Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences Dhar El Mahraz- Fès
Centre d'Etudes Doctorales
"Sciences et Technologies"

Formation Doctorale : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologies

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie et Biologie Moléculaire

Laboratoires :

Biotechnologie-Faculté des Sciences Dhar el Mahraz Fès

Microbiologie et Biologie Moléculaire-Faculté de Médecine et de Pharmacie Fès

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mme ARHOUNE Btissam

Etude de l'acquisition de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques chez des nouveau-nés hospitalisés au CHU Hassan II de Fès

Soutenue le 07/12/2019

devant le jury :

Pr. REMMAL Adnane	***Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès***	***Président***
Pr. LOUZI Lhoussain	***Faculté de Médecine et de Pharmacie- Rabat***	***Rapporteur***
Pr. ATMANI Samir	***Faculté de Médecine et de Pharmacie - Fès***	***Rapporteur***
Pr. RHAZI FILALI Fouzia	***Faculté des Sciences - Meknès***	***Rapporteur***
Pr. HMAMI Fouzia	***Faculté de Médecine et de Pharmacie - Fès***	***Examinatrice***
Pr. EL FAKIR Samira	***Faculté de Médecine et de Pharmacie - Fès***	***Examinatrice***
Pr. OUMOKHTAR Bouchra	***Faculté de Médecine et de Pharmacie - Fès***	***Co-encadrante***
Pr. CHAMI Fouzia	***Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès***	***Directrice de thèse***

Année universitaire : 2019-2020

Dédicaces

A la mémoire de mon très cher père qui vient de nous quitter

Je dédie ce travail comme preuve de reconnaissance de tout ce que tu as fait pour moi. Que Dieu puisse t'avoir en sa sainte miséricorde!

A ma très chère mère

Qui a été pour moi un modèle et n'a cessée de m'encourager. Tes prières et tes sacrifices m'ont comblés tout au long de mon existence et je ne saurais exprimer la gratitude que je te porte. Puisse Dieu tout puissant te protéger, te procurer longue vie et santé afin que je puisse te rendre ne serait-ce qu'une partie de ce que tu m'as procuré.

A mon mari

Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à mon cher époux Badr. Sa patience, son réconfort et son affectueux soutien tout au long de ce travail m'ont été d'une très grande aide.

A mes enfants Chams et Amine

Vous êtes mon plus beau cadeau, je vous aime et je vous dédie ce travail et je vous remercie pour votre patience.

A mes sœurs et à mon frère

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.

A mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines

Puisse Dieu vous procurer bonheur et prospérité. Qu'il nous unissent pour toujours.

Remerciements

C'est pour moi un réel plaisir de remercier toutes les personnes qui m'ont d'une manière ou d'une autre, permis, par leur collaboration, leur soutien et leur avis judicieux, de mener à bien ce travail.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements au Pr. CHAMI Fouzia, ma Directrice de thèse, pour son aide inestimable, sa grande expérience et pour les corrections apportés aux articles et au manuscrit.

J'aimerais tout particulièrement remercier Pr. OUMOKHTAR Bouchra qui m'a encadrée et guidée pour la réalisation de ce travail, pour ses conseils, sa très grande disponibilité et son appui constant et permanent durant les six années de thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma respectueuse considération et ma profonde admiration pour ses qualités scientifiques et humaines.

Je suis également reconnaissante au Pr Adnane REMMAL d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse et d'apporter ses suggestions et ses remarques afin d'améliorer la qualité de ce travail, ainsi que pour ses conseils avisés et l'aide apportée dans sa valorisation.

J'exprime mes profonds remerciements à Pr. LOUZI Lhoussain, Pr. ATMANI Samir et Pr. RHAZI FILALI Fouzia qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que pour le temps qu'ils ont accordé à la lecture de ce travail. J'en suis honorée, et je vous exprime ma profonde reconnaissance.

J'adresse mes vifs remerciements à Madame le Pr. Fouzia HMAMI pour son aide et ses conseils durant la collecte des données et des prélèvements dans le service, et de bien vouloir examiner ce travail.

Je remercie vivement Pr. EL FAKIR Samira du Laboratoire d'Epidémiologie, Recherche Clinique et Santé communautaire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, qui m'a fait profiter de son expertise en bio-statistique, ses commentaires, ses suggestions. Vous me faite grand honneur en acceptant de juger cette thèse.

J'adresse toute ma gratitude à Monsieur le Professeur BOUHARROU Abdelhak pour son accueil chaleureux et des sentiments de bienveillance dont il a fait preuve à mon égard, pour le recrutement des patients, ainsi que son inestimable collaboration sans lesquels cette étude n'aurait pu être menée à bien.

Je remercie également l'équipe de l'institut Pasteur du Maroc de Casablanca (unité de bactériologie médicale) pour la réalisation des expériences de conjugaison bactérienne et de clonalité de certains isolats, notamment Monsieur le Dr. Mohammed TIMINOUNI et Monsieur le Pr. Abouddihaj BARGUIGUA. Je leur exprime ma gratitude pour son aide.

J'adresse toute ma gratitude à Monsieur le Pr. Patrice NORDMANN de la Faculté des sciences et de Médecine de Fribourg, Suisse, de m'avoir accordé un stage dans son unité de bactériologie médicale et aussi de m'avoir fourni certaines souches de références.

Je tiens à remercier Pr. BENNANI Bahia du Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire de la Faculté de Médecine et de pharmacie de Fès pour ses encouragements dès mon premier jour au laboratoire.

Je remercie vivement et chaleureusement mes collègues et mes amis docteurs et doctorants du Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire de la FMPF : Oualid, Kaoutar, Sara, Salma, Abdelhamid, Safae, Mounia, Ghita et Coumba pour leur sincère amitié, leur soutien, leur présence et leur sens de l'humour dans les moments partagés. Je leur souhaite beaucoup de succès.

Résumé

Introduction : En réanimation néonatale, les nouveau-nés sont exposés à de nombreux réservoirs potentiels à l'origine de leur colonisation par des bactéries multi-résistantes (BMR). La colonisation par ces BMR d'origine exogène ou endogène constitue une étape préalable à la survenue d'infections chez ces NN souvent immunodéprimés bénéficiant le plus souvent de procédures invasives. L'objectif principal de ce travail est l'étude de la colonisation nosocomiale par des BMR chez des nouveau-nés (NN) en cours de leur hospitalisation dans le service de néonatologie et de réanimation néonatale (SNRN).

Matériel et méthodes : Il s'agit d'une étude prospective réalisée dans le SNRN du CHU Hassan II de Fès étalée sur 5 années (de 2013 à 2018). Tous les NN hospitalisés ont fait l'objet d'un écouvillonnage rectal et nasal à l'admission et un deuxième en cours d'hospitalisation. Des prélèvements de surfaces hospitalières et de dispositifs médicaux ont été réalisés en parallèle. L'identification bactérienne et les antibiogrammes ont été réalisés selon les recommandations internationales. Les gènes de résistances codant pour des β-lactamases (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}2}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}9}$, *bla*$_{MOX}$, *bla*$_{ACC}$, *bla*$_{DHA}$, *bla*$_{FOX}$, *bla*$_{EBC}$, *bla*$_{CIT}$, *bla*$_{OXA\text{-}48}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{OXA\text{-}51}$, *bla*$_{OXA\text{-}58}$, *bla*$_{OXA\text{-}23}$, *bla*$_{OXA\text{-}24}$) ont été recherchés par PCR et confirmés par séquençage. Les transferts génétiques des plasmides ont été réalisés par la conjugaison bactérienne. La clonalité des isolats a été étudiée par électrophorèse en champs pulsé et l'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS V20.

Résultats : À l'admission, 455 NN ont été dépistés. La médiane d'âge de ces NN a été de 1 jour avec un étendu de 147 jours et leur poids moyen a été de 2612±1023 grammes. 22% NN se sont avérés colonisés par une *Entérobactérie* sécrétrice de BLSE (E-BLSE), 8,7% par une *Entérobactérie* sécrétrice de carbapénèmase (EPC), 10,1% par une *Entérobactérie* sécrétrice de céphalosporinases (E-CASE) et 9,9% par un *A. baumannii* multi-résistant (AMR). **En cours d'hospitalisation**, 301 NN ont été inclus dans l'étude d'acquisition. 59,4% des NN ont acquis une E-BLSE durant leur séjour, 12,5 ; 33,3 et 13,7% ont acquis respectivement une EPC, une E-CASE et un AMR. Le gène *bla*$_{CTXM\text{-}15}$ a été le plus fréquemment détecté (81,2%) chez les E-BLSE. Tandis que tous EPC ont exprimé exclusivement le gène *bla*$_{oxa\text{-}48}$. En outre, les isolats d'*A. baumannii* productrices de carbapénèmases hébergeaient les gènes *bla*$_{OXA\text{-}51}$ et *bla*$_{OXA\text{-}23}$. Les expériences de conjugaison ont montré que certains gènes *codant* des β-lactamases sont transférables entres bactéries et sont portés par un plasmide conjugatif de haut poids moléculaire (~ 125 kb). L'étude de la relation épidémiologique entre les *K. pneumoniae* testés a montré une forte diffusion clonale dans le service étudié.

Plusieurs facteurs de risque ont été significativement associés à la colonisation par des BMR à l'admission notamment l'âge, la naissance ou non à la maternité du CHU ainsi que la provenance de la maternité (p <0,001). Durant l'hospitalisation, une durée du séjour supérieur à 3 jours ainsi que la détresse respiratoire ont été identifiées comme facteurs de risque d'acquisition de ces BMR (OR, 0,202 ; IC à 95%, 0,063 à 0,650 ; P = 0,007 ; 95% IC, 1.055 à 4.881 ; P = 0.03).

Conclusion : Le taux de colonisation et de BMR élevé est un bon indicateur de la transmission croisée dans le SNRN. Une stratégie active de contrôle de la dissémination des BMR devrait être appliquée.

Mots clé :

Colonisation intestinale, acquisition, nouveau-né, infection associée aux soins, bactéries multi-résistantes, environnement hospitalier.

Abstract

Introduction: In the neonatal intensive care unit (NICU), neonates are exposed to numerous potential reservoirs that cause colonization by multidrug-resistant bacteria (MDRB), which are responsible for healthcare-associated infections. This study was conducted in order to know the colonization rate of MDRB in neonates during their hospitalization in NICU.

Methods: This prospective study was conducted in the NICU (Hassan II university hospital of Fez) from 2013 to 2018. All consecutive admitted newborns were screened for MDRB intestinal and nasal carriage at admission of the babies and during the hospitalization. Samples of hospital surfaces and medical devices were also collected. Bacterial identification and antibiograms were performed according to the international standards. The resistance genes encoding β-lactamases (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}2}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}9}$, *bla*$_{MOX}$, *bla*$_{ACC}$, *bla*$_{DHA}$, *bla*$_{FOX}$, *bla*$_{EBC}$, *bla*$_{CIT}$, *bla*$_{OXA\text{-}48}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{OXA\text{-}51}$, *bla*$_{OXA\text{-}58}$, *bla*$_{OXA\text{-}23}$ and *bla*$_{OXA\text{-}24}$) were detected by PCR and confirmed by sequencing. The genetic transfers of the plasmids were carried out by bacterial conjugation. Clonality of isolates was studied by pulsed field electrophoresis. Statistical analysis was performed using SPSS V20 software.

Results: On admission, 455 newborns were screened. A median age of these newborns was 1 day with an extended 147 days and their average weight was 2612 ± 1023 grams. 22% of neonates were found colonized by an ESBL producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E), 8.7% by a carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* (CPE), 10.1% by a cephalosporinases producing *Enterobacteriaceae* (CASE-E) and 9.9% by a multidrug-resistant *A. baumannii* (MRA)

During hospitalization, 301 of newborns were included in the acquisition study. 59.4% of newborns acquired an ESBL-E during their stay, 12.5, 33.3 and 13.7% has acquired respectively CPE, CASE-E and MRA. The *bla*$_{CTXM\text{-}15}$ gene was the most frequently detected (81.2%) among ESBL-E. While, all CPE has expressed the *bla*$_{OXA\text{-}48}$ gene exclusively. Moreover, carbapenemases producing *A. baumannii* isolates harbored *bla*$_{OXA\text{-}51}$ and *bla*$_{OXA\text{-}23}$ genes. Conjugation experiments have shown that certain genes encoding β-lactamases are transferable between bacteria and were carried by a high molecular weight conjugative plasmid (~ 125 kb). The study of the epidemiological relationship of some *K. pneumoniae* isolates showed a high clonal diffusion in the studied service.

Several risk factors have been significantly associated with MDRB colonization at admission, including age, birth at maternity of the University Hospital, and direct importation from this maternity ($p < 0.001$). While, during hospitalization, length of stay ≥ 3 days and respiratory distress as pathology were identified as risk factors of MDRB acquisition (OR, 2.270, 95% CI, 1.055 to 4.881, P = 0.03).

Conclusion: The high rate of colonization, the MDRB and the resistance genes found represent good indicator of cross-transmission in the NICU. An active strategy to control the spread of MDRB should be applied.

Keywords:

Intestinal colonization, acquisition, newborn, nosocomial infection, multidrug-resistant bacteria, hospital environment.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classes majeures des antibiotiques et leurs modes d'action 22
Tableau 2 : Résistances naturelles aux β-lactamines chez les entérobactéries (CA-SFM, 2013) [55]. . 26
Tableau 3 : Classification structurale et fonctionnelle des β lactamases d'après Ambler et Bush 31
Tableau 4 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme des *Staphylocoque aureus* 56
Tableau 5 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme des entérobactéries. 57
Tableau 6 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme de *P. aeruginosa* 58
Tableau 7 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme d'*A. baumannii* 59
Tableau 8 : Amorces utilisées pour la détermination des gènes codant les résistances BLSE, CASE et CARBA 63
Tableau 9 : Conditions d'amplification des gènes *bla* par PCR 65
Tableau 10 : Caractéristiques sociodémographiques de la population étudiée 74
Tableau 11 : Prévalence du portage intestinal des E-BLSE, des EPC et des E-CASE chez les nouveau-nés à l'admission 75
Tableau 12 : Fréquence de la résistance des différentes entérobactéries isolées 77
Tableau 13 : Prévalence d'acquisition intestinale des E-BLSE, EPC et E-CASE chez les nouveau-nés en cours d'hospitalisation (n=207) 83
Tableau 14 : Fréquence de la résistance des différentes entérobactéries isolées en cours d'hospitalisation 85
Tableau 15 : **Répartition des gènes codant pour une BLSE en fonction d'espèces d'entérobactéries.** N : nombre d'isolats 91
Tableau 16 : Association des entérobactéries résistantes à l'imipénème avec la production de BLSE et CASE 96
Tableau 17 : variables associés au portage d'EMR à l'admission 97
Tableau 18 : Facteurs de risque liés au portage d'EMR à l'admission 98
Tableau 19 : Variables trouvés associés au portage d'*A. baumannii* à l'admission 98
Tableau 20 : Facteurs de risque liés au portage d'*A. baumannii* à l'admission 99
Tableau 21 : Variables trouvés associés à l'acquisition d'EMR en cours d'hospitalisation 99
Tableau 22 : Variables trouvées associées à l'acquisition d'*A. baumannii* en cours d'hospitalisation 100
Tableau 23 : Répartition des espèces d'entérobactéries, de *P. aeruginosa* et d'*A. baumannii* en fonction des sites de prélèvements 103
Tableau 24 : Récapitulatif des bactéries multi-résistantes isolées en portage chez les NN à l'admission et en cours d'hospitalisation 108
Tableau 25 : association entre toutes les caractéristiques des patients et la colonisation par des EMR à l'admission 140
Tableau 26 : association entre toutes les caractéristiques des patients et la colonisation par *A. baumannii* à l'admission 141
Tableau 27 : Association entre toutes les caractéristiques des patients et l'acquisition d'EMR en cours d'hospitalisation 142
Tableau 28 : association entre toutes les caractéristiques des patients et l'acquisition d'*A. baumannii* MR en cours d'hospitalisation 143

Liste des figures

Figure 1 : Précautions standards recommandés par la société française d'hygiène hospitalière [35] ... 14
Figure 2 : Voies de transmission directe ou indirecte d'un patient colonisé / infecté à un autre patient [43] ... 18
Figure 3 : Structures desβ-lactamines et du dipeptide D-Ala-D-Ala [48] ... 23
Figure 4 : analogie structurale ... 25
Figure 5 : Structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatifs [65] ... 28
Figure 6 : Schéma des différents BLSE type TEM en fonction de la mutation plasmidique [73] ... 32
Figure 7 : Schéma des différents BLSE type SHV en fonction de la mutation plasmidique [73] ... 33
Figure 8 : Arbre phylogénétique de la famille des CTX-M [76] ... 34
Figure 9 : Schéma des prélèvements réalisés sur les nouveau-nés ... 42
Figure 10 : Schéma montrant les sites de prélèvements sur une couveuse dans le SNRN ... 43
Figure 11 : Schéma montrant les autres sites de surface prélevés SNRN ... 43
Figure 12 : Test coagulase réalisé dans cette étude ... 48
Figure 13 : Test de fermentation du glucose ... 50
Figure 14 : Image montrant la galerie API20E et son tableau de lecture. ... 53
Figure 15 : Technique d'ensemencement ... 55
Figure 16 : Image de synergie dite en bouchon de champagne. ... 60
Figure 17 : les étapes d'une réaction d'amplification PCR. ... 61
Figure 18 : Thermocycleur ... 65
Figure 19 : diagramme des fréquences relatives des entérobactéries en portage intestinal chez les nouveau-nés à l'admission ... 76
Figure 20 : Taux des résistances associées chez les isolats d'E-BLSE ... 78
Figure 21 : Taux des résistances associées chez les isolats E-CASE ... 79
Figure 22 : Taux des résistances associées chez les EPC ... 79
Figure 23 : Fréquence de résistance des isolats d'*A. baumannii* à l'admission en fonction des différentes antibiotiques testés ... 80
Figure 24 : Organigramme des patients inclus dans l'étude d'EMR ... 82
Figure 25 : Répartition des entérobactéries isolées chez les nouveau-nés en cours d'hospitalisation ... 84
Figure 26 : Taux de résistances associées chez les isolats d'E-BLSE ... 86
Figure 27 : Taux de résistances associées chez les isolats d'E-CASE ... 86
Figure 28 : Taux de résistances associées chez les isolats d'EPC ... 87
Figure 29 : Organigramme des patients de l'étude d'acquisition d'*A. baumannii* ... 88
Figure 30 : Fréquence de résistance des isolats d'*A. baumannii* à l'admission en fonction des différents antibiotiques testés ... 89
Figure 31 : Photo d'un test de synergie + d'un isolat de *K. pneumoniae* productrice de BLSE réalisé dans notre laboratoire ... 90
Figure 32 : Pourcentage de répartition des gènes codant une BLSE chez les entérobactéries ... 90
Figure 33 : Relations phylogénétiques entre les isolats de *K. pneumoniae* produisant la BLSE par électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) ... 93
Figure 34 : Répartition des E-CASE en fonction d'espèces ... 94
Figure 35 : Test de Hodge effectué sur deux isolats d'entérobactéries, ... 95
Figure 36 : Test des MBL réalisé sur une souche d'*A. baumannii* résistante à l'imipénème. ... 96
Figure 37 : Pourcentage de contamination bactérienne sur les différents points de surface ... 101
Figure 38 : Répartition globale des BGN isolées de l'environnement ... 102
Figure 39 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à partir de l'environnement ... 103
Figure 40 : Fréquence des gènes codant une BLSE chez les E-BLSE isolées de l'environnement ... 104

Liste des abréviations

B

BMR : Bactéries multi-résistantes
BLSE : Bêta-lactamases à spectre élargi
BGN : Bacilles à Gram négatif

C

C3G : Céphalosporines de 3ème génération
CASE : Céphalosporinases
CARBA : carbapénèmase
CA-SFM : comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie

E

E : Entérobactéries
EPC : Entérobactéries productrices de carbapénèmases
EDTA : éthylène diamine tétra-acétate

I

IAS : Infection associée aux soins
IASN : Infection associée aux soins néonatales
IBL : inhibiteurs de Bêta-lactamases

M

MBL **:** Métallo-béta-lactamases

N

NN : Nouveau-né

O

OMS : Organisation mondiale de santé.

