</i>	R : AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
Environnement	<i>E.coli</i> / (Surface de la couveuse)	R : AML-AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	<i>Kp</i> / dessous du matelas	R : AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	<i>E.coli</i> / Hublot pivotant	R : AML-AMCCAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	<i>Kp</i> / Scope	R : AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT

A l'admission, une souche d'*E.coli* isolée à partir du patient 2 et de son environnement (surface de la couveuse et hublot pivotant) a présenté le même profil de résistance : AML-AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT (Tableau 10).

Pour le même patient mais cette fois-ci à la sortie du service, une souche de *Kp* isolée au niveau rectal et à partir de son environnement (dessous du matelas et scope) a montré le même profil de résistance : AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT (Tableau 10).

Tableau 11: Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 3 et au niveau de son environnement proche

	Admission		Sortie	
	Espèces / site de prélèvement	Profil de résistance	Espèces / site de prélèvement	Profil de résistance
Patient 3	<i>E.coli</i> / rectal	R : AML-AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	<i>E.coli</i> / rectal	R : AML-AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
			Acinetobacter / rectal	multirésistant à l'IMP.
Environnement	<i>E.coli</i> / Surface	R : AML-AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	<i>E.coli</i> / hublot pivotant	R : AML - CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT.
			<i>E.coli</i> / Scope	R : AML
	-	-	<i>E.coli</i> / Surface	R : AML-AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT.
			<i>E.coli</i> / dessous du matelas	R : AML-AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT.

A l'admission du patient 3 une souche d'*E.coli* a été isolée à partir d'un prélèvement rectal alors qu'au niveau de son environnement nous avons isolé également une souche d'*E.coli* possédant le même profil de résistance.

A la sortie du patient 3 du service, une souche d'*E.coli*, isolée au niveau de trois points de prélèvements de surface, a présenté le même profil de résistance que celui obtenu chez le germe isolé du patient: AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT.

Tableau 12 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission du patient 4 et au niveau de son environnement proche

	Admission	Profil de résistance
	Espèces / site de prélèvement	
Patient 4	<i>E.coli</i> / rectal	R : (AML +SXT)
Environnement	<i>E.coli</i> / dessous du matelas	R : AML-AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT

A l'admission du patient 4, une souche d'*E.coli* isolée à partir de prélèvement rectal, a été trouvée résistante à la SXT et AML. La souche *E.coli* isolée au niveau de son environnement (dessous du matelas), a été observée multi résistante. Les deux isolats ne présentent pas le même profil (Tableau 12).

Tableau 13 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission du patient 5 et au niveau de son environnement proche

	Admission	Profil de résistance
	Espèces / site de prélèvement	
Patient 5	<i>Kp</i> / rectal	CAZ-CTX-KF
Environnement	<i>Kp</i> / surface de la couveuse	CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	<i>Kp</i> / Hublot pivotant	AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT

Les souches *Kp* et *E.coli* isolées à partir du prélèvement rectal chez le patient 5 à l'admission, et celles identifiées au niveau de son environnement proche n'ont pas présenté le même profil de résistance (Tableau 13).

Tableau 14 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission du patient 6 et au niveau de son environnement proche

	Admission	Profil de résistance
	Espèces / site de prélèvement	
Patient 6	<i>E.coli</i> / rectal	(AML)
Environnement	<i>E.coli</i> / surface de la couveuse	AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	<i>E.coli</i> /Scope	AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	<i>E.coli</i> / dessous du matelas	AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	<i>E.coli</i> /Ecran	AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	<i>E.coli</i> / Hublot pivotant	AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT

La souche isolée à partir du nouveau-né à l'admission, était seulement résistante à l'amoxicilline. Les souches d'*E.coli* isolées au niveau des différents points de prélèvements de l'environnement avoisinant (scope, hublot pivotant, dessous du matelas, Ecran) ont présenté le même profil de résistance (Tableau 14).

Tableau 15 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 7 et au niveau de son environnement proche

	Admission	Profil de résistance	Sortie	Profil de résistance
	Espèces / site de prélèvement		Espèces / site de prélèvement	
Patient 7	<i>E.coli</i> / rectal	Sensible à tous les antibiotiques testés	<i>E.coli</i>	Sensible à tous les antibiotiques testés
Environnement	<i>E.coli</i> / Hublot pivotant	AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	Pas d'entérobactéries	-
	<i>E.coli</i> /Ecran	AML	-	-
	<i>E.coli</i> /Surface	AML	-	-
	<i>E.coli</i> / Dessous du matelas	AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	-	-

E.coli isolée à l'admission du patient était sensible à tous les antibiotiques testés, alors qu'il y avait 2 souches d'*E.coli* isolées à partir de l'environnement proche présentant le même profil de résistance AML-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT et deux souches d'*E.coli* qui ont été résistants à l'amoxicilline seulement. En comparant le profil de résistance d'*E.coli* isolée à partir du patient et celle isolée de son environnement proche on ne peut pas dire qu'il s'agit du même profil (Tableau 15).

Tableau 16 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 8 et au niveau de son environnement proche

	Admission	Profil de résistance	Sortie	Profil de résistance
	Espèces / site de prélèvement		Espèces / site de prélèvement	
Patient 8	Pas d'entérobactéries	-	<i>E.coli</i>	AML-AMC-CAZ-CTX-FOX-KF-OFX-CIP-NA
Environnement	Pas d'entérobactéries	-	PN : prélèvement négatif	-

Nous avons noté à l'admission du patient 8 une absence des entérobactéries à partir des prélèvements rectales et même au niveau de l'environnement proche. A la sortie nous avons noté chez le patient 8 la présence d'*E.coli* résistante à AML-AMC-CAZ-CTX-FOX-KF-OFX-CIP-NA alors qu'aucune souche d'entérobactéries n'a été isolée de l'environnement proche (Tableau 16).

Tableau 17 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 9 et au niveau de son environnement proche

	Admission	Profil de résistance	Sortie	Profil de résistance
	Espèces / site de prélèvement		Espèces / site de prélèvement	
Patient 9	Pas d'entérobactéries		<i>K.oxytoca</i>	<i>BLSE</i>
			<i>E.coli</i>	Sensible
Environnement	Pas d'entérobactéries		Pas d'entérobactéries	

A l'admission du patient 9 nous avons noté une absence d'entérobactéries que ça soit à partir du patient ou de son environnement proche.

A la sortie nous avons pu isoler à partir du patient 9 une souche de *K. oxytoca* productrice de bêta-lactamase à spectre élargi et une souche d'*E.coli* qui était sensible à tous les antibiotiques testés. Nous n'avons pas isolé d'entérobactéries au niveau de son environnement (Tableau 17).

Tableau 18 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 10 et au niveau de son environnement proche

	Admission	Profil de résistance	Sortie	Profil de résistance
	Espèces / site de prélèvement		Espèces / site de prélèvement	
Patient 10	<i>Kp</i> /rectal	R : AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	<i>E.coli</i> /rectal	R : AML-AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
Environnement	<i>Kp</i> /dessous du matelas	R : AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	<i>Kp</i> /Ecran	R : AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	<i>Kp</i> /Poignet	R : AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	<i>Kp</i> / Surface de la couveuse	R : AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	<i>Kp</i> /Table	R : AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	-	
	<i>Kp</i> /Ecran	R : AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	-	

A l'admission du patient 10 une souche *Kp* a été isolée à partir d'un prélèvement rectal et au niveau de quatre points de son environnement proche (dessous du matelas, poignet, Table, Ecran) présentant le même profil de résistance AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT.

A la sortie du patient 10, une souche d'*E.coli* a été trouvée, tandis qu'une autre espèce d'entérobactérie *Kp* a été isolée à partir de deux points de surface (Ecran et surface de la couveuse) (Tableau 18).

Tableau 19: Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 11 et au niveau de son environnement proche

	Admission	Profil de résistance	Sortie	Profil de résistance
	Espèces / site de prélèvement		Espèces / site de prélèvement	
Patient 11	pas d'entérobactéries	-	<i>Kp/rectal</i>	R : CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
Environnement	Pas d'entérobactéries	-	<i>Kp</i> (Scope)	R : CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	-	-	<i>Kp</i> (Poignet)	R : CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT

A l'admission du patient 11 nous avons noté une absence des entérobactéries au niveau du prélèvement rectal. A la sortie du patient 11 une souche *Kp* a été isolée au niveau rectal et à partir de deux points de surface (poignet et scope), elles ont montré le même profil de résistance aux antibiotiques (CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT) (Tableau 19).

Tableau 20 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à l'admission et à la sortie du patient 12 et au niveau de son environnement proche

	Admission	Profil de résistance	Sortie	Profil de résistance
	Espèces / site de prélèvement		Espèces / site de prélèvement	
Patient 12	pas d'entérobactéries		<i>Kp/rectal</i>	R : AMC-CAZ-CTX-KF
Environnement	<i>Kp</i> /Surface	AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	<i>Kp</i> / Surface de la couveuse	R: CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	<i>Kp</i> / Poignet	CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT	<i>Kp</i> / Ecran	CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
	-	-	<i>Kp</i> / hublot pivotant	AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT
			<i>Kp</i> / dessous du matelas	AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT

A l'admission et à la sortie du patient 12 nous n'avons pas assisté à une ressemblance entre le profil de résistance des souches isolées au niveau rectal et dans son environnement proche.

Tableau 21 : Comparaison entre les génotypes des bactéries isolées des patients et ceux des bactéries de l'environnement isolées à l'admission.