P

PCR : Polymerase chain reaction
PFGE : Pulsed-field gel electrophoresis
PLP : protéines liant la pénicilline

S

SNRN : Service de néonatologie et réanimation néonatale.
SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline.

T

TBE : Tris-Borate-EDTA

U

USI : Unité de soins intensifs

Publications

Btissam Arhoune, Bouchra Oumokhtar, Fouzia Hmami, Samira El Fakir, Fouzia Chami, Abdelhak Bouharrou. (2019) **Intestinal carriage of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* among newborns hospitalized in Moroccan neonatal intensive care unit**. PLoS ONE 14(1): e0209425. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209425.

Btissam Arhoune, Bouchra Oumokhtar, Fouzia Hmami, Abouddihaj Barguigua, Mohamed Timinouni, Samira El Fakir, Fouzia Chami, Abdelhak Bouharrou **Rectal carriage of extended-spectrum β-lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae among hospitalised neonates in a neonatal intensive care unit in Fez, Morocco**. J Glob Antimicrob Resist. 2017; 8.

Bouchra Oumokhtar, Abdelhakim El Ouali Lalami, Nadia Benaicha, **Btissam Arhoune**, Wafaa Bono. **Environmental surfaces in healthcare setting: A great potential risk of pathogens transmission**. Biomed Res. 2017; 28(6):2398–401.

Oualid Chaib, **Btissam Arhoune**, Sanae Achour, Elodie Moreau-Guigon, Fabrice Alliot, Marc Chevreuil, Samira El Fakir, Ilham El Arabi, Bouchra Oumokhtar. **Occurrence and Seasonal Variation of Antibiotics in Fez-Morocco Surface Water.** Am J Environ Sci. 2019 Aug 27.

Sara Himri, Angéla Filankembo Kava, Bouchra Oumokhtar, Kaoutar Moutaouakkil, **Btissam Arhoune**, Samir Atmani, Samira El Fakir. **Acute Rheumatic Fever in children: Experience at the Hospital Hassan II of Fez, Morocco.** Clinical Epidemiology and Global Health (accepté).

Btissam Arhoune, Bouchra Oumokhtar, Fouzia Hmami, Samira El Fakir, Fouzia Chami, Abdelhak Bouharrou. **Intestinal carriage of antibiotic resistant enterobacteriaceae among newborns hospitalized in Moroccan Neonatal Intensive Care Unit** (en cours de rédaction).

Communications

Communications orales

1. **Arhoune B.**, Hmami F., Elfakir S., Chami F., Timinouni M., Bouharrou A., Oumokhtar B.. « **Acquisition de bacilles gram-négatifs (BGN-MR) chez des nouveau-nés hospitalisés dans une unité néonatale marocaine : prévalence, facteurs de risque et épidémiologie moléculaire**». Congrès de la société Marocaine d'hygiène hospitalière (SMHH 2017) du 21 et 22 Avril 2017, Marrakech, Maroc
2. **Arhoune B.**, Oumokhtar B., Barguigua D., Timinouni M., Hmami F., Bouharrou A.. « **Caractérisation moléculaire des entérobactéries productrices des B lactamases a spectre élargi isolées au CHU de Fès** ». Congrès de la Société Marocaine de Microbiologie Médicale (SMAMM 2015), 6ème journées scientifiques le 3 et 4 Avril 2015, Fès, Maroc.
3. S. Himri, **B. Arhoune**, S. El Fakir, S. Atmani, B. Oumokhtar. **Le rhumatisme post-streptococcique de l'enfant au Fès, centre du Maroc**. 38ème réunion interdisciplinaire de chimiothérapies anti-infectieuses (RICAI 2017) du 17 et 18 décembre 2017 Palais des congrès de Paris, France.

Communications affichées

1- **Arhoune B.**, Hmami F., Chami F., Bouharrou A., Oumokhtar B.. «**Acquisition d'entérobactéries multi-résistantes chez des nouveau-nés hospitalisés dans le service de néonatologie et réanimation néonatale au CHU-Hassan II de Fès, Maroc** ». 2ème journées d'hygiène et prévention des infections associées aux soins du 17et 18 octobre 2018, Fès, Maroc.

2- **Arhoune B.**, Hmami F., Chami F., Bouharrou A., Oumokhtar B.. «**Portage à l'admission et en cours d'hospitalisation *d'Acinetobacter baumannii* multi-résistants chez des nouveau-nés hospitalisés dans un service de Néonatologie et de Réanimation néonatale** ». 2ème journées d'hygiène et prévention des infections associées aux soins du 17et 18 octobre 2018, Fès, Maroc.

3- **Arhoune B.**, Oumokhtar B., Hmami F., Timinouni M., Chami F., Elfakir S., Bouharrou A.. «**Acquisition nosocomiale de bactéries multi-résistantes chez des nouveau-nés hospitalisés dans le service de néonatologie et réanimation néonatale au CHU-Hassan II de Fès, Maroc»**. Société Marocaine d'infectiologie pédiatrique et de vaccinologie (SOMIPEV 2018) du 6 au 8 Avril 2018, Marrakech, Maroc.

4- **Arhoune B.**, K. Balitere, K. Moutaouakkil, F. Hmami, S. Atmani, B. Oumokhtar. « **Etude comparative des BGN-intestinaux chez des mamans parturientes et leurs nouveau-nés** ». 3ème conférence internationale d'infectiologie d'Oran (CIIO 2018) du 26 au 28 janvier 2018, Oran, Algérie.

5- **Arhoune B.**, H. Sekkat, L. A. Elouali, M. Tazi, M. A. Afifi, B. Oumokhtar «**Relation entre infections du site opératoire et Portage nasal à Staphylococcus aureus en chirurgie orthopédique** ». 3ème conférence internationale d'infectiologie d'Oran (CIIO 2018) du 26 au 28 janvier 2018, Oran, Algérie.

6- **Arhoune B.**, Hmami F., Chami F., Bouharrou A., Oumokhtar B. «***Acinetobacter baumanii* **multi-résistants chez des nouveau-nés hospitalisés dans un service de Néonatologie et de Réanimation néonatale : portage communautaire ou acquisition en cours d´hospitalisation ?**». 3ème conférence internationale d'infectiologie d'Oran (CIIO 2018) du 26 au 28 janvier 2018, Oran, Algérie.

7- **Arhoune B.**, Oumokhtar B., Hmami F., Chami F., Elfakir S., Bouharrou A. « **Acquisition d'*Acinetobacter baumanii* multi-résistante chez des nouveau-nés hospitalisés au Maroc** ». 37ème réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI 2017) du 17 et 18 décembre 2017, Paris, France.

8- S. Bouramdane , K. Balitere, **B. Arhoune**, F. Hmami, W. Kojmane, B. Oumokhtar, S. Atmani « **L'intestin du nouveau-né est-il stérile?** ». Société Marocaine d'infectiologie pédiatrique et de vaccinologie (SOMIPEV 2017) du 31 Mars au 1 Avril 2017, Marrakech, Maroc.

9- Sekkat H., **Arhoune B.**, Berchimas J.M., Afifi M.A., El Mrini A., Oumokhtar B.. « **Etude de la relation entre la colonisation nasale et l'infection du site opératoire par *S. aureus***». Congrès de la société Marocaine d'hygiène hospitalière (SMHH 2017) du 21 et 22 Avril 2017, Marrakech, Maroc.

10- **Arhoune B.**, Hmami F., Chami F., Bouharrou A., Oumokhtar B.. «**Acquisition *d'Acinetobacter baumanii* multi-résistants chez des nouveau-nés hospitalisés dans un service de Néonatologie et de Réanimation néonatale** ». Société Marocaine d'infectiologie pédiatrique et de vaccinologie (SOMIPEV 2017) du 31 Mars au 1 Avril 2017, Marrakech, Maroc.

11- **Arhoune B.**, Hmami F., Elfakir S., Chami F., Timinouni M., Bouharrou A., Oumokhtar B.. « **Evaluation de la qualité microbiologique de l'environnement hospitalier dans un service de néonatologie et réanimation néonatale**». Congrès de la société Marocaine d'hygiène hospitalière (SMHH 2017) du 21 et 22 Avril 2017, Marrakech, Maroc.

12- **Arhoune B**., Hmami F., Elfakir S., Timinouni M., Bouharrou A., Chami F., Oumokhtar B. «**Acquisition of multi-drug resistant bacteria (MRB) through newborn hospitalized in a Moroccan Neonatal Unit: Prevalence, risk factors and molecular epidemiology**». 27éme Congrès européen de microbiologie clinique et des pathologies infectieuses (ECCMID 2017) du 22 au 25 Avril 2017, Vienna, Autriche.

13- **Arhoune B.**, Hmami F., Chami F., Elfakir S., Bouharrou A., Oumokhtar B. «**Acquisition nosocomiale de bactéries multi-résistantes par des nouveau-nés en cours d'hospitalisation : prévalence, facteurs de risque et déterminants moléculaires de la résistance**». 2eme forum des doctorants, pôle santé, recherche biomédicale et qualité de vie, à la Faculté de médecine du 3 novembre 2016, Fès, Maroc

14- **Arhoune B.**, Hmami F., Chami F., Bouharrou A., Oumokhtar B. « ***Acinetobacter baumanii* multi-résistants chez des nouveau-nés hospitalisés dans un service de Néonatologie et de Réanimation néonatale : portage communautaire ou acquisition en cours d´hospitalisation ?**». 7éme journées scientifiques, Congrès de la Société Marocaine de Microbiologie Médicale (SMAMM 2016) du 5 novembre 2016, Rabat, Maroc.

15- **Arhoune B.**, Barguigua D., Timinouni M., El Yahyaoui G., Hmami F., Bouharrou A., Oumokhtar B.. «**Dépistage du portage intestinale des entérobactéries productrices de**

BLSE dans un service de néonatologie et réanimation néonatales à Fès, Maroc». 1 ère conférence internationale d'infectiologie d'Oran (CIIO 2016) du 30 et 31 janvier 2016, Oran, Algérie.

16- **Arhoune B.**, Oumokhtar B., Hmami F., Chami F., Elfakir S., Bouharrou A.. « **Prévalence du portage intestinal d'Entérobactéries multi-résistantes chez des nouveau-nés à l'admission**». 6ème journées scientifiques, Congrès de la Société Marocaine de Microbiologie Médicale (SMAMM 2015) du 3 et 4 Avril 2015, Fès, Maroc.

17- **Arhoune B.**, Oumokhtar B., Hmami F., Chami F., Elfakir S., Bouharrou A.. « **Entérobactéries productrices de carbapénèmases isolées chez des nouveau-nés en cours d'hospitalisation : prévalence et caractérisation moléculaire** ». 6ème journées scientifiques, Congrès de la Société Marocaine de Microbiologie Médicale (SMAMM 2015) du 3 et 4 Avril 2015, Fès, Maroc.

18- **Arhoune B.,** Barguigua D., Timinouni M., Hmami F., Bouharrou A., Oumokhtar B. «**Entérobactéries productrices de carbapénèmases et BLSE isolées chez des nouveau-nés hospitalisés au CHU hassan II de Fès : Prévalence et caractérisation moléculaire**». 34ème réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI 2014) du 27 et 28 Novembre 2014, Paris, France.

19- **Arhoune B.**, F. Hmami, A. Bouharrou, B. Oumokhtar. « **Environnement hospitalier : réservoir de BMR ?** ». 3ème congrès national et 6ème journée maghrébine d'hygiène hospitalière du 15 et 16 novembre 2013, Casablanca, Maroc.

20- Participation aux Doctoriales 2014 sous le thème « Ouverture des chercheurs sur le monde socio-économique » à la Cité de l'Innovation de Fès. 10, 11 et 12 avril 2014, Fès, Maroc.

Prix et distinction

Prix de la meilleure communication affichée obtenu en 2018 au congrès de la Société Marocaine d'infectiologie pédiatrique et de vaccinologie (SOMIPEV 2018) pour le travail intitulé : « Acquisition nosocomiale de bactéries multi-résistantes chez des nouveau-nés hospitalisés dans le service de néonatologie et réanimation néonatale au CHU-Hassan II de Fès, Maroc». Marrakech, Maroc.

Prix de la meilleure communication affichée obtenu en 2018 aux 2èmes journées d'hygiène et prévention des infections associées aux soins pour le travail intitulé : « portage à l'admission et en cours d'hospitalisation *d'Acinetobacter baumannii* multi-résistants chez des nouveau-nés hospitalisés dans un service de Néonatologie et de Réanimation néonatale ». 2ème journées d'hygiène et prévention des infections associées aux soins du 17et 18 octobre 2018, Fès, Maroc.

Prix de la meilleure communication affichée obtenu en 2017 au congrès de la Société Marocaine d'infectiologie pédiatrique et de vaccinologie (SOMIPEV 2017) pour le travail intitulé : « Acquisition d'*Acinetobacter baumannii* AB multi-résistants chez des nouveau-nés hospitalisés dans un service de Néonatologie et de Réanimation Néonatale », Marrakech, Maroc.

Stages et autres activités

Stages

- Stage de formation au laboratoire de bactériologie médicale de la Faculté des Sciences et de Médecine de Fribourg du 1 au 28 Septembre 2018, Fribourg, Suisse.
- Stage de formation au laboratoire de bactériologie médicale à l'institut Pasteur du Maroc de Casablanca du 1 au 15 Novembre 2014.
- Collaboration dans un projet en partenariat avec la société Sothema, le Pr. REMMAL Adnane en 2017intitulé : « Etude de l'activité in vitro du soclav + : une nouvelle formulation pour la lutte contre les germes résistants à β lactamase à spectre élargie (BLSE).
- Participation à l'organisation de manifestations scientifiques :
    - 2èmes journées d'hygiène et prévention des infections associées aux soins». 17-18 oct 2018 à la FMPF.
    - the 2nd international workshop of engineering and innovation in healthcare (weith). le 22-23 Mars 2017 à la FMPF.
    - 1ère journées d'hygiène et prévention des infections associées aux soins». Mars 2016 à la FMPF

Accompagnement des étudiants dans la réalisation des travaux de recherche

Stage de fin d'étude de Master sous le thème : Caractérisation moléculaire des entérobactéries BLSE (Asmae Idrissi, 2014).

Stage de fin d'étude de Master sous le thème : Evaluation du risque de la transmission croisée des bactéries entre les nouveau-nés et leur environnement dans un service de néonatologie et de réanimation néonatale (Jihane Sahel, 2015).

Stage de fin d'étude de Master sous le thème : Etude comparative des BGN-intestinaux chez des mamans parturientes et leurs nouveau-nés (Khaoula Balitere, 2017)

Stage de fin d'étude d'une licence sous le thème : Etude de la qualité microbiologique de l'environnement hospitalier : Cas des incubateurs en Néonatologie (Zouita Fatima Zahrae, 2013).

Stage de fin d'étude d'une licence sous le thème : Les infections néonatales tardives à Entérobactéries BLSE (Soukaina Saidi Alaoui, 2018)

Suivi des stagiaires de 5ème année de Médecine

Suivi des stagiaires étudiants bénévoles accueillis au laboratoire de Microbiologie et de Biologie moléculaire. FMPF.

Table des matières

DEDICACES .....

REMERCIEMENTS .....

RESUME .....

ABSTRACT .....

LISTE DES TABLEAUX .....

LISTE DES FIGURES .....

LISTE DES ABREVIATIONS .....

PUBLICATIONS .....

COMMUNICATIONS .....

PRIX ET DISTINCTION .....

STAGES ET AUTRES ACTIVITES .....

TABLE DES MATIERES .....

INTRODUCTION GENERALE **1**

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUE **3**

CHAPITRE I - INFECTIONS ASSOCIEES AUX SOINS CHEZ LES NOUVEAU-NES 4

I - Introduction *4*

II - Epidémiologie *5*

III - Facteurs de risque des IAS *6*

1 - Mode d'accouchement 6

2 - Terme de naissance 6

3 - Poids à la naissance 6

4 - Type d'allaitement 6

5 - Durée de séjour 7

6 - Procédures invasives 7

7 - Antibiothérapie 7

8 - Surcharge de travail et manque de personnel 8

IV - Bactéries responsables des infections associées aux soins néonatales *8*

1 - Les Staphylocoques 8

2 - Les Entérocoques 8

3 - BGN non fermentants 9

4 - Entérobactéries 9

V - Rôle de la colonisation dans la survenue de l'infection à BMR *10*

VI - Prévention des infections associées aux soins *11*

1 - Dépistage des patients à l'admission 12

2 - Précautions standards 12

3 - Gestion de l'environnement 15

CHAPITRE II - ANTIBIOTIQUES ET RESISTANCE BACTERIENNE 20

I - Les antibiotiques *20*

1 - Classification 20

2 - β-lactamines 23

3 - Structure des β-lactamines 23

4 - Familles des β-lactamines 24

5 - Mécanisme d'action des β-lactamines 25

II - Résistance bactérienne aux β-lactamines *26*

1 - Epidémiologie de la résistance aux β-lactamines 27
2 - Mécanismes de résistance aux β-lactamines 27
3 - Plasmide : principal support génétique de la résistance β-lactamase 37

OBJECTIFS 38

MATERIEL & METHODES 40

PRESENTATION DU TRAVAIL 41
I - Patients 41
II - Environnement 42
III - Méthodes de Prélèvements 44
1 - Prélèvement rectal 44
2 - Prélèvement nasal 44
3 - Prélèvement des surfaces 44
IV - Collecte des données épidémiologiques des patients 44
ANALYSES MICROBIOLOGIQUES 45
V - Ensemencements 45
1 - Prélèvement rectal 45
2 - Prélèvements nasaux 45
3 - Prélèvements d'environnement 45
VI - Isolements et purification 45
VII - Identification biochimique 46
1 - Coloration de Gram 46
2 - Test d'oxydase 47
3 - Test de catalase 47
4 - Test de coagulase 48
5 - Fermentation du glucose-lactose 48
6 - Test IMViC (Indole/ Méthyle rouge/ Voges Proskauer/ Citrate) 50
7 - Identification par Galerie Api 20 E, Api 20NE et Api Staph 52
VIII - Antibiogramme 54
1 - Milieu de culture 54
2 - Préparation de l'inoculum bactérien 54
3 - Ensemencement par écouvillonnage 54
4 - Application des disques 55
5 - Incubation 55
6 - Choix des antibiotiques 55
7 - Détection phénotypique de la résistance enzymatique 59
ANALYSE MOLECULAIRE 60
IX - Extraction de l'ADN total 61
X - Réaction d'amplification par PCR 61
1 - Principe 61
2 - Amorces utilisées 62
3 - Mélange réactionnel (Mix PCR) 64
4 - Programme d'amplification 64
XI - Electrophorèse sur gel d'agarose 65
1 - Préparation du gel 66
2 - Electrophorèse 66
XII - Réaction de séquençage 66
XIII - Détermination du support génétique de la résistance aux antibiotiques 67
1 - Conjugaison bactérienne 67
2 - Extraction plasmidique 68
3 - Electrophorèse en champ pulsé (PFGE) 69
ANALYSE STATISTIQUE 70

RESULTATS 72

I - Caractéristiques sociodémographiques 73
II - Dépistage de la colonisation par des BMR à l'admission 75

1 - Dépistage du portage intestinal des entérobactéries multi-résistantes 75
2 - Dépistage intestinal des non entérobactéries 79
3 - Dépistage du portage nasal du SARM 80
III - Acquisition de BMR au cours de l'hospitalisation 80
1 - Acquisition d'EMR en cours d'hospitalisation 81
2 - Acquisition des non Entérobactéries multi-résistants (A. baumannii) 87
IV - Profil phénotypique et génotypique des BMR isolées 89
1 - Entérobactéries BLSE 89
2 - Entérobactéries productrices de céphalosporinases 93
3 - Entérobactéries carbapénèmases 94
4 - A. baumannii carbapénèmases 96
V - Analyse des facteurs de risque 97
1 - Analyse des facteurs de risque à l'admission 97
2 - Analyse des facteurs de risque en cours d'hospitalisation 99
VI - Etude de la contamination de l'environnement proche des nouveau-nés hospitalisés 101
1 - Taux de contamination des différents points de surface 101
2 - Répartition globale des BGN isolées 101
3 - Répartition des espèces BGN isolées en fonction des sites de prélèvements 102
4 - Profil de résistance des isolats d'environnement identifiés 103
5 - Résultats des analyses moléculaires des BMR isolés à partir des surfaces de l'environnement du SNRN 104

DISCUSSION 106

I - Colonisation intestinale des nouveau-nés à l'admission et en cours d'hospitalisation 108
1 - Entérobactéries 108
2 - A. baumannii 109
3 - Pseudomonas aeruginosa 110
4 - Staphylococcus aureus résistants à la méthicilline 110
II - Profils de résistances phénotypiques et génotypiques des bactéries isolées 111
1 - Entérobactéries 111
2 - A. baumannii 113
III - Facteurs de risques 114
IV - Contamination de l'environnement proche du nouveau-né par des BMR 115
V - Prévention de la transmission croisée des BMR 116

CONCLUSION GENERALE 119

PERSPECTIVES 121

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 123

ANNEXES 136

I - Annexe 1 136
II - Annexe 2 137
III - Annexe 3 140
IV - Annexe 4 141
V - Annexe 5 142
VI - Annexe 6 143

Introduction Générale

La résistance bactérienne aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale [1]. Selon un rapport sur l'antibio-résistance dans le monde, les maladies infectieuses causées par des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) seront la première cause de décès par maladie en 2050. Il serait question de plus de 10 millions de morts par an dans le monde contre 700 000 actuellement. Cette prévalence est supérieur à celle causée par le cancer [2]. La prévalence des infections associées aux soins provoquées par ces BMR peut aller jusqu'à 15% chez des patients admis dans les unités de soins intensifs (USI). Ce chiffre peut atteindre 45% de bactériémies en réanimation néonatale [3]. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), les infections associées aux soins sont responsables de 4% à 56% de toutes les causes de décès en période néonatale chez les nouveau-nés hospitalisés dans les pays en voie de développement. En Asie du Sud-Est et en Afrique, elle peut aller jusqu'à 75% [4]. Les bacilles à Gram négatifs ont été rapportés comme étant les causes les plus courantes de ces infections dans les USI, et particulièrement néonatales [1]. En plus, ils ont été responsables de plusieurs épidémies clonales d'infections associées aux soins [5].

le mécanisme principal de résistance aux bêta-lactamines chez les BMR est la production des enzymes β-lactamases [6]. Ces enzymes sont fréquemment codées par des gènes portés par des plasmides hautement mobiles, offrant la capacité de transfert clonal et horizontal [1]. En plus, ces plasmides peuvent héberger également des gènes codant pour la résistance à d'autres classes d'antibiotiques tels que les aminosides, le triméthoprime, les sulfonamides et les tétracyclines [7].

La colonisation par des entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre élargie (BLSE) est un facteur de risque (FR) d'infections par les BLSE, qui sont associées à des retards dans l'efficacité du traitement, à une hospitalisation prolongée, à une augmentation des coûts ainsi qu'à une morbidité et une mortalité accentuées. Certains NN peuvent être trouvé colonisés lors de l'admission dans le service, tandis que d'autres vont l'acquérir durant leur séjour suite à la sélection de bactéries résistantes. Cette sélection est induite par l'utilisation abusive d'antibiotiques (sélection endogène) ou par l'acquisition de ces BMR par transmission croisée d'un patient à un autre par le biais du personnel soignant ou à partir de l'environnement hospitalier. En effet, les surfaces et divers objets inanimés tels que les thermomètres médicaux ont été impliqués dans la transmission de ces BMR [8].

Plusieurs études ont montré que le dépistage de la colonisation des nouveau-nés par des BMR, à l'admission et en cours d'hospitalisation, a permis de diminuer le risque d'infections associées aux soins dans les USI.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la prévalence d'acquisition des bactéries multi-résistantes chez les nouveau-nés hospitalisés dans le service de néonatologie et réanimation néonatale (SNRN) au CHU Hassan II de Fès, Maroc. Les BMR étudiées sont :

- *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM)
- Entérobactéries multi-résistantes :
  - Les entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre élargie (E-BLSE)
  - Les entérobactéries productrices de céphalosporinases (E-CASE)
  - Les entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC).
- *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème (ABRI)
- *Pseudomonas aeruginosa* résistante à l'imipénème (PARI)

D'autres objectifs ont été établis. Ce sont :

- La détermination de la prévalence du portage de BMR à l'admission des nouveau-nés
- L'identification des facteurs de risques liés à la colonisation par ces BMR
- L'étude des profils de résistance des différentes bactéries isolées
- L'étude moléculaire des déterminants génétiques de la résistance chez les BMR isolées
- L'étude de la relation clonale entre ces BMR
- L'étude des réservoirs exogènes notamment surfaces et dispositifs médicaux, qui peuvent constituer une source de transmission et de dissémination des BMR dans le service.

Rappels bibliographique

Chapitre I - Infections associées aux soins chez les nouveau-nés

I - Introduction

La physiopathologie des IAS néonatales en réanimation est très complexe. Schématiquement, elle peut s'expliquer par l'association de deux facteurs clés : la diminution des défenses immunitaires du patient et sa colonisation par des bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes. Ces IAS néonatales sont considérées comme l'étape finale succédant à une série d'événements antérieurs : le portage, la colonisation et la contamination de la mère, du personnel soignant ou de l'environnement [9]. Elles sont responsables d'une morbi-mortalité importante chez le NN dans les pays en voie de développement.

Bien que presque stériles à la naissance, les nouveau-nés sont progressivement colonisés par des micro-organismes provenant de la mère ou de l'environnement immédiat. Le risque de translocation est maximal en cas de pullulation digestive, de trouble du transit ou de retard de l'alimentation. Les nouveau-nés hospitalisés sont souvent soumis à des procédures invasives telles que le port de voies veineuses, de sondes, la ventilation mécanique ou les interventions chirurgicales, qui contribuent à la transmission de bactéries souvent multi-résistantes aux antibiotiques.

Les étiologies bactériennes sont dans la majorité des cas, des entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques d'acquisition nosocomiale. En effet, le portage de BMR est une menace réelle puisque le patient asymptomatique est plus susceptible de transmettre ces bactéries.

Une infection associée aux soins (IAS) : est définie comme une infection acquise dans un établissement de soins (par un patient admis pour une raison autre que cette infection) qui n'était ni en incubation ni présente à l'admission du malade. Le délai entre l'admission et le début de l'infection est de 48–72 heures pour les infections bactériennes ou au-delà si la période d'incubation est connue plus longue [10]. Pour les infections du site opératoire (ISO), on les considère habituellement comme associées aux soins. Ces infections survenant dans les 30 jours suivant l'intervention ou, s'il y a mise en place d'un implant ou d'une prothèse dans l'année qui suit l'intervention.

Chez le NN, on parle souvent de l'infection précoce acquise dans les 7 premiers jours de vie et de l'infection tardive acquise à partir de la 2ème semaine de vie.

L'acquisition de BMR est l'identification de la colonisation par ces BMR dans un délai supérieur à 48h après l'admission des patients.

Le portage ou **la colonisation** est définie par la présence des BMR dans un site anatomique où l'espèce est souvent présente, mais pas à l'état multi-résistant ou, alternativement, dans un site anatomique où l'espèce est généralement absente, mais sans signe clinique ou biologique d'infection.

Les bactéries multi-résistantes : Une BMR est définie comme une bactérie ayant acquis une résistance à au moins trois molécules de trois familles ou groupes d'antibiotiques différents auxquels elle est normalement sensible.

La contamination est la mise en évidence de microorganismes absents du site prélevé.

II - Epidémiologie

À l'échelle mondiale, les infections associées aux soins (IAS) touchent un très grand nombre de patients, ce qui augmente considérablement le taux de morbidité et de mortalité.

Plus de 1,4 million de personnes dans le monde souffrent de complications infectieuses acquises à l'hôpital (14). Selon l'OMS, 15% environ de patients hospitalisés contractent une IAS [11]. L'incidence dans les pays à revenu élevé est de 3,5 à 12%, tandis qu'elle est plus élevée dans les pays à revenu moyen et faible où elle varie entre 5,7 et 19,1%. A l'hôpital universitaire Ibn Rochd de Casablanca, 6,7% de bactériémies sont associées aux soins avec une incidence allant de 7,3 à 13,7/1 000 patient-jour d'hospitalisations [12]. En période néonatale, les IAS sont responsables de 4% à 56% de toutes les causes de décès chez les bébés hospitalisés dans les pays en voie de développement. En Asie du Sud-Est et en Afrique, cela peut aller jusqu'à 75% [4]. En Tunisie, l'incidence des infections associées aux soins néonatales a été estimée à 21,9 % (25,3 /1000 patient-jour) en réanimation mixte néonatale et pédiatrique [13]. Dans un service de néonatologie et réanimation néonatal (SNRN), à l'hôpital universitaire Mohamed VI de Marrakech, la prévalence des IAS rapportée est de 13% avec une densité d'incidence de 21,2/1000 patient-jour. Les types d'infections étaient des bactériémies (89%), des pneumonies (6,6%), des méningites (3,3%) et des infections urinaires (1,1%) [14].

III - Facteurs de risque des IAS

Plusieurs facteurs de risque d'infection par des BMR ont été rapportés chez les nouveau-nés hospitalisés dans les SNRN. Le mode d'accouchement, le terme, le poids à la naissance, la durée de séjour, l'utilisation des procédures invasives et l'antibiothérapie administrée sont les facteurs les plus décrits.

1 - Mode d'accouchement

Le mode d'accouchement joue un rôle important dans la cinétique d'implantation du microbiote intestinale. En effet, dans les accouchements par voie basse, les nouveau-nés sont rapidement colonisés par les muqueuses de la mère (d'origine vaginale et fécale), alors que les nourrissons nés par césarienne seront principalement colonisés par des microorganismes provenant de l'environnent hospitaliers tel que l'air, l'eau et le personnel soignant [15].

2 - Terme de naissance

le risque d´IAS chez le NN est important lorsque le NN est prématuré [16]. L'incidence des infections associées aux soins peut atteindre 90% avant 28 semaines. Le risque d'IAS est multiplié par 4,5 si l'âge gestationnel est inférieur à 30 semaines. Ces chiffres s'expliquent par l'immaturité des défenses immunitaires, l'absence de transmission d'IgG transplacentaires. Le même auteur cité plus haut a rapporté que, chez le grand prématuré, la gravité des pathologies ainsi que le recours plus fréquent aux procédures invasives augmentent le risque d'IAS.

3 - Poids à la naissance

Le poids du nouveau-né à la naissance est un indicateur important du risque de l'infection associée aux soins. Il existe une corrélation étroite entre l'incidence des infections associées aux soins, l'âge gestationnel et le poids à la naissance. Le risque d'infection est inversement proportionnel au poids à la naissance. Il peut être ainsi multiplié par 5 si le poids est inférieur à 1000 g [17].

4 - Type d'allaitement

Les nouveau-nés nourris avec du lait maternel présentent moins de risque de développer une bactériémie par rapport à ceux nourris au lait artificiel [18]. L'efficacité du lait maternel semble être dose-dépendante. Les nouveau-nés présentant une alimentation exclusive au lait maternel ont moins d'épisodes infectieux que ceux nourris partiellement avec du lait maternel [18]. En effet, le microbiote de ces NN présente des taux importants en bifidobactéries [19]. Ces bactéries bénéfiques jouent un rôle barrière et diminuent la migration des pathogènes à travers

la muqueuse, en entrant en compétition avec ces mêmes bactéries et leurs récepteurs, et en augmentant la réponse immunitaire et la sécrétion d'immunoglobuline A au niveau de la muqueuse.

5 - *Durée de séjour*

L'augmentation de la durée de séjour à l'hôpital entraîne une colonisation par des bactéries pathogènes opportunistes qui se trouvent dans le milieu hospitalier. Plus l'hospitalisation sera longue, plus le risque de la survenue d'une bactériémie nosocomiale sera grand. Gayvallet et coll. (2016) ont rapporté que 10,9 % des bactériémies surviennent après deux semaines d'hospitalisation alors que 50 % surviennent après un mois [20].

6 - *Procédures invasives*

Le nouveau-né hospitalisé présente souvent de lourdes pathologies qui peuvent justifier le recours à des procédures diagnostiques et thérapeutiques invasives Les dispositifs invasifs, tels que les cathéters veineux, la ventilation mécanique ou les interventions chirurgicales augmentent le risque d'IAS. Les cathéters veineux centraux et la durée de leur utilisation ont été souvent rapportés comme étant des facteurs de risque de bactériémies tardives chez les nouveau-nés dans le SNRN, notamment chez les nourrissons ayant un très faible poids à la naissance [17]. La plupart des infections liées aux cathéters sont causées par des Staphylocoques à coagulase négative ou d'autres organismes colonisant la peau autour de site d'insertion du cathéter.

D'autre part, Le risque d'IAS est multiplié par 2,4 à 5 en cas d'utilisation de la ventilation mécanique [21]. L'incidence des pneumopathies infectieuses augmente de 6 à 20% par rapport aux nouveau-nés non ventilés, avec un risque cumulatif de 1% par jour d'hospitalisation [22]. On note une corrélation étroite entre l'incidence des pneumopathies et la durée de l'intubation. Le risque est majeur au-delà de 10 jours de ventilation [21].

Lors d'un acte chirurgical pratiqué chez le nouveau-né, le risque d'une infection de site chirurgical est déterminé dans la même mesure par la charge bactérienne des tissus impliqués, par les conditions générales du nouveau-né et par des facteurs liés à l'intervention. Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) demeure le microorganisme le plus impliqué dans ce type d'infection [23]

7 - *Antibiothérapie*

L'antibiothérapie et sa durée d'utilisation sont des facteurs de risque fréquemment associés à une bactériémie à bactéries multi-résistantes chez le nouveau-né prématuré [24]. L'utilisation

de céphalosporines de troisième génération (3G) a été souvent liée à l'émergence de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE dans les SNRN [25]. En 2014, une étude a rapporté que 35% des isolats de *K. pneumoniae* isolées de bactériémies étaient devenues résistantes à ces céphalosporines 3G. Dans les infections urinaires, cette bactérie a été responsable de 16% de ces IAS.

8 - Surcharge de travail et manque de personnel

La survenue des IAS au sein d'un SNRN augmente en cas de surcharge du travail. A cela s'ajoute l'insuffisance en personnel soignant (9). Cette majoration a été corrélée à la colonisation par des microorganismes à Gram négatif résistants, probablement liée à la négligence des mesures de prévention des infections lorsque la charge de travail est élevée (4). Le risque de contamination est dû au non-respect des règles d'hygiène de base telles que l'hygiène des mains (7). Plusieurs études ont en effet montré que seuls 50% du personnel soignant se lave les mains avant et après chaque contact avec les patients (9).

IV - Bactéries responsables des infections associées aux soins néonatales

Le profil bactériologique varie en fonction des pays, des hôpitaux et des services, en relation avec les habitudes techniques et les modes de prescription. Les bactéries responsables d'infections associées aux soins peuvent être commensales ou pathogènes.

1 - Les Staphylocoques

Environ 20% de la population présentent un portage nasal à *Staphylococcus aureus* et de nombreux autres sites tel que les aisselles, l'aine ou le tractus gastro-intestinale. Ceci fournit un réservoir à partir duquel une transmission aussi bien endogène qu'exogène peut se produire [26]. Chez le nouveau-né, les staphylocoques à coagulase-négatifs (SCN) peuvent être la cause de 35 à 45% des IAS bactériennes sur cathéter vasculaire. Celles-ci sont de diagnostic difficile, étant donné que les SCN sont des germes commensaux de la peau contaminant des cultures sanguines.

Les *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) quant à eux, sont impliqués dans plus de 25% des infections des sites opératoires [23].

2 - Les Entérocoques

Les entérocoques sont des bactéries anaérobies facultatives à Gram + qui sont des habitants naturels du tractus gastro-intestinale et génito-urinaire chez l'homme. Ils sont représentés principalement par : *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Ils peuvent être la cause d'infections sévères telles que l'endocardite et la bactériémie entrainant des taux de mortalité

élevés. Leur résistance aux vancomycines et aux aminosides est un problème croissant et les entérocoques multi-résistants sont devenus une cause importante d'infections associées aux soins [27].

3 - BGN non fermentants

Les principaux agents pathogènes humains de ce groupe sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Acinetobacter baumannii*. Ces bactéries sont des opportunistes qui causent de graves infections chez les NN dans les unités de soins intensifs. Elles ont une résistance intrinsèque à certains antibiotiques ce qui rend les infections par ces bactéries difficiles à traiter. *P. aeruginosa* et *A. baumannii* peuvent coloniser les voies digestives des NN hospitalisés et aussi peuvent survivre longtemps dans un environnement humide. Ces bactéries ont été à l'origine de plusieurs épidémies d'IAS dans le monde [27,28].

4 - Entérobactéries

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram - fermentant le glucose. Elles sont présentes dans le tractus gastro-intestinal humain. Les *Enterobacteriaceae* sont d'importants agents pathogènes humains responsables de 50% des cas de bactériémies, de plus de 70% des infections urinaires et d'infections gastro-intestinales. Elles regroupent plusieurs genres notamment : *Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Morganella, Proteus, Providencia, Serratia*, etc.

A - *Escherichia coli*

Escherichia coli est la cause la plus courante des infections urinaires et de bactériémies dans les établissements de soins. *Escherichia coli* peut coloniser l'appareil génital de la mère ce qui peut causer des méningites néonatales lors du passage du nouveau-né par l'appareil génital, ou suite à l'infection du liquide amniotique consécutive à une rupture prolongée des membranes. *E. coli* colonise le tube digestif du nouveau-né dès les premières heures de la naissance mais elle peut aussi coloniser les voies respiratoires supérieures.

B - *Klebsiella sp*

Klebsiella sp. est une bactérie immobile possédant une capsule de nature polysaccharidique. Sa virulence est associée à la présence de cette capsule qui lui confère une résistance à la phagocytose par les polynucléaires et les macrophages [29].

Klebsiella pneumoniae est une bactérie commensale de l'intestin et des voies respiratoires. Cependant, elle peut provoquer des infections urinaires et des surinfections des bronches chez

les bronchitiques chroniques, voire des abcès du poumon. La contamination pulmonaire se fait surtout par voie aérienne, mais la voie hématogène n'étant pas exclue. A cause de sa pathogénicité à fort potentiel épidémique, elle est souvent responsables d'épidémies dans les services de néonatologie et de réanimation néonatale [30].

C - *Autres entérobactéries*

D'autres bactéries du groupe *Enterobacteriaceae* cliniquement importants, sont responsables d'infections associées aux soins notamment les genres : *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* et *Citrobacter*.