		Espèce	Gènes de résistance bla				
		bactérienne	<i>bla_{CTXM1}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{CTXM2}</i>	<i>bla_{CTXM9}</i>
Patient	2	<i>E.coli</i>	+	-	-	-	-
Point de	Hp	<i>E.coli</i>	+	-	-	-	-
prélèvement	Surface	<i>E.coli</i>	+	-	+	-	-
Patient	3	<i>E.coli</i>	+	-	-	-	-
Point de	Surface	<i>E.coli</i>	+	+	+	+	-
prélèvement							
Patient	5	<i>Kp</i>	+	-	-	-	-
Point de	Hp	<i>KP</i>	+	+	+	+	-
prélèvement	Surface	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
Patient	10	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
Point de	Ecran	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
prélèvement	Poignet	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
	Table	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-

Nous avons pu détecter à l'admission du patient 2 la présence d'*E.coli* isolée à partir du prélèvement rectal et au niveau de deux points de surface (surface de la couveuse et celle de l'hublot pivotant). Les deux souches d'*E.coli* isolées à partir du nouveau-né et à partir de la surface d'hublot pivotant possèdent seulement le gène *bla_{CTXM1}* alors que l'absence des autres gènes a été remarquée.

Une souche d'*E.coli* a été isolée à partir d'un prélèvement rectal réalisé chez le 3ème patient possédant le gène *bla_{CTXM1}*, or à partir de la surface de sa couveuse nous avons isolée aussi une souche d'*E.coli* qui en plus d'avoir le gène *bla_{CTXM1}*, elle possède les gènes *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}* et *bla_{CTXM2}*.

A partir d'un prélèvement rectal réalisé pour le 5ème nouveau-né, nous avons pu isoler une souche de *Kp* BLSE possédant le gène *bla_{CTXM1}* seulement, cependant au niveau de la surface d'hublot pivotant nous avons isolé une souche *Kp* possédant les 4 gènes *bla_{CTXM1}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTXM2}*, *bla_{SHV}*. A part l'absence du gène *bla_{CTXM2}*, la souche *Kp* isolée à partir de la surface de la couveuse partage le même caractère que celle isolée au niveau d'hublot pivotant.

La souche de *Kp* isolée à partir d'un prélèvement rectal réalisé chez le 10ème patient possède trois gènes : *bla_{CTXM1}*, *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}*, ces derniers ont été détectés aussi chez *Kp* isolée à partir de l'environnement proche de ce patient (poignet, surface, dessous du matelas) (Tableau 21).

Tableau 22 : Comparaison entre les génotypes des bactéries isolées des patients et ceux des bactéries isolées de l'environnement proche à la sortie

		Espèce	Gènes de résistance bla				
		bactérienne	<i>bla_{CTXM1}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{CTXM2}</i>	<i>bla_{CTXM9}</i>
Patient	2	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
Point de	Scope et	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
prélèvement	dessous	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
	du						
	matelas						
Patient	3	<i>E.coli</i>	+	-	+	-	-
Point de	DM	<i>E.coli</i>	+	-	+	-	-
prélèvement	Surface	<i>E.coli</i>	+	-	+	-	-
Patient	11	<i>Kp</i>	+	-	-	-	-
Point de	Scope	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
prélèvement	Poignet	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
Patient	12	<i>Kp</i>	+	-	-	-	-
	Ecran	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
Point de	Hp	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
prélèvement	M	<i>Kp</i>	+	+	+	-	-
	Surface	<i>Kp</i>	+	+	-	-	-

Après 4 jours d'hospitalisation une souche de *Kp* a été isolée à partir d'un prélèvement rectal du 2ème nouveau-né possédant les gènes : *bla_{CTXM1}*, *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}*. Ce profil est identique par rapport à celui observé chez *Kp* isolée au niveau de deux points avoisinant ce patient.

A la sortie du 3ème patient une *Kp* productrice de bêta-lactamases type SHV et CTXM1 a été isolée à partir d'un prélèvement rectal réalisé pour ce patient et à partir de deux points de surface (dessous du matelas, surface de la couveuse).

La présence du gène *bla_{CTXM1}* a été détecté au niveau d'une souche *Kp* isolée à partir d'un prélèvement rectal réalisé pour le 11 ème patient, le même gène a été observé pour les souches *Kp* isolées à partir des prélèvements de deux points (Scope et poignet). Pourtant deux autres gènes ont été détectés (*bla_{TEM}* et *bla_{SHV}*).

La présence du gène *bla_{CTXM1}* seul a été détectée au niveau d'une souche *Kp* isolée à partir d'un prélèvement rectal réalisé pour le 12 ème patient à sa sortie, en plus du gène *bla_{CTXM1}*, les gènes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* ont été détecté au niveau des souches de *Kp* isolées au niveau des différents points de surface (Tableau 22).

DISCUSSION

DISCUSSION

De nombreuses études ont montré que les surfaces des hôpitaux sont fréquemment contaminées par une variété d'organismes pathogènes et non pathogènes. Les mains et les gants du personnel de santé sont facilement susceptibles d'acquérir des agents pathogènes après le contact avec des surfaces contaminées à l'hôpital qui seront par la suite transmis aux patients.

Dans ce travail, nous avons isolé à partir des prélèvements rectaux réalisées sur 12 nouveau-nés au premier jour de leur hospitalisation et à la sortie (sachant que parmi ces 12 nouveau-nés 4 ont décédé) : 12 isolats d'*E.coli*, 6 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Acinetobacter baumannii*, 3 *Pseudomonas aeruginosa* et un isolat de *Klebsiella oxytoca*. Ces isolats étaient résistants aux antibiotiques avec 66,6% pour *E. coli* dont 50% étaient BLSE. Quarante-trois pour cent des *K. pneumoniae* étaient résistantes à au moins un antibiotique et toutes les souches étaient productrices de BLSE, les 2 isolats d'*A. baumannii* étaient multirésistants y compris à la ceftazidime et l'imipenem.