Enterobacter cloacae et *Serratia marcescens* sont souvent impliquées dans des épidémies d'IAS en milieu hospitalier dont l'incidence a considérablement augmenté ces dernières années. Ces bactéries ont une grande affinité pour les voies urinaires, mais elles sont capables de coloniser aussi les systèmes respiratoires et digestifs des patients.

V - Rôle de la colonisation dans la survenue de l'infection à BMR

La colonisation préalable par des BMR d'origine exogène ou endogène constitue une étape préalable à la survenue d'infections chez des patients souvent immunodéprimés et bénéficiant de procédures invasives [1].

Chez les nouveau-nés hospitalisés, l'exposition à de nombreux réservoirs potentiels est à l'origine de bactéries responsables d´IAS. Le réservoir le plus important reste celui de ces patients eux-mêmes (leur flore digestive, cutanée, oropharyngée, etc.) on parle d'une origine endogène. D'autres réservoirs peuvent constituer des réservoirs exogènes jouant un rôle important dans l'acquisition de BMR. Cette colonisation est une étape préalable indispensable résultant de cette exposition constituée par la flore des professionnels de santé, celle des patients voisins [31] ou de l'environnement hospitalier (surfaces, eau, air, matériels).

Par exemple, dans le cas des BMR commensales telles que les entérobactéries BLSE ou les entérobactéries productrices de carbapénèmases, une première étape d'acquisition et de colonisation précède toujours l'infection et cette colonisation est due à une transmission manuportée ou à une acquisition alimentaire.

D'autre part, plusieurs études ont confirmé le lien entre colonisation préalable et infection secondaire. En effet, les porteurs permanents de *S. aureus* au niveau nasal présentent un risque significativement augmenté d'infection à *S. aureus* [32]. Dans une étude prospective de cohorte incluant 14000 patients non chirurgicaux, Wertheim et al. ont montré que le risque de bactériémies nosocomiales à *S. aureus* était multiplié par 3 chez les patients porteurs de *S. aureus*

au niveau nasal [33]. L'analyse moléculaire comparative de ces souches de *S. aureus* affirmait une origine endogène dans 80 % des cas. Pujol et al. ont mis en évidence chez des patients présentant une bactériémie nosocomiale à *S. aureus*, que la porte d'entrée la plus fréquente était l'infection liée au cathéter, et que la colonisation préalable multipliait par 12 le risque de bactériémie nosocomiale [9].

Plusieurs études ont souligné le rôle de l'antibiothérapie préalable dans l'acquisition des bactéries multi-résistantes, telles que les EBLSE [18] ou encore les EPC [19]. De même, l'antibiothérapie semble avoir un rôle majeur dans l'acquisition et le maintien d'espèces saprophytes comme *Pseudomonas aeruginosa* dans le microbiote intestinal. [20,21]. Thuong et al. [22] ainsi que Boyer et al. [23] ont rapporté des taux d'acquisition de *P. aeruginosa* de 26 et 16% respectivement, l'antibiothérapie de plus de trois jours et la présence au sein de l'unité d'au moins un patient colonisé par *P. aeruginosa* étaient les deux facteurs indépendants associés à l'acquisition.

Concernant les EBLSE, il semblerait que l'infection soit un épisode rare comparativement à la colonisation. Il a été rapporté que 10 à 15 % des patients porteurs d'EBLSE s'infectent secondairement avec leur souche de colonisation [32]. Toutefois, ce chiffre est variable en fonction de la durée de l'étude et des caractéristiques de la population étudiée. Dans une étude effectuée sur une durée de dix ans, chez des patients transplantés hépatiques, les auteurs suggéraient une augmentation du risque de bactériémie chez les patients porteurs d'entérobactéries BLSE [30]. Les auteurs ont mis en évidence une augmentation du risque d'infection en cas de portage préalable (OR = 18,4 ; IC 95 % : [7,1–47,5] ; $p < 0,0001$). Ainsi, Pour les bactéries commensales résistantes du tube digestif ou pour les bactéries saprophytes, une modification ou altération du microbiote intestinal semble nécessaire pour passer de la colonisation à l'infection [32].

VI - Prévention des infections associées aux soins

La prévention des infections associées aux soins nécessite un programme contrôlé qui doit intégrer parallèlement la maitrise de la pression de colonisation et diffusion de BMR qui comporte à la fois une campagne de promotion de l'hygiène des mains, une mise en place des prélèvements de dépistage ciblés des porteurs de BMR à l'admission, un respect systématique des précautions standard et additionnelles ainsi que l'entretien de l'environnement hospitalier.

1 - Dépistage des patients à l'admission

Afin d'identifier les patients porteurs de BMR, un dépistage à l'admission est recommandé et poursuivi en cours de séjour (dépistage hebdomadaire).

Le dépistage des patients à l´admission est essentiel dans la surveillance des BMR qui peut présenter deux aspects : d'une part, la surveillance passive basée uniquement sur les résultats des prélèvements à visée diagnostique. Elle est souvent prescrite par les cliniciens dans le but de diagnostiquer une infection. D'autre part, la surveillance active basée sur le dépistage ciblé pour identifier les patients qui sont colonisés mais non infectés. Ce dépistage permet d'augmenter le nombre de porteurs identifiés, qui seraient restés méconnus, mais néanmoins constituer un réservoir de dissémination de BMR.

Intérêt du dépistage

L'intérêt du dépistage réside dans la possibilité d'identification précoce du réservoir de BMR chez les patients porteurs, ce qui permet de mettre en place rapidement des mesures de prévention de la transmission croisée. De nombreuses études réalisées dans différents types de services ont montré qu'en absence de politique de dépistage à l'admission des patients, une proportion importante de porteurs de BMR restait non identifiée. Cette population représente un réservoir de dissémination de BMR. Dans une étude multicentrique comprenant 14 services de réanimation en France, Lucet et al. En 2005 ont montré que 54,3% des patients identifiés comme porteurs n'auraient pas été détectés sans le dépistage [34].

2 - Précautions standards

La mise en place de mesures rigoureuses d'hygiène réunis sous l'appellation "précautions standards" ont formellement prouvé leur efficacité en diminuant le risque de transmission croisée et le taux d'infections associées aux soins. L'objectif de ces précautions est double ; assurer la qualité des soins dispensés aux patients et assurer la sécurité des soignants (figure 1). Ces précautions « standard » PS sont au nombre de six :

- Hygiène des mains.
- Équipements de protection individuelle : (port de gants, masque, lunettes etc…).
- Hygiène respiratoire.
- Prévention des accidents avec l'exposition au sang.
- Gestion des excréta.
- Gestion de l'environnement [35].

La gestion de l'environnement est détaillée dans le paragraphe suivant. En effet, Cet élément a été étudié dans le SNRN du CHU Hassan II, dans un cadre global de prévention de la transmission croisée des BMR dans le service.

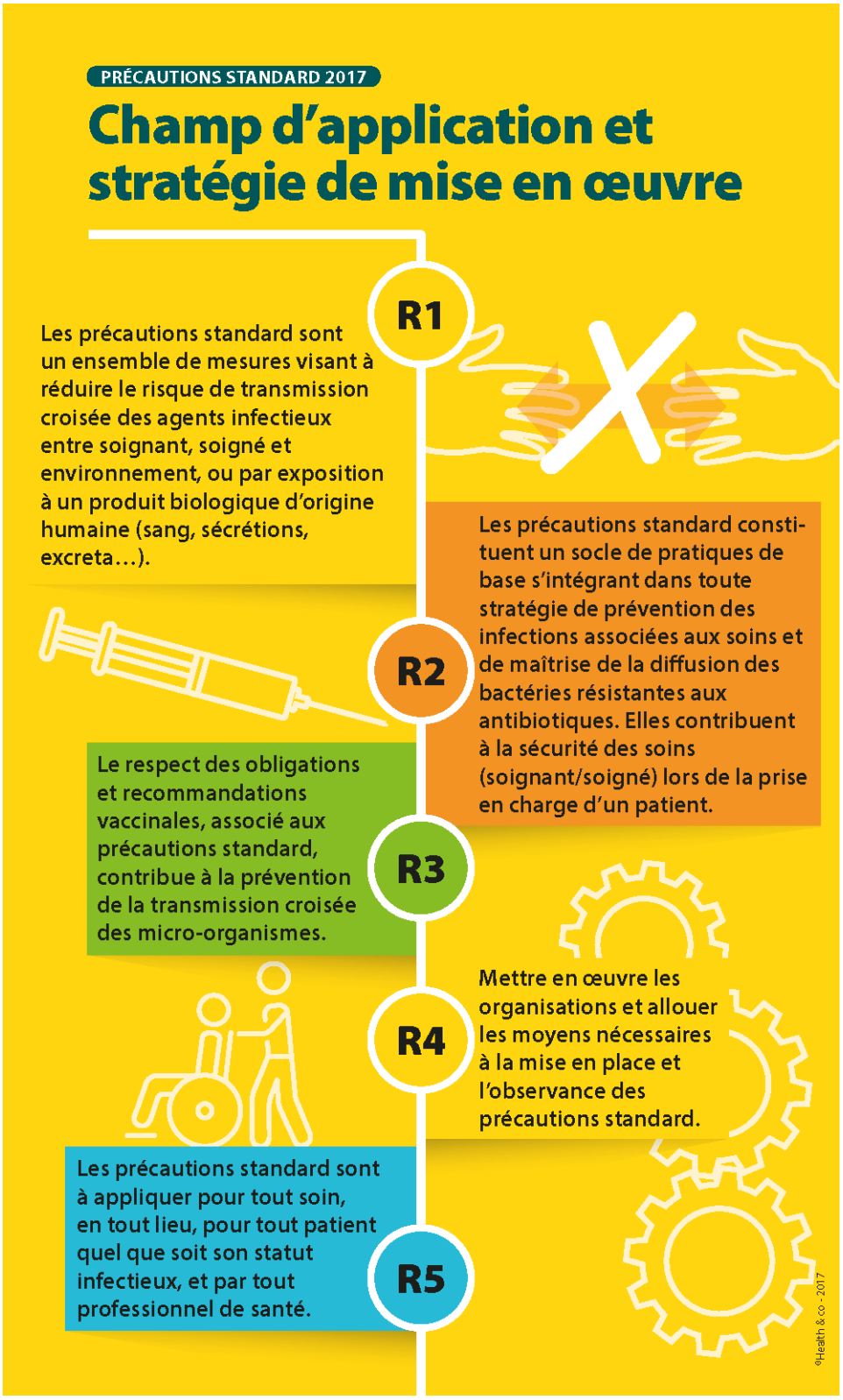


Figure 1 : Précautions standards recommandés par la société française d'hygiène hospitalière [35]

3 - Gestion de l'environnement

La transmission des pathogènes dans les hôpitaux est complexe ; Cependant, le plus souvent, les patients acquièrent des microorganismes via les mains contaminées des professionnels de santé, l'utilisation d'équipement contaminé ou la contamination de la chambre d'un occupant antérieur. Plusieurs lignes directrices relatives à l'hygiène des mains et à l'utilisation d'équipements de protection individuelle, ainsi qu'au nettoyage et à la désinfection de l'environnement de soins ont été publiées.

L'environnement hospitalier comprend les dispositifs médicaux, les surfaces, l'air, l'eau, les aliments, le linge, et les déchets [35]. Cet environnement peut constituer un réservoir important de microorganismes d'origine humaine ou environnementale [36]. Sa contamination varie qualitativement et quantitativement dans le temps, d'un établissement à un autre et au sein d'un même établissement, en fonction des services, des patients, des soins et des techniques pratiquées.

II a été démontré que l'environnement proche d'un patient porteur de BMR aux antibiotiques peut se retrouver à son tour contaminé et servir de réservoir secondaire à d'autres contaminations [37].

A - Les micro-organismes présents dans l'environnement hospitalier

Des bactéries, des virus, des spores et des champignons sont excrétés par des patients (et parfois par le personnel) infectés et/ou colonisés dans l'environnement hospitalier. L'environnement immédiat des patients porteurs est en général fortement contaminé par ces micro-organismes. Des bactéries pathogènes souvent multi-résistantes sont présentes dans l'environnement hospitalier, y compris *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), les entérobactéries sécrétrices de β-lactamases à spectre élargi (BLSE), les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), *Acinetobacter baumannii* multi-résistant, *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistant, *Clostridium difficile* et le norovirus. Tous ces microorganismes ont la capacité de survivre dans l'environnement sec, et peuvent devenir une source de transmission.

B - Contamination de l'environnement hospitalier par des micro-organismes

Les patients représentent la principale source de contamination. Ainsi, les surfaces proches des patients fréquemment touchées par les professionnels de la santé (et les patients adultes) appelées «high-touch surfaces» présentent une contamination plus élevée que celle des autres surfaces [38]. Une étude récente a identifié les surfaces fortement touchées sur la base de la

fréquence de contact observée, et qui sont : les rampes du lit, la surface du matelas et le chariot d'alimentation [39].

La contamination des surfaces et par la suite la survenue d'une infection dépend non seulement de la présence des micro-organismes dans le réservoir environnemental, mais aussi de l'association de nombreux autres facteurs notamment la qualité du bionettoyage, la durée de vie du micro-organisme sur un support inerte et sa capacité à adhérer à la surface et produire un biofilm.

* **Qualité du bionettoyage**

Le « bionettoyage » est défini comme un procédé destiné à réduire la contamination biologique des surfaces (norme NF X 50-790, Activités de service de nettoyage industriel - lexique de la propreté). Il est obtenu par la combinaison : d'un nettoyage, d'une évacuation de la salissure et des produits utilisés et de l'application d'un désinfectant. Le terme de bionettoyage est souvent employé en pratique pour désigner les opérations d'entretien des locaux. Il est d'usage de parler par exemple d'une équipe de bionettoyage (équipe d'agents ayant en charge l'entretien des locaux). L'entretien des locaux concerne les étapes de nettoyage-désinfection permettant une maîtrise du niveau de contamination microbienne de l'environnement

En absence d'un bionettoyage efficace, les micro-organismes peuvent survivre au niveau des surfaces d'une manière prolongée ; *Staphylococcus aureus* peut survivre sur des surfaces pendant une semaine [40].

***La survie des micro-organismes dans l'environnement**

La survie des micro-organismes dans l'environnement est de durée très variable. Elle dépend de différents facteurs comme la nature du germe, la température, le taux d'humidité, le type de surfaces et leur degré de salissure en particulier leur teneur en matières organiques (biofilm).

Plusieurs travaux ont évalué la durée de survie des micro-organismes dans l'environnement. *Acinetobacter sp.* sont particulièrement redoutable dans l'environnement car elles «collent» aux surfaces, et sont facilement transportés par le personnel soignant d'un site à un autre. *Staphylococcus aureus* représente une espèce présentant une certaine résistance à la dessiccation et peut survivre plusieurs semaines sur des surfaces sèches tout autant que *Pseudomonas aeruginosa* [41].

***Capacité d'un micro-organisme à adhérer à une surface et produire un biofilm**

L'adhésion et la multiplication des bactéries sur de nombreux supports (matériels, équipement, surfaces, sols, eau, …) représentent le facteur clé de la contamination microbiologique de l'environnement. Cela contribue à la formation du biofilm qui constitue un réservoir important de microorganismes. Après sa fragmentation, ce biofilm 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 [42]. 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. Le choix des matériaux utilisés dans les surfaces environnementales semble être important. Ainsi, différents matériaux ont été testés notamment le vinyle, l'acier inoxydable, le formica et le tissu, et ont été inoculées avec des BMR notamment *K. pneumoniae, E. coli* et *Enterobacter sp.* afin d'évaluer la capacité de survie des organismes jusqu'à 72 heures [41]. A part *K. pneumoniae* sur la surface de Formica, tous les agents pathogènes ont survécu à moins de 15% en 24 heures et toutes les cultures à 72 heures étaient négatives [41].

C - Place de l'environnement hospitalier dans la chaine épidémiologique

La chaine épidémiologique de transmission d'agents infectieux est caractérisée par un réservoir émetteur et un réservoir récepteur reliés par un mode de transmission. Cette transmission des agents pathogènes entre un patient colonisé / infecté à un autre patient susceptible se produit le plus souvent à travers les mains des professionnels de la santé, mais les objets, les surfaces et l'air contaminés peuvent être directement ou indirectement impliqués dans la voie de transmission. D'après Jonathan et coll., les différentes voies de transmission directe ou indirecte d'un patient colonisé / infecté à un autre patient susceptible d'acquérir des agents pathogènes sont représentées dans la figure 2 [43].

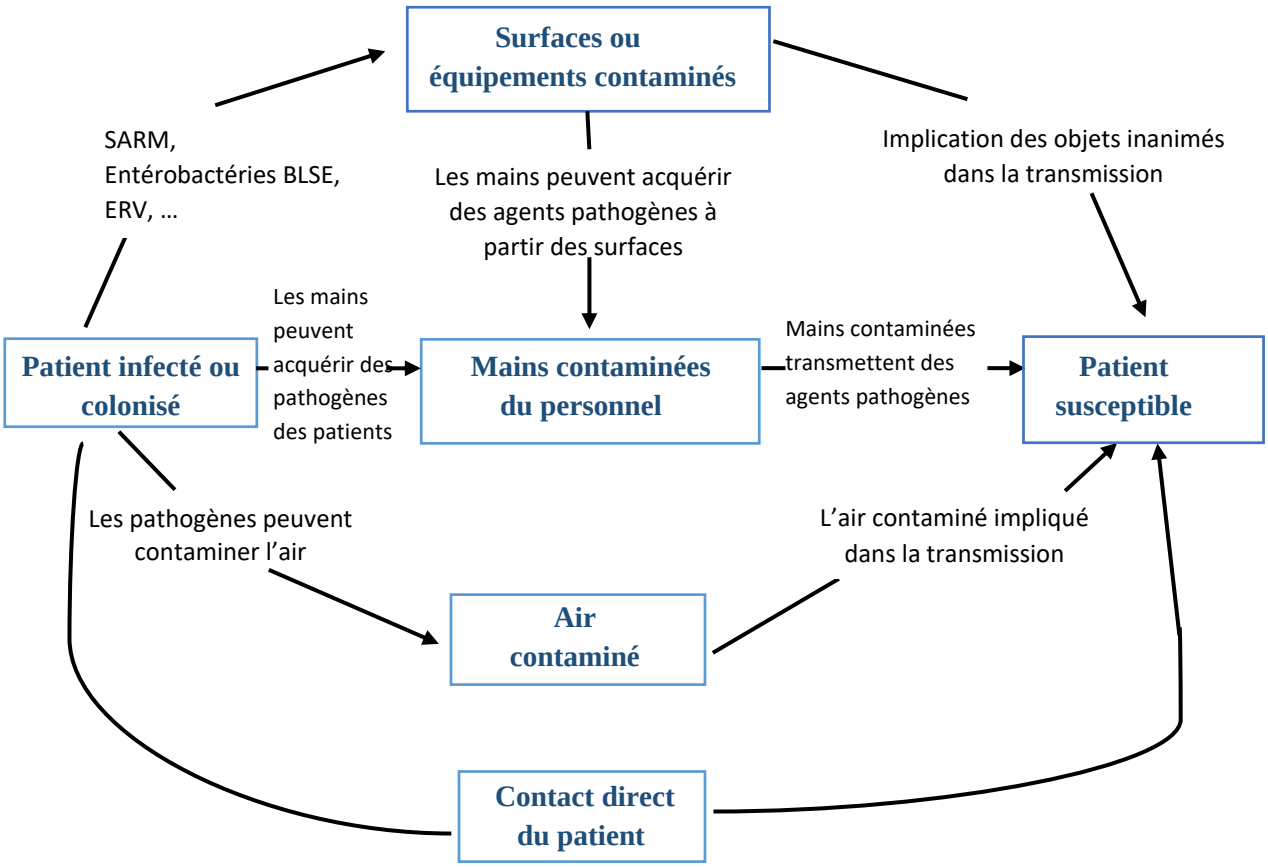


Figure 2 : Voies de transmission directe ou indirecte d'un patient colonisé / infecté à un autre patient **[43]**

D - Rôle de l'environnement dans la survenue des infections associées aux soins

L'environnement hospitalier est impliqué notamment lors d'infections associées aux soins survenant sur un mode épidémique. La présence du micro-organisme dans le réservoir environnementale n'est pas à elle seule une condition suffisante pour impliquer ce réservoir dans la survenue d'une infection. Ainsi, plusieurs facteurs possédant chacun des niveaux de responsabilité différents sont nécessaires :

- Les micro-organismes (type pathogène ou opportuniste, taille de l'inoculum et virulence).
- La voie de transmission (dispositif médical, air, liquide, surfaces).
- La porte d'entrée (procédure invasive ou non).
- L'état immunitaire du patient récepteur.

La résponsabilité de l'environnement comme source de colonisation et/ou infection pourait être facilement établie comme il a été montré dans un travail réalisé dans un service de réanimation

et qui a concerné le suivi pendant 7 mois de patients ventilés et de leurs environnement comme source de contamination et d'infection par *P. aeruginosa* [44].

E - Maitrise du risque infectieux liée à l'environnement hospitalier

la surveillance microbiologique de la résistance dans l'environnement hospitalier est un élément important dans la politique de prévention de l'infection associée aux soins,. Elle permet de prévenir la transmission des BMR, ainsi que mettre en œuvre des mesures correctives lorsqu'un mauvais résultat est rendu.

D'une manière générale, les établissements de santé doivent mettre en place des protocoles de nettoyage et de désinfection pour maîtriser la contamination environnementale par des microorganismes multi-résistants. Le nettoyage doit être fréquent et minutieux pour les surfaces fréquemment en contact avec les mains des patients et du personnel, tels que les barres de lits et les poignées de portes, mais également les téléphones et les claviers d'ordinateurs. L'utilisation de produits détergents désinfectants courants est suffisante [45].

Dans les services de néonatologie, les incubateurs notament les couveuses peuvent constituer un risque potentiel de transmission des microorganismes vers les nouveau-nés, si les procédures de désinfection de ces incubateurs ne sont pas respectées. Néanmoins, la couveuse protège les nourrissons contre les infections bactériennes et contre les autres agents de contamination pour lesquels le milieu chaud et humide est très favorable.

Chapitre II - Antibiotiques et résistance bactérienne

I - Les antibiotiques

Un antibiotique est une molécule naturelle ou semi-synthétique, qui détruit ou bloque la croissance des bactéries et dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose. Les antibiotiques sont classés selon la nature chimique, le site d'action spécifique à chacun, le spectre antibactérien et les modalités d'action.

1 - Classification

La classification des antibiotique est multiple, elle peut se faire selon :

- La nature chimique car il existe souvent une structure de base sur laquelle il y a une hémi-synthèse définissant ainsi une famille d'antibiotique (Ex : β-lactamines).
- Les modes d'action spécifiques à chacun sont soit :
  - L'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne (β-lactamines, glycopeptides, fosfomycine).
  - L'inhibition de la synthèse protéique (aminosides, cyclines, phénicolés, acide fusidique, macrolides, oxazolidinones, mupirocine, synergistines).
  - L'action sur la synthèse des acides nucléiques (quinolones, nitroimidazolés, rifamycines, sulfamides triméthoprime).
  - L'action sur les membranes (polymyxines, daptomycine) [46].
- Le spectre antibactérien représente l'ensemble des bactéries sur lesquelles l'antibiotique est actif et permet de prévoir son potentiel ainsi que ses limites. On distingue :
  - Les antibiotiques à spectre large qui sont efficaces sur un grand nombre de types d'agents pathogènes. Ainsi, l'antibiotique sera actif sur une grande partie de tous les cocci et tous les bacilles. Ils sont utilisés lorsque la bactérie n'est pas identifiée et que la pathologie peut être due à différents types d'agents pathogènes.
  - Les antibiotiques à spectre étroit qui sont efficaces sur un nombre limité d'agents infectieux leur permettant de cibler une pathologie particulière.
- Les modalités d'action :
  - Un effet bactériostatique provoque une inhibition réversible de la croissance de l'organisme cible.

- Un effet bactéricide entraîne la mort de celui-ci.

Le tableau 1 représente les classes majeures des antibiotiques. Dans la suite du chapitre, comme nous avons travaillé dans cette étude sur les β-lactamines, nous avons détaillé cette famille d'antibiotiques en précisant les différentes classes, les mécanismes d'action et la résistance des bactéries.

Tableau 1 : Classes majeures des antibiotiques et leurs modes d'action

Classe d'antibiotique	Sous-classe	Exemples	Bactéricide / Bactériostatique
B-lactamines	Pénicilline	Amoxicilline	**Bactéricide**
	Monobactame	Aztréoname	
	Carbapénème	Méropénème, Imipénème	
	Carbacépheme	Loracarbefe	
	Céphalosporines 1G	Céfalotine	
	Céphalosporines 2G	Céfaclor, Cefuroxime	
	Céphalosporines 3G	Céfotaxime, Céftazidime	
	Céphalosporines 4G	Céfépime	
	Céphalosporines 5G	Céftobiprole	
Polypeptides		Polymixine-B, Colistine	**Bactéricide**
Lipopeptides		Daptomicine	**Bactéricide**
Glycopeptides		Téichplanine, Vancomycine,	**Bactéricide**
Fosfomycine		Fosfomycine	**Bactéricide**
Aminoglycoside		Gentamicine, Amikacine,	**Bactéricide**
Lincosamides		Lincomysine, Clindamycine	**Bactériostatique**
Macrolides		Erythromicine, Spectinomycine	**Bactériostatique**
Quinolones		Ciprofloxacine, Acide Nalidixique	**Bactéricide**
Sulphonamides		Sulphametizole	**Bactériostatique**
Tetracyclines		Tetracycline, Doxycycline	**Bactériostatique**
Oxazolidinoes		Linezolides	**Bactériostatique**
Diaminopyrimidin		Trimethoprime, Iclaprime	**Bactériostatique**
Nitroimidazole		Metronidazole	**Bactéricide**
Rifamycines		Rifampicine, rifabutine	**Bactéricide**

2 - β-lactamines

A l'heure actuelle, les β-lactamines demeurent les molécules les plus utilisées dans le traitement des infections dues aux entérobactéries. C'est la famille d'antibiotiques la plus diversifiée et la plus importante, grâce à son large spectre d'action, son efficacité, sa faible toxicité et à son faible coût.

Les molécules de β-lactamines sont naturelles ou hémi-synthétiques. Elles interviennent au niveau de la phase finale de la synthèse du peptidoglycane, en agissant sur les protéines liant les pénicillines (PLP) et bloquant ainsi la synthèse de la synthèse de la paroi bactérienne [47].

3 - Structure des β-lactamines

Les β-lactamines se caractérisent par la présence d'un noyau bêta-lactame nitré à quatre sommets [48]. A partir de ce cycle, quatre sous-familles ont été développées par adjonction de chaînes latérales : les pénicillines (ou pénames), les céphalosporines (ou céphèmes), les monobactames et les carbapénèmes (Figure 3).

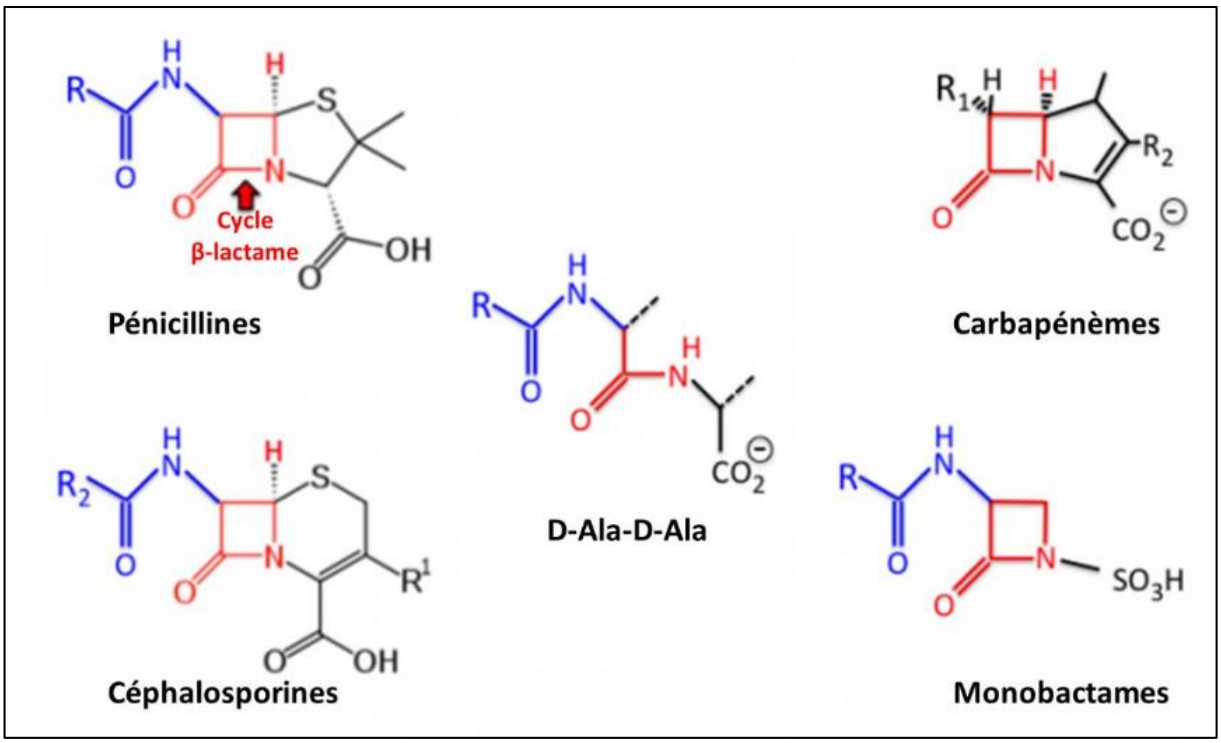


Figure 3 : Structures desβ-lactamines et du dipeptide D-Ala-D-Ala [48]

4 - Familles des β-lactamines

Les β-lactamines comprennent différentes familles, dont les principales utilisées en thérapeutiques humaines sont les suivantes :

A - Pénicillines

Les pénicillines sont dérivées de l'acide 6-pénicillanique, elles regroupent plusieurs sous-groupes, qui varient selon le spectre d'action des pénicillines [49].

B - Céphalosporines

Elles présentent des dérivées de l'acide-7-aminocéphalosporanique. Elles ont une structure qui leur permet de mieux résister à l'action diverse des β-lactamases. Il existe cinq générations de céphalosporines classées selon leur date de mise sur le marché et leur spectre d'activité [49].

- **Céphalosporines de 1ème génération (C1G)** : sont actives sur les cocci à Gram positif (streptocoques et staphylocoques méti-S), quelques entérobactéries (*E. coli, Proteus mirabilis, Klebsiella*). Elles sont utilisées dans l'angine streptococcique, dans les épisodes d'exacerbations de bronchite chronique, et d'antibioprophylaxie en chirurgie (forme injectable)
- **Céphalosporines de 2ème génération (C2G)** : actives sur les cocci Gram +, quelques entérobactéries. Elles sont utilisées dans les infections de la sphère ORL récidivante, dans les épisodes d'exacerbations de bronchite chronique
- **Céphalosporines de 3ème génération (C3G)** : sont les antibiotiques de choix dans le traitement des infections sévères à entérobactéries, grâce à leur spectre étendu. Cependant, ces molécules sont hydrolysées par les céphalosporinases hyper-produites ainsi que par les β-lactamases à spectre étendu (BLSE) ;
- **Céphalosporines de 4ème génération (C4G)** : sont relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases de types AmpC. Elles sont à large spectre et présentent une meilleure résistance à l'hydrolyse par les céphalosporinases hyper-produites.
- **Céphalosporines de 5ème génération (C5G) : sont** actifs sur le SARM et *Pseudomonas aeruginosa*

C - Carbapénèmes

Les carbapénèmes possèdent un très large spectre antibactérien et sont stables envers la quasi-totalité des β-lactamases. Ils sont très actifs sur les entérobactéries, y compris les souches

productrices de BLSE et celles productrices de céphalosporinases à haut niveau. Ce sont des molécules utilisées en derniers recours sur des BMR ou en traitement probabiliste large [50].

D - *Monobactames*

Ce sont des *β-lactamines* monocycliques, tel que l'aztréonam. Ils sont très actifs sur les entérobactéries [49].

5 - *Mécanisme d'action des β-lactamines*

Les β-lactamines sont des acides plus ou moins forts, qui traversent difficilement la membrane bactérienne. Ce sont des analogues de la terminaison D-alanine-D-alanine des précurseurs de la synthèse du peptidoglycane ou muréine (figure 4). Ils inhibent la synthèse de la paroi, en se fixant par une liaison covalente aux protéines liant les pénicillines (PLPs), comme les transpeptidases, les transglycosidases et les carboxypeptidases. De ce fait, la liaison PLP-β-lactamines empêche la synthèse du peptidoglycane en inhibant la transglycosylation et la transpeptidation (effet bactériostatique), et entraine une activation endogène des autolysines bactériennes (effet bactéricide).

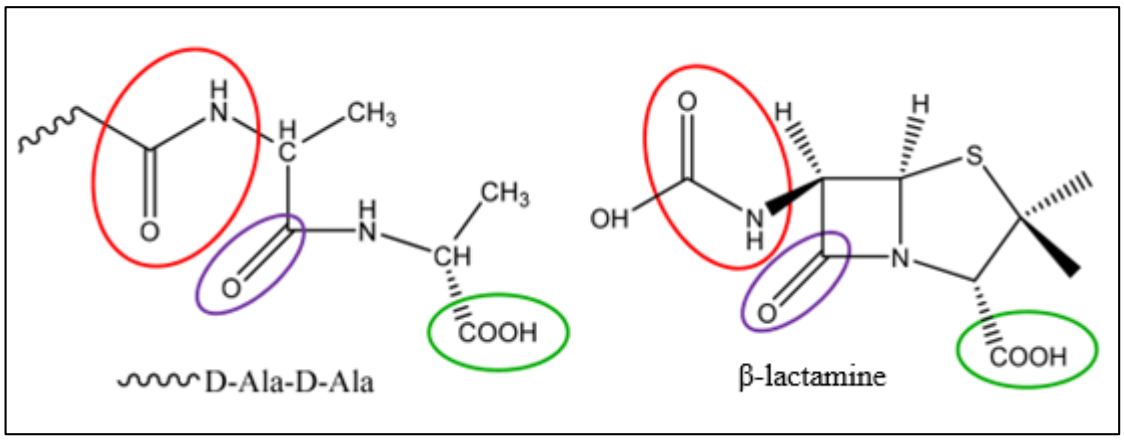


Figure 4 : analogie structurale

II - Résistance bactérienne aux β-lactamines

Une souche bactérienne est dite résistante lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe la majorité des souches de la même espèce**.** La résistance peut être naturelle ou acquise :

- Naturelle : caractéristique à une espèce bactérienne et elle est partagée par toutes les souches de cette espèce (tableau 2),

- Acquise : Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation [51] ou d'une acquisition de matériel génétique étranger [52]. Le transfert de ces gènes est facilité après leur intégration sur des éléments mobiles tels que les plasmides, les transposons, les intégrons ou encore sur des phages [53,54].

Tableau 2 : Résistances naturelles aux β-lactamines chez les entérobactéries (CA-SFM, 2013) [55].

Espèces	**AM**	**AMC**	**TIC/PIP**	**C1G**	**FOX**	**MA**
Klebsiella spp	R		R	R		
E. hermanii	R		R	R		
C. koseri	R		R	R		
C. freundii	R	R		R	R	
E. cloacae	R	R		R	R	
E. aerogenes	R	R			R	
H. alvei	R	R				
S. marcescens	R	R				R
P. mirabilis						
P. vulgaris, P. penneri	R			R		R
M. morgannii	R	R		R		
P. stuartii	R	R		R		
P. retgerri	R	R	R	R	R	
Y. enterocoletica	R	R		R		R

R : résistance naturelle ; AM : aminopénicillines; AMC : amoxicilline + acide clavulanique; TIC : ticarcilline; PIP : pipéracilline ; C1G : céphalosporines de 1ère génération; FOX : céfoxitine; MA : céfamandole; CXM : céfuroxime.

1 - Epidémiologie de la résistance aux β-lactamines

Dans le cadre de la mlti-résistance des BMR, le mécanisme de résistance aux β-lactamines se traduit dans 80 % des cas par la production de β-lactamases à spectre élargi (BLSE). A l'échelle mondiale, une augmentation des entérobactéries BLSE (E-BLSE) est observée parmi l'ensemble des souches isolées de prélèvements à visée diagnostique réalisés dans les établissements de santé [56]. Au Maroc, le taux d'isolats d'E-BLSE varie entre 20% et 42,85% [57–59]. La prévalence des bactéries BLSE est également à la hausse dans les pays développés. En Europe, cette prévalence d'E-BLSE varie de 2% notés en Suède jusqu'à 80% en Bulgarie et en Asie [60].

D'autre part, la résistance aux carbapénèmes suscite un intérêt considérable car les carbapénèmes représentent les "antibiotiques de dernier recours" pour les infections sévères causées par des BMR, menant souvent aux échecs thérapeutiques [61]. A ce titre, la dissémination des carbapénèmases type New Delhi Metalo-bêta-lactamase (NDM) occasionne de vives inquiétudes en raison de sa dissémination intercontinentale et de son impact clinique très important [62]. Les recherches menées en Inde et au Pakistan révèlent une augmentation alarmante et rapide de la prévalence des entérobactéries productrices du NDM. Le taux de prévalence est de 6,9% dans un hôpital en Inde à 18,5%, au Pakistan [63].

Au Maroc, 6% des isolats cliniques producteurs de carbapénèmases ont été rapportées. Ces bactéries se sont avérées également sécrétrices de BLSE [64].

2 - Mécanismes de résistance aux β-lactamines

Chez les BGN, on définit le mécanisme de résistance **enzymatique par inactivation des β-lactamases** et le mécanisme **non enzymatique qui comprend :** les phénomènes d'imperméabilité, d'efflux, et la faible affinité pour les protéines liant les pénicillines (PLP).

A - Mécanismes de résistance non enzymatique

a - Diminution de la perméabilité de l'antibiotique

La perméabilité membranaire contrôle la concentration de différentes classes d'antibiotiques comme les β-lactamines à travers l'expression des porines ou des transporteurs-pompes [65]. Il a été rapporté chez des isolats résistants aux antibiotiques (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas* ou *Serratia*) que la disparition des porines a été associée à la production d'enzymes bactériennes détruisant le cycle β-lactame (β-lactamases, céphalosporinases), qui est un élément clé dans la résistance aux β-lactamines. Chez

Pseudomonas aeruginosa par exemple, la disparition d'une porine spécifique a été rapportée dans le cas de résistance à l'imipénème (figure 5) [66].