En parallèle, des prélèvements de l'environnement proche de chaque nouveau-né (surface) ont été aussi réalisées et nous avons isolé : 40 souches de Staphylocoque coagulase négatif SCN, 3 de *S. aureus*, 38 *Klebsiella pneumoniae*, 25 *Escherichia coli*, 4 *Raoultella terrigena* et 27 isolats de *Pseudomonas aeruginosa*. Toutes ces entérobactéries ont également affiché un fort taux de résistance aux antibiotiques et notamment la résistance BLSE, 88% des *E. coli* sont BLSE et 100% des *K. pneumoniae* étaient BLSE.

Les bactéries multi-résistances (BMR) sont des indicateurs de qualité qui représentent un risque de transmission et d'acquisition aux patients. Et bien que l'acquisition ou le portage n'est pas un synonyme d'infection nosocomiale, mais ceci ne dispense pas des mesures strictes d'hygiène vis-à-vis du personnel hospitalier. De plus, les agents pathogènes humains communs de l'hôpital peuvent survivre pour de longues périodes sur les surfaces des hôpitaux qui représentent des objets inanimés pouvant potentiellement transmettre des organismes infectieux aux patients. Le taux de résistance des entérobactéries ne cesse d'augmenter dans les hôpitaux d'où la nécessité d'établir des mesures préventives et de limiter la dissémination de ces souches aussi bien au sein de l'hôpital que dans la communauté (Mkour et al., 2008).

Dans notre étude, les SCN sont les microorganismes les plus souvent isolés à partir des patients et de leur environnement proche ce qui a été rapporté dans d'autres études (Lemmen et al. 2004). Ils ont montré que le degré de contamination par les bactéries Gram positifs multi-

résistantes était beaucoup plus élevé par rapport aux bactéries Gram négatifs multi-résistantes. La présence élevée de ces bactéries issues de la flore cutanée humaine témoigne d'une déficience générale des mesures d'hygiène hospitalières. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline représente un agent infectieux dans la survenue des infections nosocomiales, ce germe a été retrouvé dans plusieurs études, Ahoyo. (2006), Javidnia et al., (2013). Nos isolats de *S. aureus* ont été résistants uniquement à la pénicilline G.

De nombreuses études ont rapporté que *Klebsiella pneumoniae* est connue comme étant l'une des causes des épidémies les plus fréquentes dans des unités de soins intensifs néonatales. (Skogberg et al., 2008) elle peut facilement survivre dans les hôpitaux et de se reproduire sur les surfaces hospitaliers (Fatima Khan et al., 2015). Alors que ces bactéries représentaient auparavant un problème essentiellement limité aux hôpitaux de soins aigus et aux établissements de long séjour, on assiste actuellement à un changement important de l'épidémiologie des bactéries productrices de BLSE avec un déplacement du réservoir nosocomial vers un réservoir communautaire.

E. coli a été l'espèce majoritaire et la plus résistante aux antibiotiques dans notre étude. Il a été rapporté que le profil épidémiologique aussi bien pour les entérobactéries nosocomiales (65%) que communautaires (80%) est dominé par *E. coli* (Lahlou Amine et al., 2009).

P. aeruginosa bactérie environnementale par excellence est le troisième germe pathogène responsable d'infections nosocomiales après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, (Lashéras et al., 2006). La transmission croisée manuportée de *P. aeruginosa* a été rapporté dans plusieurs études (Lashéras et al., 2006). Dans notre étude, nous avons isolé cette bactérie chez les nouveau-nés et sur les surfaces.

Dans cette étude, un autre type de bactérie a été isolée à partir des surfaces, il s'agit de *Raoultella terrigena* (précédemment connu sous le nom de *Klebsiella terrigena*) est une bactérie gram-négative rarement rencontré et principalement signalé comme organisme tellurique et aquatiques (Murray et al., 2005). L'antibiogramme de nos isolats n'a pas été réalisé, mais des études très limitées ont été effectuées sur la sensibilité de *R. terrigena* aux agents antimicrobiens, mais cette bactérie possède une bêta-lactamase chromosomique qui rend cet agent naturellement résistantes à plusieurs agents antimicrobiens (Shaikh et al., 2011)

Deux *A. baumannii* ont été isolés en portage intestinal dans ce travail, et les 2 isolats ont été multirésistants y compris à la ceftazidime et l'imipenem. Les *A. baumannii* résistantes représentent 2 à 4% des bactéries responsables d'IN (ANDEM, 1996). Elles jouent un rôle croissant dans les IN dans certains secteurs hospitaliers (unité de soins intensifs) et sont souvent à l'origine de bouffées épidémiques dans lesquelles est impliquée la forte

contamination de l'environnement des patients porteurs. Certaines souches épidémiques résistantes à l'imipénème conduisent à des impasses thérapeutiques.