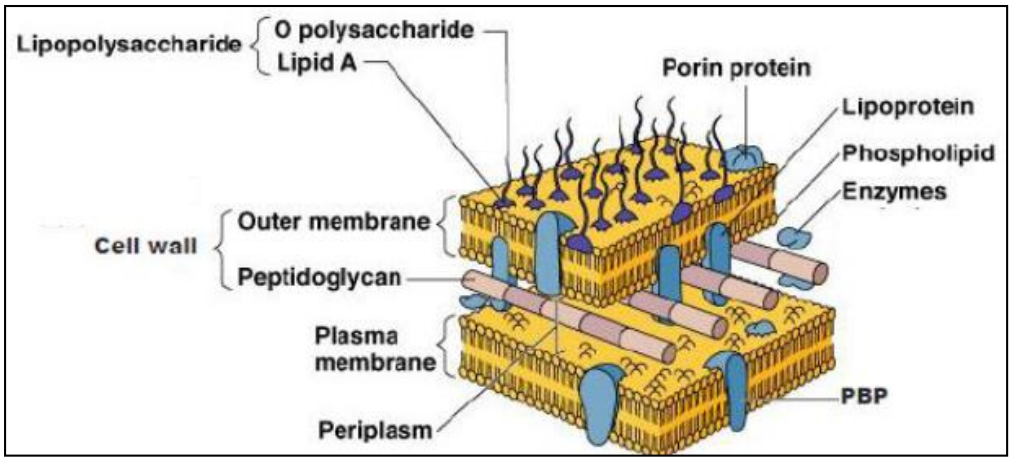


Figure 5 : Structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatifs [65]

b - Efflux actif de l'antibiotique

Les systèmes d'efflux actifs conduisent à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (ex : quinolones), et confère généralement des résistances de bas niveau. Une surexpression de ces systèmes d'efflux constitutifs suite à des mutations dans les régions régulatrices, confère une multi-résistance aux antibiotiques. C'est l'exemple de la mutation des gènes *marRAB* d'*Escherichia coli* qui entraînent une résistance aux quinolones. Chez *Klebsiella pneumoniae*, le gène *acrRP* code pour un système de pompe à efflux [67].

c - Modification de la cible des β-lactamines

Ce type de résistance se manifeste par la modification des PLP qui sont les cibles des β-lactamines et qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane. Trois mécanismes peuvent intervenir :

- diminution de l'affinité des PLP pour les bêta-lactamines. Exemple de *Streptococcus pneumoniae* où les béta-lactamines ont du mal à se fixer aux PLP qui restent disponibles pour la synthèse du peptidoglycane ;

- augmentation de la synthèse des PLP existantes avec hyper-expression de PLP possédant naturellement une faible affinité pour les bêta-lactamines (ex. : Enterococcus spp);

- synthèse d'une ou de plusieurs nouvelles PLP insensibles aux bêta-lactamines comme pour *Staphylococcus aureus* dont la résistance à la méthicilline se développe par acquisition d'un gène mecA)

B - Mécanismes enzymatiques par production de β-lactamases

Chez les entérobactéries, le mécanisme prédominant de résistance aux bêta-lactamines est la production d'enzymes appelés *β-lactamases* [68]. Ces bêta-lactamases hydrolysent les bêta-lactamines en ouvrant le cycle bêta-lactame au niveau du pont amide, menant à la perte d'un groupement carboxyle, pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif, provoquant ainsi l'inactivation de l'antibiotique en question [49].

La résistance aux β-lactamines se manifeste souvent par la production d'enzymes telles que les β-lactamases à spectre élargi (BLSE), céphalosporinases (CASE) et carbapénèmases (CARBA).

-Résistance par production de BLSE : les BLSE sont des β-lactamases capables d'hydrolyser une large gamme de bêta-lactames, notamment les pénicillines, les céphalosporines et les monobactames, mais pas les céphamycines et les carbapénèmes. Ils sont généralement inhibés par les inhibiteurs classiques de la bêta-lactamase.

-Résistance par production de CASE : les CASE sont des β-lactamases qui peuvent conférer une résistance aux pénicillines et à la plupart des céphalosporines (y compris les céphamycines) mais sont peu ou pas actifs contre les monobactames et les oxyiminocéphalosporines zwitterioniques (tels que le céfépime et le céfpirome) et les carbapénèmes.

-Résistance par production de CARBA : les CARBA sont des β-lactamases qui peuvent hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes.

a - Classification des β-lactamases

Il existe 2 types de classification des bêta-lactamases. La première est faite selon les bases moléculaires (classification d'Ambler) et la deuxième est basée sur les phénotypes de résistances aux β-lactamines (classification de Bush).

i - Classification d'Ambler

Cette classification a été proposée par Ambler en 1980, elle permet de grouper les β-lactamases en quatre classes en fonction de leurs homologies structurales ; les β-lactamases de classe A, B, C *et* D. Cette classification est la plus utilisée en pratique médicale.

- Les β-lactamases de classe A : ce sont des pénicillinases qui constituent le groupe le plus important. Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines (amoxicilline, ticarcilline, pipéracilline) et sont sensibles aux inhibiteurs de β-lactamases tel que l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam). Selon Ambler, les β-lactamases à spectre élargie appartiennent à cette classe.
- Les β-lactamases de classe B ou métallo-β-lactamases : ce sont principalement des carbapénèmases comme VIM et IMP, elles hydrolysent toutes les β-lactamines sauf l'aztréonam. Elles sont résistantes aux IβL classiques mais sont inactivées *in vitro* par des agents chélateurs d'ions bivalents comme l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique).
- Les β-lactamases de classe C : ce sont des céphalosporinases de type AmpC, qui hydrolysent préférentiellement les céphalosporines (céfalotine, ceftazidime, céfuroxime).
- Les β-lactamases de classe D : ce sont des oxacillinases, qui constituent une famille extrêmement composite en termes de spectre d'hydrolyse. Elles hydrolysent plus rapidement l'oxacilline et la cloxacilline que la benzylpénicilline. Les oxacillinases classiques sont inhibées *in vitro* par le chlorure de sodium.

ii - Classification de Bush

La classification de Bush-Jacobi-Medeiros est basée sur le phénotype de résistance aux β-lactamines prenant en considération le profil de substrat et celui d'inhibition**.** Elle reste malgré tout peu utilisée en pratique médicale. Cette classification est plus ramifiée par la présence de sous-classes pour les β-lactamases de classe A (2a, 2b, 2be…). Les enzymes de type BLSE font partie du groupe 2be. Le tableau 3 regroupe les deux classifications structurale et fonctionnelle des β-lactamases d'après Ambler et Bush, ainsi que leurs caractéristiques.

Tableau 3 : Classification structurale et fonctionnelle des β lactamases d'après Ambler et Bush

Classification		Enzyme	Activité enzymatique préférentielle							Activité inhibitrice	
Ambler	**Bush**		PEN	CarboxyP	Oxa	CIG	C3G	ATM	IMP	Ac Clav	EDTA
A	2a	Pénicillinase à spectre restreint	+++	++	-	+/-	-	-	-	+++	-
	2b	Pénicillinase à large spectre	+++	++	+	++	-	-	-	+++	-
	2be	BLSE	+++	++	+	++	++	++	-	+++	-
	2br	TEM résistantes aux inhibiteurs	+++	++	+	+/-	-	-	-	-	-
	2c	Carbénicillinases	++	+++	+	+	-	-	-	+	-
	2e	Céfuroximases	++	++	-	++	+	-	-	+++	-
	2f	Carbapénèmases	++	+	+	+	+	++	++	+	-
C	1	Céphalosporinases	++	+	-	+++	+	-	-	-	-
D	2d	Oxacillinases	+	+++	V	V	-	-	V	-	-
B	3	Carbapénèmases	++	++	++	++	++	++	++	-	++

L'efficacité enzymatique et l'activité des molécules inhibitrices sont indiquées par les signes + et –

PEN : Pénicillines ; CarboxyP : Carboxypénicillines ; Oxa : Oxacilline, CIG : Céphalosporines1G ; C3G : Céphalosporines 3G ; ATM : Aztréonam ; IMP : Imipénème ; Ac Clav : Acide clavulanique ; V : variable ; EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique.

b - β-lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les types de BLSE incluent TEM, SHV, OXA et CTX-M. D'autres BLSE telles que les β-lactamases PER, VEB, GES, SFO et IBC ont été décrites mais sont moins fréquentes [69–71].

Les BLSE classiques sont celles dérivées du vaste spectre enzymatique TEM et SHV par l'acquisition de mutations ponctuelles spécifiques qui élargissent leur spectre d'hydrolyse aux oxyimino-céphalosporines et aztréonam [72]. La plupart des BLSE se trouvent chez des bactéries à Gram négatif, y compris *Klebsiella spp., E. coli, P. aeruginosa, Enterobacter spp.* et *Salmonella spp* [73].

i - β-lactamases TEM (Temoniera)

La famille TEM des BLSE a été signalée pour la première fois en 1965 à partir d'un isolat d'*E. coli*. La β-lactamase TEM-1, est capable d'hydrolyser l'ampicilline et les céphalosporines

précoces telles que la céfalotine. En raison de son emplacement sur un plasmide, TEM-1 a été diffusée dans le monde entier et peut être trouvée dans de nombreux membres différents de la famille des entérobactéries [73]. La β-lactamase TEM-2 est le premier dérivé de TEM-1. Elle présente une seule substitution d'acide aminé, mais n'est toujours pas considérée comme une BLSE ayant un profil de substrat identique à TEM-1 (figure 6). TEM-3, isolé pour la première fois de *K. pneumoniae* en 1987, est la première TEM-β-lactamase à présenter le phénotype des BLSE. Actuellement, plus de 190 enzymes β-lactamases de type TEM ont été décrites.

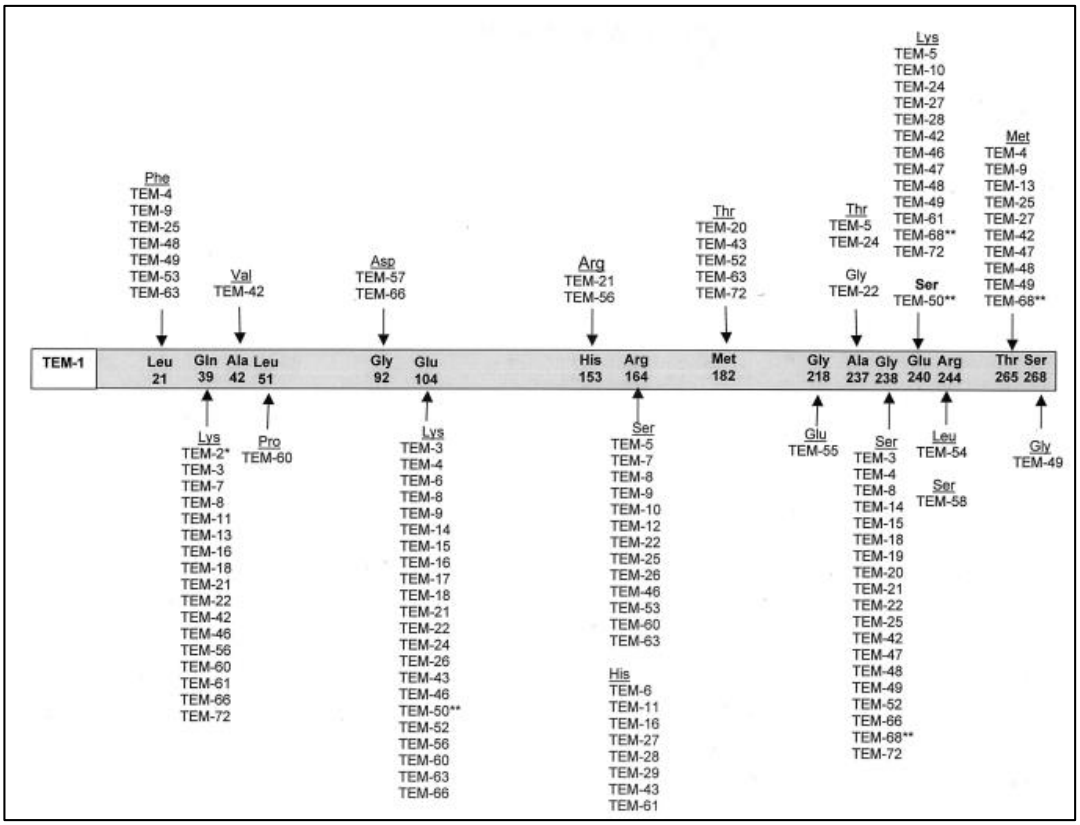


Figure 6 : Schéma des différents BLSE type TEM en fonction de la mutation plasmidique [73]

ii - β-lactamases SHV (Sulfhydryl Variable)

La β-lactamase de type SHV-1 a été décrite pour la première fois en 1972 et confère une résistance à l'ampicilline, à l'amoxicilline, à la carbénicilline et à la ticarcilline. SHV-1 partage une similitude de 68% d'acides aminés avec TEM-1 et possède une structure tertiaire similaire. La majorité des variants du SHV possédant un phénotype de BLSE sont caractérisés par la substitution d'une sérine à la glycine (figure 7) [74]. Les BLSE de type SHV se trouvent principalement dans les souches de *K. pneumoniae*, mais ces enzymes ont été trouvées dans d'autres bactéries à Gram-, y compris *E. coli*, sous forme de β-lactamases à médiation plasmidique. Actuellement, plus de 130 variantes de SHV sont connues.

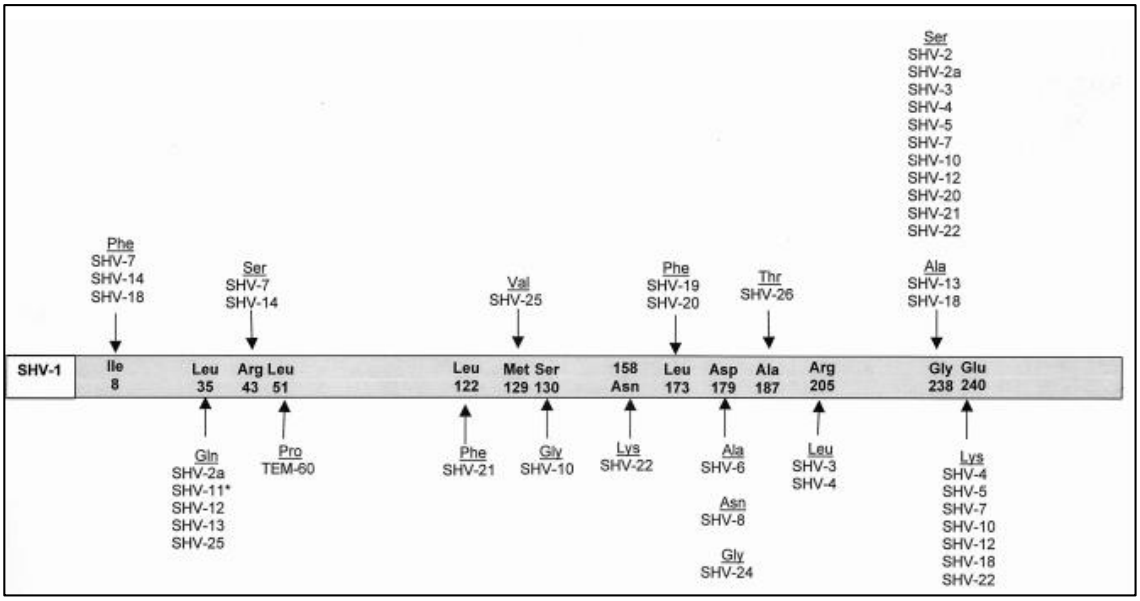


Figure 7 : Schéma des différents BLSE type SHV en fonction de la mutation plasmidique [73]

iii - β-lactamases OXA

Ces β-lactamases appartiennent à la classe moléculaire D et au groupe fonctionnel 2D. Elles confèrent une résistance à la cloxacilline et à la pénicilline. Les gènes *bla* $_{OXA}$ comprennent les β-lactamases chromosomiques d'*Acinetobacter spp*, connues sous le nom d'OXA-51 [75]. Certains de ces gènes ont migré d'*Acinetobacter spp* vers *P. aeruginosa* et, dans une moindre mesure, chez les membres d'*Enterobacteriaceae*, notamment *E. coli* et *K. pneumoniae* [70]. Le transfert des gènes *bla* $_{OXA}$ a presque toujours lieu sur des plasmides.

iv - β-lactamases CTX-M

Le nom «CTX-M» est une abréviation de «céfotaximases Munich». Les β-lactamases de type CTX-M, constituent un groupe d'enzymes codées par un plasmide, capables d'hydrolyser des céphalosporines à large spectre et qui sont inhibées par le clavulanate et le tazobactam.

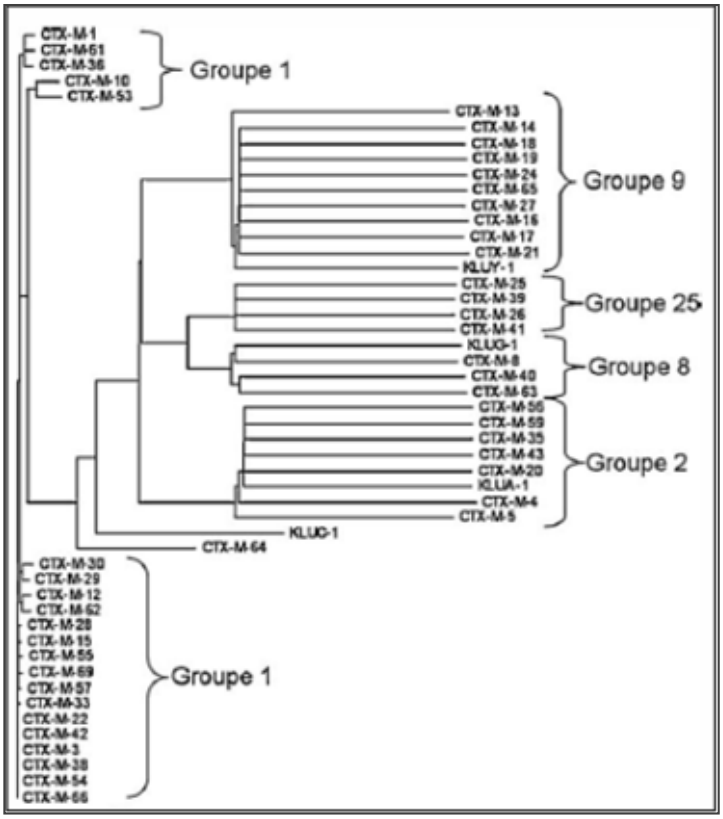


Figure 8 : Arbre phylogénétique de la famille des CTX-M [76]

Les groupes CTX-M sont sous classés par similarités d'acides aminés en cinq groupes différents : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-8 et CTX-M-25 comme le montre la figure 8. Les membres de chaque groupe partagent 94% de similarités de séquence d'acides aminés et 90% de similarités entre les groupes. Plus de 130 variantes différentes de CTX-M ont été décrites jusqu'à présent.

Émergence de CTX-M

Cette classe de β-lactamases est reconnue mondialement comme un mécanisme important de résistance aux céphalosporines utilisée contre les agents pathogènes à Gram-. Les CTX-M-15 et CTX-M-14 sont les enzymes CTX-M les plus importantes que l'on puisse trouver chez l'homme, chez l'animal ainsi que dans l'environnement partout dans le monde [77,78]. CTX-M-15 a été décrite pour la première fois en 1999 à partir d'isolats entériques prélevés dans un hôpital de New Delhi, en Inde [79]. À l'heure actuelle, il a été constaté que CTX-M-15 avait été diffusé dans le monde entier [80].

c - Céphalosporinases

Chez certaines souches appartenant au groupe 3 des entérobactéries, une hyperproduction constitutive d'AmpC peut être observée. Ce phénomène qui est la conséquence de mutations

affectant des gènes de régulation d'AmpC, contribue à rendre ces souches résistantes à l'aztréonam, aux céphamycines et aux C3G. Les C4G restent en général actives. Ce phénotype, appelé « céphalosporinase de haut niveau », se caractérise également par le fait que la résistance aux C3G peut être inhibée par la cloxacilline, mais pas par les IBL. Ce phénotype peut également être observé chez *E. coli* et résulte alors de mutations du promoteur ou d'un gène atténuateur et/ou de duplications du gène de structure. Le phénotype « céphalosporinase de haut niveau » peut aussi avoir un support plasmidique. Il s'agit alors de plasmides souvent conjugatifs qui possèdent des gènes AmpC notamment CMY, FOX, MOX, DHA, ACT, CIT qui diffusent au sein de nombreuses espèces d'entérobactéries (*E. coli, K. pneumoniae, K. oxytoca, Salmonella spp., P. mirabilis*…) [81].

d - Carbapénèmases

Les carbapénèmases sont des enzymes capables d'hydrolyser non seulement les céphalosporines et les oxymino-céphalosporines, mais également les antibiotiques carbapénèmes. Les carbapénèmases sont le groupe des β-lactamases les plus préoccupantes chez les bactéries à Gram -, car les antibiotiques carbapénèmes sont les derniers médicaments de référence pour le traitement de l'infection à BGN. Les carbapénèmases peuvent être trouvées dans chacune des quatre classes moléculaires de β-lactamases.

i - Carbapénèmases de classe A

Les carbapénèmases de classe moléculaire A comprennent la carbapénèmase de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) à médiation plasmidique, le spectre étendu de Guyane (GES), l'enzyme Serratia marcescens (SME), codée de manière chromosomique, ainsi que l'imipénème-hydrolysant (IMI) β-lactamases. Les carbapénèmases à KPC, en particulier, ont récemment été associées à des flambées majeures d'infections à Gram - multi-résistantes dans les hôpitaux. Leurs transmission est devenu mondiale [82]. Au Maroc, ce type de carbapénèmases n'a été pas détecté.

ii - Carbapénèmases de classe B

Ce sont des β-lactamases de classe B d'une activité carbapénèmase qui ont été caractérisées chez les entérobactéries, ces enzymes hydrolysent tous les β-lactamines à l'exception de l'aztréonam. Elles résistent aux β-lactamines mais sont sensibles à l'action inhibitrice de l'EDTA.

Les Métallo β-lactamases de classe B (MBL) comprennent les enzymes suivantes: actif sur l'imipénème (IMP) [83], l'intégron de Vérone codant une métallo-β-lactamase (VIM), Sao Paulo métallo -β-lactamases (SPM), l'imipénèmase de Séoul (SIM), l'imipénèmase allemande (GIM) et New Delhi MBL (NDM) [84–86] .

Les MBLs ont été largement identifiées dans les entérobactéries spécialement dans les isolats de *K. pneumoniae* résistante à l'imipénème produisant la MBL IMP-1 au Japon, Singapore, Brésil et au Maroc et IMP-8 qui a été détecté en Taiwan [87–90]. D'autres métallo-β-lactamases tel que VIM-1 et VIM-4 ont été rapportées en Grèce et en Italie [91,92].

Les entérobactéries productrices de NDM-1 ont été rapportées en Afrique, en Asie, en Australie, au Canada, en Europe, aux USA et au Royaume-Uni, en Korée et au Maroc [63,89,93].

iii - Carbapénèmases de classe C

La classe moléculaire C est le type CMY-10 rare isolé pour la première fois chez *Enterobacter aerogenes* en 2003. Cependant, les β-lactamases de CTX-M-15 ont également été identifiées comme ayant une activité carbapénèmase [94]. Une résistance à un carbapénème par des entérobactéries productrices de CTX-M a été rapportée avec une combinaison d'autres mécanismes de résistance, tels que la sélection de mutations conduisant à une absence d'expression de la porine ou à une altération de l'efflux [95,96]. Ce mécanisme de résistance ne peut pas conférer une résistance aux carbapénèmes à lui seul mais peut entraîner une résistance aux enzymes CTX-M.

iv - Carbapénèmases de classe D

Les carbapénèmases D de classe moléculaire sont le type d'enzyme Oxacillinase OXA. Les entérobactéries produisant les carbapénèmases ont été signalées de plus en plus dans le monde entier [90]. Cependant, des oxacillinases à activité carbapénèmase de type OXA-48 sont très répandues dans la région méditerranéenne et ont été récemment détectées dans les souches d'*Enterobacter cloacae* au Maroc [89,97]. *Acinetobacter* et *P aeruginosa* ont été souvent rapporté résistantes aux carbapénèmes par expression de l'enzyme OXA dans plusieurs travaux [75].

3 - *Plasmide : principal support génétique de la résistance β-lactamase*

La résistance extra-chromosomiques est due à la présence de trois types d'éléments génétiques mobiles portant des gènes de résistance : les plasmides, les transposons et les cassettes de résistances insérées sur intégrons.

Les plasmides sont des éléments circulaires mobiles et autonomes du chromosome bactérien qui peuvent véhiculer la résistance à plusieurs antibiotiques à la fois. Les plasmides conjugatifs (Tra+) sont des plasmides doués de réplication autonome d'une bactérie à une autre par conjugaison. Cette propriété contribue ainsi à une importante dissémination de l'information génétique. Leur taille est supérieure à 30 kb. Ils sont en petit nombre de copies (1 à 3) par cellule. Les plasmides transférables représentent le principal support génétique des gènes codant pour des β-lactamases (exp : CTX-M) et permettent le transfert du gène d'une espèce à une autre et d'un genre à un autre. Ces gènes sont souvent retrouvés en association avec d'autres gènes de résistance aux aminosides, chloramphénicol, sulfamides et tétracyclines.

Objectifs

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Dans les services de néonatologie et de réanimation néonatale, la survenue d'une infection associée aux soins causée par une BMR chez les nouveau-nés hospitalisés est souvent précédée par la colonisation par des BMR. Le dépistage des nouveau-nés à l'admission et en cours d'hospitalisation est l'une des méthodes utilisées pour prévenir la survenue des IAS. Elle permet de diminuer le risque d'infections associées aux soins en identifiant les patients colonisés par des BMR et qui présentent un « réservoir» qui facilite leur dissémination. En plus, la mise en œuvre des mesures d'hygiène permettant d'éviter la dissémination des BMR à l'intérieur d'une même unité.

Dans ce contexte, et à notre connaissance aucune donnée publiée sur la prévalence du portage et/ou de colonisation des NN par des BMR dans les services de néonatologie et réanimation néonatale au Maroc n'est disponible.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la prévalence de l'acquisition des bactéries multi-résistantes chez les nouveau-nés hospitalisés dans le SNRN au CHU Hassan II de Fès au Maroc. Les BMR étudiées sont :

- *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM)
- Entérobactéries multi-résistantes :
  - Les entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre élargie (E-BLSE)
  - Les entérobactéries productrices de céphalosporinases (E-CASE)
  - Les entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC).
- *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème (ABRI)
- *Pseudomonas aeruginosa* résistante à l'imipénème (PARI)

D'autres objectifs ont été établis. Ce sont :

- La détermination de la prévalence du portage de BMR à l'admission des nouveau-nés
- L'identification des facteurs de risques liés à la colonisation par ces BMR
- L'étude des profils de résistance des différentes bactéries isolées
- L'étude moléculaire des déterminants génétiques de la résistance chez les BMR isolées
- L'étude de la relation clonale entre ces BMR
- L'étude des réservoirs exogènes notamment surfaces et dispositifs médicaux, qui peuvent constituer une source de transmission et de dissémination des BMR dans le service.

Matériel & méthodes

Présentation du travail

Ce travail consiste en une étude prospective qui s'est étalée sur 5 années (de 2013 à 2018) et qui s'est déroulée dans le service de néonatologie et réanimation néonatale (SNRN) au centre hospitalier universitaire CHU Hassan II de Fès. Le dépistage des nouveau-nés a été réalisé sur une période de deux années (de 2013 jusqu'à la fin de 2015).

Le service de néonatologie et réanimation néonatale (SNRN) de l'hôpital universitaire Hassan II de Fès est une unité médicale et chirurgicale qui dispose d'une capacité d'accueil de 18 lits répartis en deux secteurs (9 lits chacun). Le secteur 1 correspond à la réanimation néonatale et le secteur 2 à l'unité des prématurés. Ce SNRN est le seul à Fès, une ville d'environ 1,5 million d'habitants.

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

Cette étude a été approuvé par le Comité d'éthique conjoint de la faculté de Médecine et de pharmacie et de l'Hôpital Universitaire Hassan II de Fès (Fès, Maroc).

I - Patients

Durant cette période, tous les nouveau-nés ont fait l'objet d'un écouvillonnage nasal et rectal à l'admission au SNRN. Un deuxième prélèvement a été réalisé 5 jours après l'admission. Ces prélèvements ont été faits selon le schéma suivant (figure 9) :

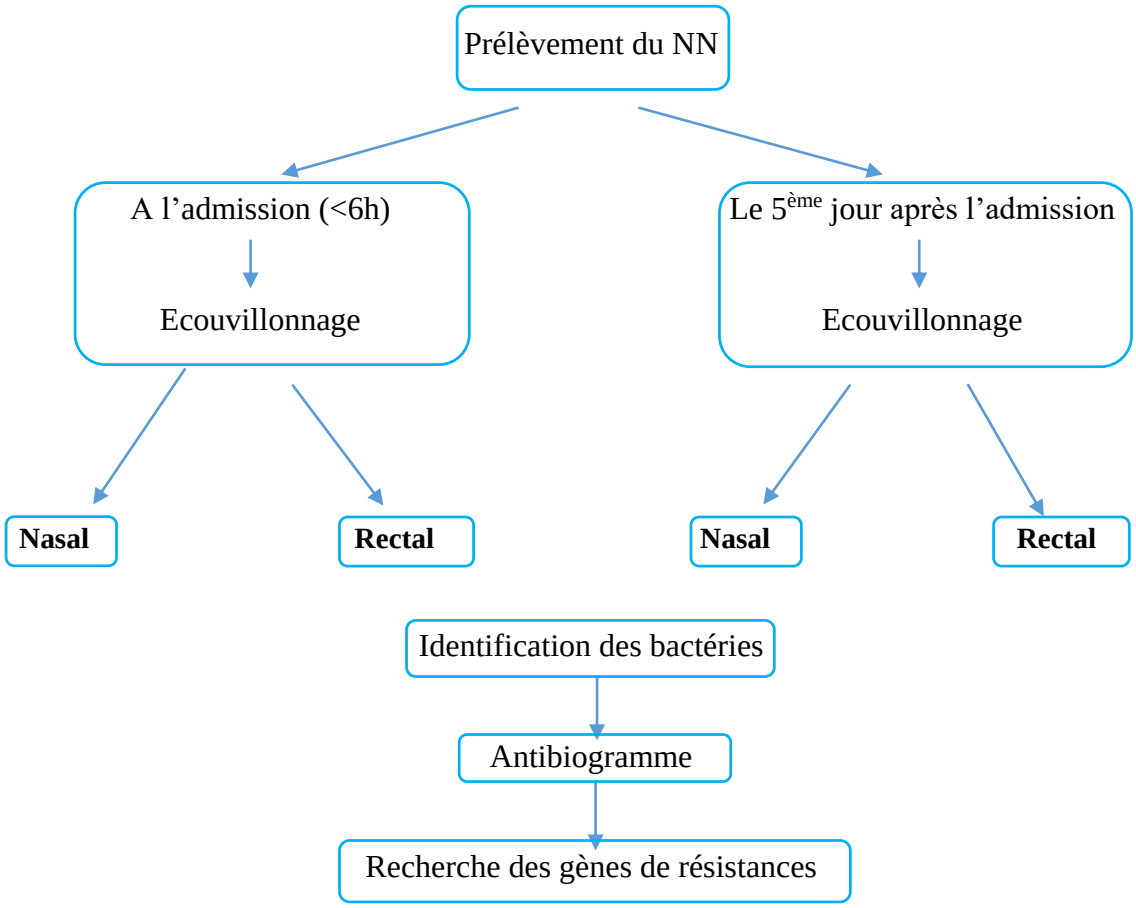


Figure 9 : Schéma des prélèvements réalisés chez les nouveau-nés hospitalisés dans le SNRN

II - Environnement

En plus des prélèvements réalisés chez les nouveau-nés, nous avons réalisé également des prélèvements à partir de différents points de surface avoisinant le nouveau-né (environnement ou zone patient) notamment les surfaces des couveuses, les hublots pivotants, l'écran d'affichage des couveuses, les surfaces des tables chauffantes, les scopes, les matelas, les tables à chevet, les poignets de portes des salles et le plateau de soins. Les figures 10 et 11 représentent ces différents points de prélèvements.

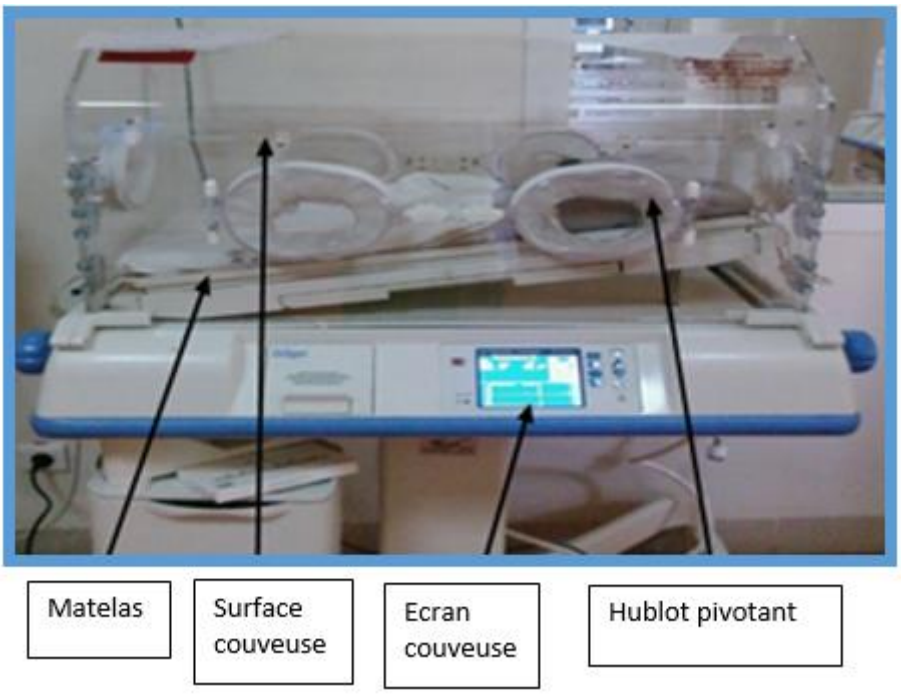


Figure 10 : Schéma montrant les sites de prélèvements sur une couveuse dans le SNRN



Figure 11 : Schéma montrant les autres sites de surface prélevés SNRN

III - Méthodes de Prélèvements

1 - *Prélèvement rectal*

Un écouvillon stérile humidifié avec du sérum physiologique stérile est introduit dans le sphincter anal du NN, puis retiré après s'être assuré de la présence de matières fécales. Chaque écouvillon est ensuite placé dans son étui, rebouché et identifié par le nom du NN, la date, l'heure et le site du prélèvement.

2 - *Prélèvement nasal*

Un écouvillon stérile humidifié par du sérum physiologique stérile est introduit dans chaque narine profondément suivie de rotations sur les parois narinaires.

3 - *Prélèvement des surfaces*

Toutes les surfaces qui ont fait l'objet de prélèvements ont été frottées sur les zones définies à l'aide d'un écouvillon stérile imbibé de sérum physiologique stérile. Le frottement se fait en stries parallèles rapprochées en le faisant tourner légèrement sur les mêmes zones en stries perpendiculaires aux premières (Norme ISO/DIS 14698-1). Les écouvillons sont remis dans leurs étuis protecteurs et transférés au laboratoire. Ensuite, un enrichissement a été nécessaire pour permettre une récuperation maximale des bactéries Ils sont ensuite dilués dans le milieu d'enrichissement BHI (Brain Heart Infusion, oxoid) puis incubés à 37°C pendant 24h.

IV - Collecte des données épidémiologiques des patients

A partir du dossier des nouveau-nés, les données sociodémographiques et cliniques des patients ont été collectées. Ce sont : le genre, l'âge, le poids à la naissance, l'âge gestationnel, le lieu de naissance, la voie d'accouchement, la provenance, la date d'admission, le motif d'hospitalisation, l'antibiothérapie administrée, le type d'allaitement, le type de cathétérisation (central ou périphérique) et la durée d'hospitalisation.

Les informations épidémiologiques concernant tous les NN sont notées sur une fiche d'exploitation au sein du service de néonatologie (voir annexe 1).

Critères d'inclusion

- ✓ Tout nouveau-né hospitalisé dans le service de néonatologie et de réanimation néonatale a subi les prélèvements.

Critères d'exclusion

- ✓ Pour un même patient, des doublons des mêmes microorganismes par site ont été éliminés.

Les NN hospitalisés pendant le week-end sont exclus de cette collecte.

Analyses microbiologiques

V - Ensemencements

Les prélèvements ont été immédiatement acheminés au laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine. Puis ensemencés sur des milieux de culture sélectifs: Eosine Bleu de Méthylène (EMB), gélose Chapman et gélose Pseudomonas (Annexe 2). Les milieux chromogènes n'ont pas été utilisés pour des raisons budgétaires.

1 - *Prélèvement rectal*

Les prélèvements rectaux ont été ensemencés sur le milieu EMB, sélectif des bacilles à Gram -, particulièrement les entérobactéries. Cependant, ce milieu peut servir également à la recherche d'*A. baumannii* et *P. aeruginosa*. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24h.

2 - *Prélèvements nasaux*

Les prélèvements nasaux sont ensemencés sur Gélose Chapman, pour la recherche des *S. aureus*, puis incubés à 37°C pendant 48h.

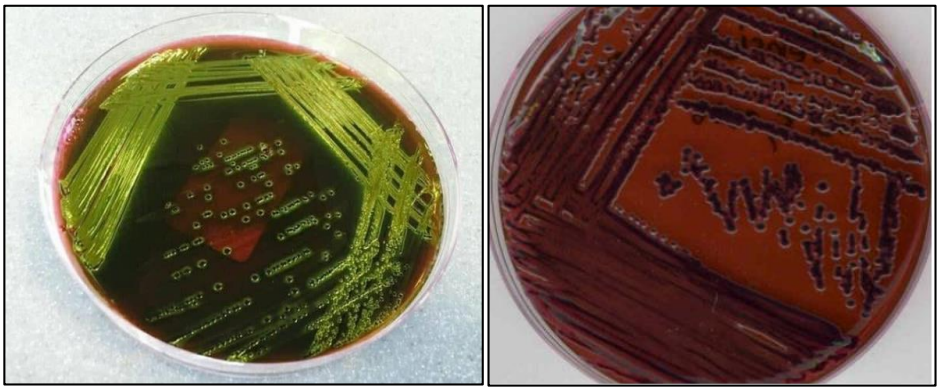
3 - *Prélèvements d'environnement*

Les prélèvements de surface enrichis au BHI sont ensemencés sur : milieu EMB, Gélose Chapman et Gélose Pseudomonas pour la recherche des bacilles à Gram -, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* respectivement. L'incubation des boites EMB et Gélose Pseudomonas a été réalisée à 37 °C pendant 24h. Pour les boites contenant le milieu gélosé Chapman, l'incubation a été prolongée à 48h.