L'émergence et la diffusion des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu qualifié « BMR », pose un problème thérapeutique crucial pour les patients et aggrave le pronostic de leur pathologie, ce sont les germes les plus retrouvées en présentant une haute résistance pour les antibiotiques testés. Leur incidence a nettement augmenté ces dernières années. Néanmoins les EBLSE ont été retrouvées avec des pourcentages importants en chine, en Afrique du Sud et Singapour (Hirakata et *al.*, 2005) et le Maroc n'est pas épargné par ce problème. Un taux de 55% d'EBLSE a été enregistré dans une étude réalisée au niveau du service de Néonatalogie et de réanimation néonatale du CHU de Fès (Arhoune et *al.* 2015).

L'épidémiologie mondiale des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) a évolué ces dernières années, avec l'émergence récente, en particulier chez *Escherichia coli*, de nouveaux types de BLSE, dits CTX-M particulièrement CTX-M1. En effet dans notre étude, 81,6% des entérobactéries analysées possèdent le gène CTX-M1. Les SHV et TEM ont été retrouvé chez 68,3% des isolats et le CTX-M9 n'a pas été détecté chez aucune des entérobactéries analysées. Les gènes codant pour les BLSE peuvent provenir d'une mutation de gènes plasmidiques codant pour les bêta-lactamases classiques de type TEM ou SHV ou mobilisation à partir de bactéries saprophytes qui les hébergent de manière naturelle. Ce qui en résulte une propagation de ces gènes par transmission, soit à travers des éléments mobiles qui les portent (plasmides, transposons..), soit par les souches elles-mêmes. La propagation des gènes codant pour les BLSE chez l'homme provient de la transmission interhumaine, ou d'une transmission croisée entre l'environnement et l'homme (Hissri., 2013).

La transmission des BMR à partir des patients porteurs est, dans la majorité des cas, manuportée par le personnel médical ou paramédical. Cependant, la transmission peut se faire par des supports inertes contaminés (stéthoscopes ou brassards à tension, thermomètres ...). Le risque de transmission est directement lié à la fréquence des contacts avec les patients porteurs de BMR. Des travaux récents suggèrent qu'une charge en soins élevée dans l'unité (patients dépendants...) et/ou un ratio inadéquat personnel/patients admis joueraient un rôle important dans la transmission des BMR, alors qu'une organisation adaptée permettrait de contrôler des situations épidémiques.

L'étude de comparaison entre les espèces bactériennes isolées chez les patients et leur environnement, ainsi que leurs déterminants phénotypiques et génotypiques de la résistance aux antimicrobiens a mis en évidence un certain nombre de similitude entre les isolats, ce qui

suggère une clonalité entre les souches. Ceci devrait être complété par une analyse par Electrophorèse au Champs Pulsée ECP qui reste la technique de premier choix, et qui est considérée comme l'étalon-or des méthodes de typage moléculaire.

Ainsi, pour le patient n°2, une souche d'*E.coli* isolée en portage intestinal et celle isolée à partir d'un point de surface (Hublot pivotant) présentent le même profil de résistance, et le même génotype (présence du gène *bla_{CTXM1}* et absence des autres gènes).

A la sortie de ce patient nous avons pu remarquer la présence de *K. pneumoniae* isolée que ça soit à partir du prélèvement rectal ou à partir de deux points de surface (dessous du matelas et scope) présentant le même profil de résistance (AMC-CAZ-CTX-KF-OFX-CIP-NA-SXT) et le même génotype : 3 gènes de résistance *bla_{SHV}* *bla_{TEM}* *bla_{CTXM1}*. Ce qui suggère une clonalité entre les souches.

A la sortie du patient n°3, une souche d'*E. coli* isolée à partir du nouveau-né et à partir de deux points de surface (surface et dessous du matelas) présentent le même profil de résistance, et possédant le même génotype : *bla_{CTXM1}* et *bla_{SHV}*. Ce qui suggère une transmission croisée qui a été établit entre l'environnement et le patient.

De même, à l'admission du patient n°10, *Kp* isolée à partir du nouveau-né et à partir de trois points de surface (Ecran, poignet, table) présentent le même profil de résistance, et possèdent le même génotype : *bla_{CTXM1}*, *bla_{SHV}* et *bla_{TEM}*.

Comme pour les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), le contrôle de la dissémination des entérobactéries résistantes aux antibiotiques peut se faire à travers le renforcement des mesures d'hygiène notamment la prévention de la transmission croisée; prévention de la dissémination des bactéries elles-mêmes et de leurs gènes de résistance par le contrôle des excréta, l'isolement géographique et technique des patients colonisés et/ou infectés (Doit et *al.*, 2010). Ces éléments contribueraient certainement à la réduction de la transmission intrahospitalière.

CONCLUSION

Au terme de ce travail, les résultats des analyses microbiologiques ont révélé la présence de différentes espèces d'entérobactéries isolées en portage intestinal chez des nouveau-nés. Ces bactéries ont été représentées en majorité par *E. coli* BLSE. De même, 89% des entérobactéries isolées à partir des différents points de surfaces sont productrices de BLSE. *K.pneumonie* BLSE était l'espèce dominante dans l'environnement proche et présentant une fréquence élevée de résistance aux quinolones, sulfaméthoxazole et fosfomycine.

L'étude génotypique de tous les isolats BLSE a montré que Le gène *bla_{CTXM1}* était le plus trouvé que ça soit au niveau des écouvillons rectaux des patients ou de leur environnement immédiat. La détection de deux gènes *bla_{SHV}* et *bla_{TEM}* était un peu remarquable, alors qu'aucune souche n'a présenté le gène *bla_{CTXM9}*.

La comparaison des bactéries isolées en portage chez les nouveau-nés avec celles isolées à partir leur environnement proche, ainsi que leurs déterminants phénotypiques et génotypiques de la résistance aux antibiotiques a permis de mettre en évidence une clonalité entre certaines bactéries ce qui laisse supposer une transmission croisée entre les bactéries du patient et de son environnement. Ces résultats devraient être complété par une étude de typage moléculaire et notamment l'ECP qui reste la technique de premier choix, et qui est considérée comme l'étalon-or des méthodes de typage moléculaire

Des mesures de prévention de l'émergence et la transmission des BMR particulièrement doivent absolument se concrétiser dans les hôpitaux et qui passent principalement par le renforcement des mesures d'hygiène dans les établissements de santé et notamment la prévention de la transmission croisée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agence Nationale pour le Développement de l'Évaluation Médicale (ANDEM). Le bon usage des antibiotiques à l'hôpital. Août 1996.

Ahoyo AT., Baba-Moussa L., Makoutode M., Gbohoun A., Bossou R., Dramane K., Sannia A., Prévost G. (2006). Incidence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline dans le service de néonatalogie du centre hospitalier départemental du zou et des collines au Bénin. Archives de pédiatrie 13; 1391 – 1396.

Ahoyo AT., Baba-Moussa L., Anago AE., Avogbe P., Missihoun TD., Loko F., Prévost G., Sanni A. et Dramane K. (2007). Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de β -lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. Médecine et maladies infectieuses 37 ; 746-752.

Aujard Y., Bedu A., Bingen E., Bonacorsi S. (1995). Infections Nosocomiales en pédiatrie. Med Mal Infect 25 ; 36-43.

Anneard DI. 1968. The effect of T on resistance of *Staphylococcus aureus* to methicillin and some other antibiotics. Med. J .Aust . 1 : 444 -446.

Arhoune B., Oumokhtar B., Barguigua D., Timinouni M., Hmami F., Bouharrou A. (2015). Caractérisation moléculaire des Entérobactéries BLSE isolées au service de néonatalogie et de réanimation néonatale au CHU de Fès, communication orale à la 6^{ème} journée de la SMAMM.

Barbut F., Denis Neyme. (2006). Les difficultés d'interprétation des contrôles microbiologiques environnementaux. Revue Francophone des Laboratoires N° 382 ; 27- 32

BarkerJ ., Vipond IB ., Bloomfield SF. (2004). Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. J Hosp Infect 58:42–49.

Ben Jaballah N., Bouziri A., Kchaou W., Hamdi A., Mnif K., Belhadj S., Khaldi A., Kazdaghli K. (2006). Epidémiologie des infections bactériennes nosocomiales dans une unité de réanimation néonatale et pédiatrique tunisienne. Médecine et maladies infectieuses 36; 379–385.

Bertranda X., Céline Slekoveca., Pascal Cholleya., Daniel Talona. (2011) Épidémiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Revue francophone des laboratoires 35-40.

Brun-Buisson, C ; Girou, E. (2000). Les infections nosocomiales : bilan et perspectives., Med Sci (Paris), , Vol. 16, N° 8-9; p.892-9

Clemont –Ferrand. (1994). Service d'hygiène hospitalière.

Carrer A., Nordmann P. (2011). *Klebsiella pneumoniae* CTX-M-15 : vers une modification de l'épidémiologie des β -lactamases à spectre étendu. Pathologie Biologie 59 ; 133–135.

Cheesbrough J., Green J., Gallimore C., Wright P., Brown D. (2000). Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiology and Infection* 125 ; 93–98.

Durocher A., Hajjar J., Hugonnet S. (2002). Prévention de la transmission des micro-organismes en réanimation. Indicateurs et modalités de surveillance. *Réanimation* 11 ; 288-301.

Dubouix A., Marty N. (2004). Détection des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu par biologie moléculaire : avantages, limites. *Antibiotiques* 6 ; 193-201.

Doit C., Mariani-Kurkdjian P., Bingen E. (2010). Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu. *Archives de Pédiatrie* 17 ; 140 -144.

Efird MM., Rojas MA., Lozano JM., Bose CL., Rojas MX., Rondon MA. (2005). Epidemiology of nosocomial infections in selected neonatal intensive care units in Colombia. South America. *J Perinatol* 25 ; 531–536.

Elhamzaoui S., Benouda A., Allali F., Abouqual R., Elouennass M. (2009). Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylocoques aureus* isolées dans deux hôpitaux universitaires à Rabat, Maroc. *Médecine et maladies infectieuses* 39 ; 891–895.

Fatima Khan., Naushaba Siddiqui., Asfia Sultan., Meher Rizvi., Shaad Abqari., Indu Shukla., Haris M.Khan., Hiba Sami., Mahtab. (2015). *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* Special Issue-1: 81-87.

Fournel., Soulias M., Bour JB., Gouyon JB., Huet F., Aho LS. (2010). Evolution du nombre d'infections à Rotavirus et à virus respiratoire syncytial chez les enfants hospitalisés au CHU de Dijon entre 1998 et 2005. *Pathologie Biologie* 58 ; 406–414.

Gayvallet Montredon N., Sauvestre C., Bergeret M., Gendrel D., Raymond J. (2002). Bactériémies nosocomiales en pédiatrie. *Arch Pédiatr* 7 ; 679-684.

Gangoue Joseph pieboji. (2007). Caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales.

Gouyon J., FRANCOIS C., Petion A., Pothier P. (1989). Les infections nosocomiales virales en pédiatrie. *Médecine et maladies infectieuses* 10 bis - 503 – 507.

Guibert Michèle., Claire Boithias. (1999). Infections nosocomiales néonatales 2 ; 95 -103.

Habzi A., Benomar S. (2001). Les infections nosocomiales néonatales. *Pédiatr Puériculture* 14 ; 419-424.

Hissri Salam. 2014. Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases.thèse de doctorat.

Hirakata T., Junichi Matsuda., Yoshitsugu Miyazaki., Shimeru Kamihira., Sayoko Kawakami., Yukihisa Miyazawa., Yasuo Onod., Nobuhiko Nakazaki., Yasuyoshi Hirata., Matsuhisa Inoue., John D. Turnidge., Jan M. Bell., Ronald N. Jones., Shigeru Kohnob. (2005). Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998–2002). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 52 323–329.

Javidnia S., Malihe Talebi., Mahnaz Saifi., Mohammad Katouli., Abdolaziz Rastegar Lari., Mohammad R. Pourshafie. (2013). Clonal dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients and the hospital environment *International Journal of Infectious Diseases* 17 ; e691–e695.

John M. Boyce. (2007). Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection *Journal of Hospital Infection* 65(S2) 50–54

Lachassinne E., Letamendia-Richard E., Gaudelus J. (2004). Epidémiologie des infections nosocomiales en néonatalogie. *Archives de pédiatrie* 11 ; 229–233.

Labie D. (2005). Le scandale des quatre millions de morts néonatales chaque année bilan et actions possibles. *Médecine Sciences* 21 ; 768–771.

Lahsoun M., Boutayeb H., Zerouali K., Belabbes H., El Mdaghri. (2007). Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* dans un CHU marocain. *Médecine et maladies infectieuses* 37 ; 828–831.

Lahlou Amine., Chegri M., L’Kassmi H., (2009). Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d’infections urinaires à l’hôpital militaire Moulay-Ismail de Meknès. *Antibiotiques* 11 ; 90—96.

Lacey S., Flaxman D., Scales J., Wilson A. (2001). The usefulness of masks in preventing transient carriage of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by healthcare workers. *J Hosp Infect* 48 ; 308–311.

Lashéras. A., O. Guisset., H. Boulestreau., A.-M. Rogues., M. Fiore., S. Szajner., M.-C. Bezian., C. Gabinskib., J.-P. Gachie. (2006). Réservoirs et transmission de *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation médicale. *Médecine et maladies infectieuses* 36 99–104.

Lemmen SW., Hafner H., Zolldann D., Stanzel S., Lutticken R. (2004). Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *Journal of Hospital Infection* 56, 191–197

MARKS P., VIPOND I., Carlisles D., Denkin D., Fey R., Caul E. (2000). Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiology and Infection* 124 ; 481–487.

Mkaouar D., F. Mahjoubi., S. Mezghani., A. Znazen., S. Ktari., A. Hammami. (2008). Étude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999–2005) *Médecine et maladies infectieuses* 38 ; 293–298.

Muhammad Shaikh M. & Morgan M. 2011 Sepsis caused by *Raoultella terrigena*. JRSM Open; 2011 vol. 2 no.649).

Murray P, Holmes B, Auken H. 2005. Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, and other Enterobacteriaceae. In: Borriello P, Patrick R, Funke G, eds. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Volume 2. 10th edn. London: Hodder Arnold;:1474–507

Nejjari N., Benomar S., Lahbabi MS. (2000). Infections nosocomiales en réanimation néonatale et pédiatrique. Intérêt de la ciprofloxacine. Arch Pédiatr 7 ; 1268-1273.

Novick., Murphy E., Crygzan TJ., Baron E., Edlman I. (1979). Penicillinase plasmid of *Staphylococcus aureus* : restriction deletion maps. Plasmid 2 ; 109-129.

Quinet B., Mitanchez D., Salauze B., Carbonne A., Bingen E., Fournier S., Moissen et D.,Vu-Thien H. (2010). Description et investigation d'une épidémie nosocomiale de colonisations et d'infections à *Escherichia coli* producteur d'une bêta-lactamase à spectre étendu dans un service de néonatalogie. Archives de Pédiatrie 17 ; 145-149.

Rutala WA., Weber DJ. (1997). Water as a reservoir of nosocomial pathogens. Infect Control Hosp Epidemiol 18 ; 609-616.

Services du Ministère de la Santé. (2005). Infections nosocomiales. Médecine et droit 70 ; 15-22.

Simmons G., Greening G., Gao W. (2001). Raw oyster consumption and outbreaks of viral gastroenteritis in New Zealand: evidence for risk to the public's health. Australian and New Zealand. Journal of Public Health 25 ; 34–40.

Squinazi F. (2006). Analyses en microbiologie - Environnement microbien (air, surfaces, eau).

Wendt C., Wiesenthal B., Dietz E., Ruden H. (1998). Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. J ClinMicrobiol 36 ; 3734-3736.

Wilcox MH. (2003). *Clostridium difficile* infection and pseudomembranous colitis Best Practice and Research Clinical Gastroenterology .17 ; 475–493

ANNEXES

Milieu Hajna kligler : (Oxoid)

Extrait de viande de bœuf	3.00
Extrait de levure.....	3.00
Peptone (riche en lysine).....	20.00
NaCl.....	5.00
Citrate ferrique.....	0.30
Thiosulfate de sodium.....	0.30
Lactose	10.0
Glucose	1.00
Rouge de phénol (solution à 1%).....	5 ml
Agar	12.00

Milieu Citrate de Simmons : (Oxoid)

Sulfate de magnésium.....	0.20
Citrate de Na	2.00
NaCl.....	5.00
Hydrogénophosphate d'ammonium.....	0.20
Hydrogénophosphate d'ammonium monosodique	0.80
Bleu de Bromothymol.....	0.08
Agar.....	15.0

Milieu Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	2 g
Hydrolysate de caséine	17.5 g
Amidon	1.5 g
Agar.....	13 g

EMB (gélose)

Peptone.....10 g
Lactose.....10 g
Eosine.....0.4 g
Bleu de méthylène.....0,0625 g
Hydrogénophosphate de potassium..... 2 g
Agar 15 g
PH = 6,8

Gélose Chapman

Peptone..... 10
Extrait de viande de bœuf..... 1
Chlorure de sodium..... 75
Mannitol..... 10
Rouge de phénol..... 0.025
Agar-Agar..... 15

Composition TBE (10X) pour 1L d'eau distillée :

Constituants du TBE	Concentration
Tris base 108g	890 mM
EDTA 9.3g	20 mM
Acide borique 55g	890mM

Données socio-démographiques des patients hospitalisés au service de néonatalogie :

	Sexe	Date d'admission	Date de sortie	L'âge a l'admission (jours)	Date du prélèvement d'entrée	Date du prélèvement de sortie SSP	Age gestationnel	Motifs d'hospitalisation
Patient 1	M	02/03/2015	04/03/2015	3	03/03/2015		AT	Ictère
Patient 2	M	04/03/2015	12/03/2015	1	04/03/2015	07/03/2015	34	PM+DR
Patient 3	M	04/03/2015	12/03/2015	1	04/03/2015	07/03/2015	34	PM+DR
Patient 4	M	04/03/2015	04/03/2015	1	04/03/2015	SSP	AT	DR
Patient 5	M	04/03/2015	05/03/2015	18	04/03/2015	SSP	32	PM+DR
Patient 6	F	19/03/2015	21/03/2015	0	19/03/2015	SSP	28	PM+DR
Patient 7	F	23/03/2015	01/04/2015	5	23/03/2015	26/03/2015	AT	Dénutrition
Patient 8	M	30/03/2015	17/04/2015	0	30/03/2015	03/04/2015	AT	Souffrance
Patient 9	F	30/03/2015	06/04/2015	0	31/03/2015	03/04/2015	28	PM+DR
Patient 10	M	13/04/2015	01/06/2015	0	13/04/2015	17/04/2015	33	PM+DR
Patient 11	M	14/04/2015	20/04/2015	0	14/04/2015	17/04/2015	AT	DR+ Souffrance
Patient 12	F	15/04/2015	20/04/2015	0	16/04/2015	20/04/2015	AT	Ictère

SSP : sortie sans prélèvements ; AT : a terme ; DR : detresse respiratoire ; PM : prématurité.

FICHE D'EXPLOITATION

Ecologie bactérienne du service de néonatalogie

N° de prélèvement.....

N° de lit.....

IP Patient.....

Date de prélèvement à l'entrée

Prélèvements de:

1-Nouveau-nés

- Couveuse

- Matelas ☐ Hublot pivotant ☐ surface ☐ Tiroir à couveuse ☐
Ecran ☐ Scope ☐ Table ☐

Date de prélèvement à la sortie

Prélèvements de :

1-Nouveau-nés

- Couveuse :

- Matelas ☐ Hublot pivotant ☐ surface ☐ Tiroir à couveuse
Ecran ☐ Scope ☐ Table ☐

Résultat :

Bactéries identifiées :.....

.....

Profil de résistance:.....

.....