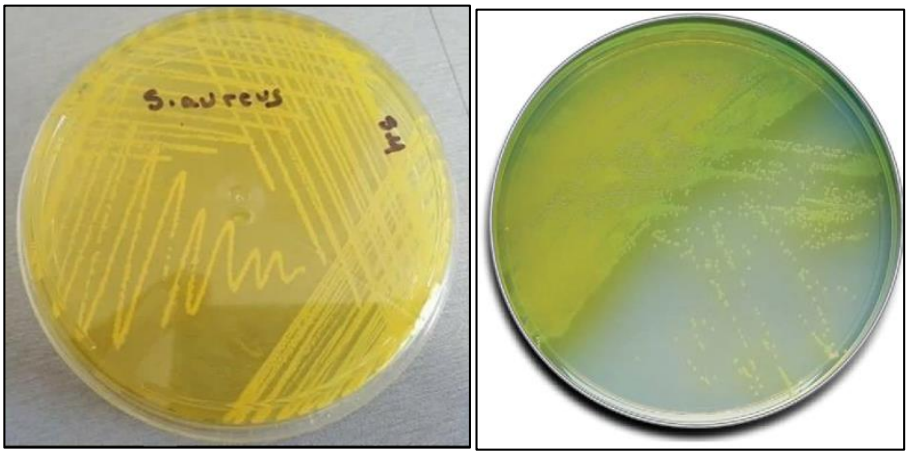
VI - Isolements et purification

Toutes les colonies qui ont poussées sur les différents milieux de culture ont fait l'objet de tests d'identification biochimiques. Les colonies qui ont poussées sur le milieu EMB ont fait l'objet d'une coloration de Gram, un test d'oxydase, une étude de fermentation de glucose, un test IMViC (Indole, Methyl Red, Voges Proskawer, citrate) et une confirmation d'identification par l'API20E (voir page 45). Ceux qui ont poussé sur la gélose Pseudomonas ont fait l'objet de test d'oxydase et une confirmation d'identification par l'API20NE. Tandis que, les colonies qui ont poussé sur le milieu gélosé Chapman ont fait l'objet d'un test de coagulase et une confirmation par API staph. Les images suivantes montrent quelques bactéries isolées durant notre étude

notamment, *E. coli et K. pneumoniae* sur le milieu EMB. *S. aureus* et *P. aeuruginosa* sur les milieux gélosés Chapman et Pseudomonas respectivement.



E. coli *K. pneumoniae*



S. aureus *P. aeruginosa*

VII - Identification biochimique

1 - *Coloration de Gram*

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Pour cela, un étalement aussi mince que possible est effectué à l'aide d'une anse sur une lame. Celle-ci est séchée puis recouverte totalement avec le violet de Gentiane pendant une minute. La lame est ensuite immergée dans le lugol pendant une minute puis soumise à un lavage avec de l'eau distillée. Une décoloration à l'aide de l'alcool acétone est effectuée pendant 20 secondes, ensuite la lame est rincée à l'eau distillée, recouverte de la solution de fuchsine pendant une minute puis rincée de nouveau avec de l'eau et séchée à l'air ambiant ou à la chaleur sur une plaque chauffante.

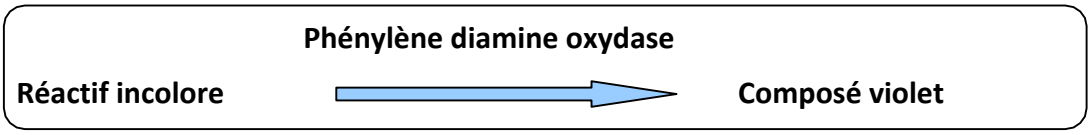
2 - Test d'oxydase

La recherche du cytochrome c-oxydase permet de mettre en évidence la présence d'une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder le réactif N diméthylène diamine incolore qui libère un composé rose-rouge noircissant à l'air et en présence de l'enzyme phénylène diamine oxydase.

Pour ce test d'oxydase, un inoculum bactérien est écrasé sur un disque d'oxydase à l'aide d'une pipette Pasteur et le changement de coloration est observé. La présence d'une enzyme oxydase se traduit par une coloration violette sur le disque comme pour *Pseudomonas.* Dans l'absence de cette enzyme, le disque reste incolore comme pour les entérobactéries.

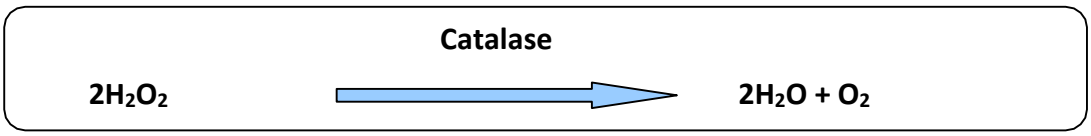


Test d'oxydase (+) réalisé dans cette étude



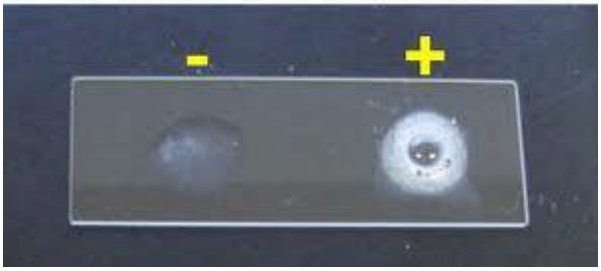
3 - Test de catalase

Ce test est à la base de l'identification des bacilles à Gram+. Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes. La catalase est une enzyme qui catalyse la réaction suivante :



La plupart des micro-organismes aérobies possèdent une catalase. Le test de catalase est l'un des critères importants pour l'orientation et l'identification de ces bactéries. Sur une lame propre et sèche une goutte d'eau oxygénée est déposée, puis additionné d'un inoculum bactérien.

L'apparition de bulles indique un dégagement gazeux d'O_2 ce qui indique que la bactérie possède une catalase comme le montre l'image suivante.



Test de catalase réalisé dans cette étude

4 - Test de coagulase

Le test de coagulase est à l'origine de l'identification de l'espèce *Staphylococcus aureus.* Dans un tube à hémolyse, le Plasma de lapin est additionné au bouillon cœur de cervelle dans les proportions 1V /1V. Après une incubation à 37°C. La formation d'un caillot entre 30 min à quelques heures signifie la présence d'une coagulase (figure 12).

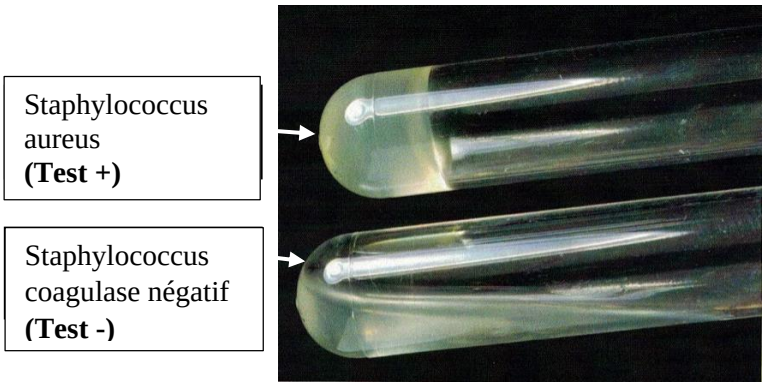


Figure 12 : Test coagulase réalisé dans cette étude

5 - Fermentation du glucose-lactose

Ce test de fermentation de glucose a été réalisé en utilisant le milieu Hajna-Kligler. Ce milieu est utilisé pour l'identification des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il permet de révéler la présence de 4 caractères chez la bactérie étudiée : la fermentation du glucose, l'utilisation du lactose, la production d'hydrogène sulfureux (H_2S) et la production de gaz.

Après la préparation de ce milieu, les tubes ont été inclinés de façon à avoir ne pente et un culot d'environ 3 cm. A l'aide d'une anse stérile et à partir d'une suspension bactérienne, l'ensemencement du culot a été réalisé par piqûre centrale et celui de la pente a été réalisé par des stries serrées. Après 24h d'incubation à 37°C, on révèle les 4 caractères (figure 13) :

- Fermentation du glucose

Dans le culot où il y absence d'O_2 (anaérobiose relative), le glucose va être dégradé par voie fermentative, Ceci se traduit par une acidification du milieu et le rouge de phénol vire du rouge au jaune.

- Utilisation du lactose

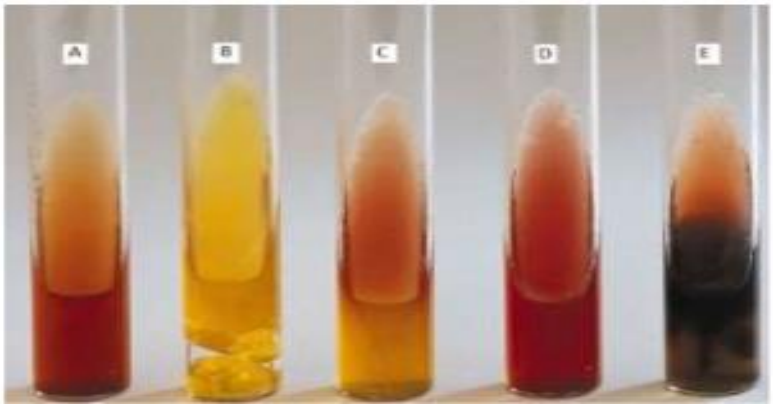
Dans le milieu Hajna-Kligler, le lactose est présent, les bactéries pouvant le dégrader vont acidifier le milieu et par conséquent la pente sera de couleur jaune. Quand aux bactéries ne peuvent pas utiliser le lactose comme source de carbone, il y aura dans ce cas une utilisation de peptones présentes dans le milieu ce qui se traduira par une alcalinisation du milieu et une couleur rouge de la pente.

- Production d'hydrogène sulfureux (H_2S)

La réduction du thiosulfate en anaérobiose par certaines bactéries se traduit par la fabrication d'H_2S, qui en réagissant avec le citrate ferrique donnera un précipité noir de FeS qui se développe de long de la piqûre de l'anse et envahit parfois le culot.

- Production de gaz

La production de gaz se traduit soit par quelques bulles, soit par une poche gazeuse qui décolle complètement le milieu gélosé du tube.



Tube A : Tube non ensemencé.
Tube B : Fragmentation de la gélose : gaz +. Pente jaune : Lactose +. Culot jaune : glucose +.
Tube C : Pente rouge : lactose -. Culot jaune : glucose +.
Tube D : Pente rouge : lactose -. Culot rouge : glucose -.
Tube E : noircissement du tube : H_2S+. Pente et culot non visible : lactose ? glucose ?

Figure 13 : Lecture de la fermentation du milieu Hajna-Kligler

6 - Test IMViC (Indole/ Méthyle rouge/ Voges Proskauer/ Citrate)

A - Recherche d'uréase

Le milieu Urée-indole est un milieu d'identification qui permet de rechercher la production d'uréase et d'indole chez les bactéries à identifier.

Les bactéries qui possèdent une uréase active réagissent selon la réaction suivante :

$$CO_2 + 2NH_3 + H_2O \xrightarrow{\text{Uréase}} CO_3(NH_4)_2$$

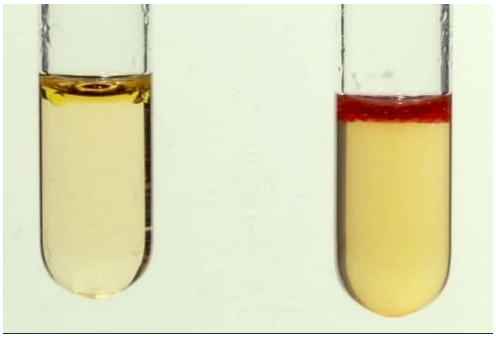
Si l'uréase est présente, le milieu devient alcalin ce qui se traduit par une coloration ose fuchsia.

B - Production d'indole

Les bactéries dégradent le tryptophane en indole en présence d'une tryptophanase, selon la réaction :

$$\text{Tryptophane} \xrightarrow{\text{Tryptophanase}} \text{Indole + acide pyruvique + } NH_3$$

L'ajout de réactif de Kovacs se traduit par l'apparition d'un anneau rouge en surface, dû à la réaction entre le noyau indole et une des substances de ce réactif comme le montre la photo suivante.



Test Indole réalisé dans cette étude

C - *Test de Voges Prauskauer (VP)*

Le test de VP consiste à mettre en évidence par une réaction colorée, le butanediol et l'acétoine.

L'acétoine produite par fermentation butanediolique est mise en évidence par le test VP (Voges Prauskauer). La fermentation butanediolique conduit à des quantités moins importantes d'acides organiques, une proportion non négligeable du pyruvate étant transformée en produit neutre l'acétoine, en général réduite en butanediol.

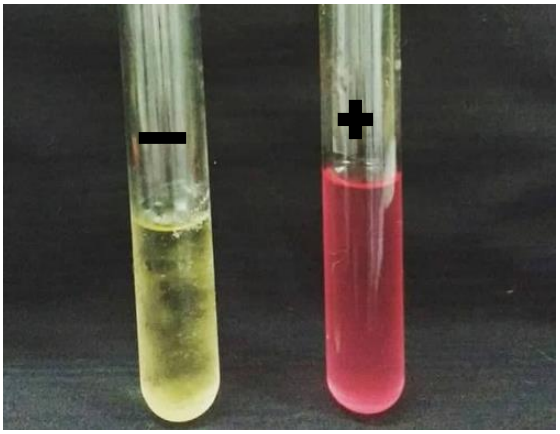
La culture de la bactérie à étudier est ensemencée dans le milieu VP puis, incubée 37°C pendant 24h. Ensuite, deux échantillons de 1 ml chacun sont transvasés dans deux tubes à hémolyse.

Pour le test de VP, 0.5 ml d'alpha naphtol et le même volume de KOH sont ajoutés dans un tube à hémolyse. La coloration en rose rouge signifie que la souche est VP positif.



Test Vogs Prauskauer réalisé dans cette étude

Pour le test rouge de méthyle (RM) : 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle sont ajoutés dans l'autre tube à hémolyse. La coloration en rouge immédiatement obtenue du milieu signifie que la souche est RM (+).



Test Rouge de Méthyl réalisé dans cette étude

D - Test du milieu Citrate de Simmons

Le milieu citrate de Simmons est un milieu synthétique où le citrate est l'unique source de carbone. L'utilisation aérobie du carbone par les bactéries se traduit par une alcalinisation du milieu. Ce milieu se présente sous forme de gélose inclinée en tube.

L'ensemencement est réalisé à l'aide d'une anse à partir d'une suspension bactérienne sur ce milieu citrate incliné. L'incubation s'est faite à 37°C pendant 24h.

Si le milieu vire au bleu cela signifie une alcalinisation du milieu et la souche est dite citrate de Simmons positive.

7 - Identification par Galerie Api 20 E, Api 20NE et Api Staph

L'Api 20 E, 20NE et Api Staph constituent un système standardisé qui a pour but l'identification respective des *Enterobacteriaceae*, des bacilles à Gram- non fermentants et des staphylocoques. Chacune de ces galeries comporte 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Son principe est basé sur une fermentation et une oxydation de 10 sources de carbone et l'utilisation de 10 tests enzymatiques. Chaque galerie comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture des réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique (biomérieux) ou d'un logiciel d'identification. La figure 14 montre l'image de la galerie API 20E.

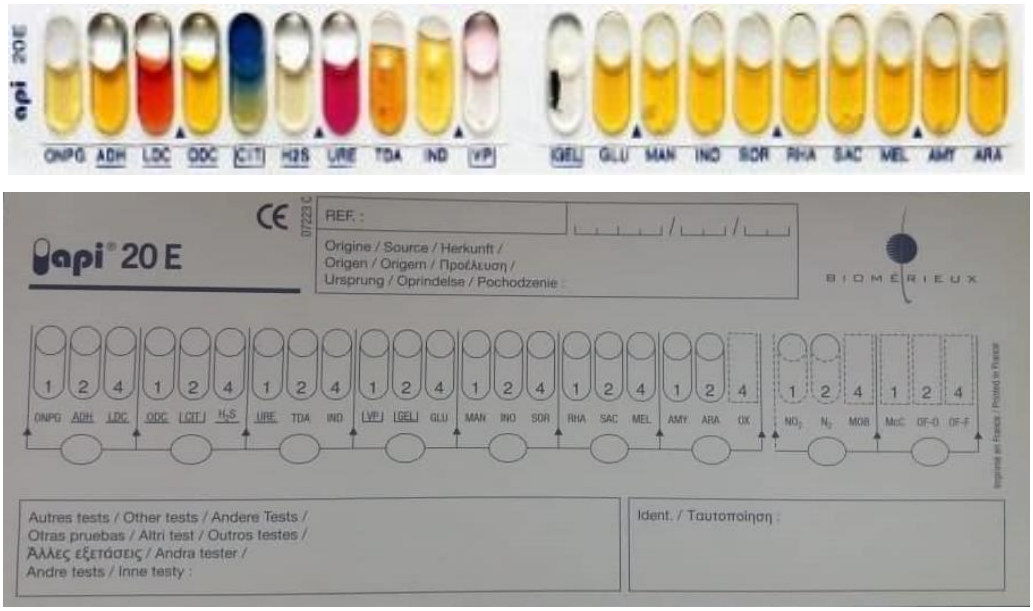


Figure 14 : Image montrant la galerie API20E et son tableau de lecture.

A - Préparation de la galerie

La préparation de la galerie débute par inscrire la référence de la souche dans la longuette latérale de la boite fermée. Puis créer une atmosphère humide en répartissant 5ml d'eau distillée dans les alvéoles du fond de la galerie et la placer dans la boite d'incubation. L'inoculum bactérien est réalisé par la préparation d'une suspension bactérienne bien homogène par ensemencement d'une colonie provenant d'une culture jeune de 18 à 24h dans un tube stérile contenant 5ml du sérum physiologique stérile. La galerie est ensemencée avec la suspension bactérienne préparée, puis incubée dans l'étuve à 36° C +/– 2° C, pendant 18 à 24h.

B - Lecture de la galerie et Interprétation

La détermination du profil numérique s'effectue sur une fiche de résultats dont les tests sont classés par triplets et une valeur de 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. Les trois résultats du triplet sont additionnés (il existe seulement huit possibilités pour la somme d'un triplet : 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Les sommes de chaque triplet lus de gauche à droite forment un code d'au moins 7 chiffres qui correspond au profil biochimique du microorganisme étudié. La comparaison de ce code à ceux référencés dans la base de données gérée par biomérieux permet en général d'identifier ce microorganisme. Si le code numérique obtenu ne figure pas dans cette base de données, il peut s'agir d'un profil ou d'un microorganisme non référencé, d'un problème technique ou d'une mutation lors du développement bactérien. Ci-dessous, l'image de deux galeries révélées dans notre laboratoire.



VIII - Antibiogramme

L'antibiogramme est un test qui vise à déterminer la sensibilité d'une bactérie à divers antibiotiques. Il a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu gélosé selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (2013).

1 - *Milieu de culture*

Le milieu Muller Hinton (MH) a été utilisé avec une épaisseur de 4 mm répartie uniformément dans des boites de pétri. Sa composition est détaillée dans l'annexe 3

2 - *Préparation de l'inoculum bactérien*

L'inoculum bactérien est préparé à partir d'une culture bactérienne de 18-24 h sur un milieu gélosé non sélectif et la suspension bactérienne est préparée dans du NaCl à 0,9 % équivalente au standard Mc Farland 0,5 (~ 10^8 UFC/ml). Ce standard a été mesuré par l'appareil Mc Farland montré dans l'image suivante :



Mc Farland

3 - *Ensemencement par écouvillonnage*

La suspension bactérienne est diluée au 1/$10^{ème}$ (~ 10^7 UFC/ml). Elle est ensuite ensemencée par la technique d'écouvillonnage sur toute la surface du milieu MH. Trois passages

à orientation décalée de 60° pour la boîte et l'écouvillon ont été réalisés (figure 15) et l'incubation est faite à 37°C pendant 24 heures.

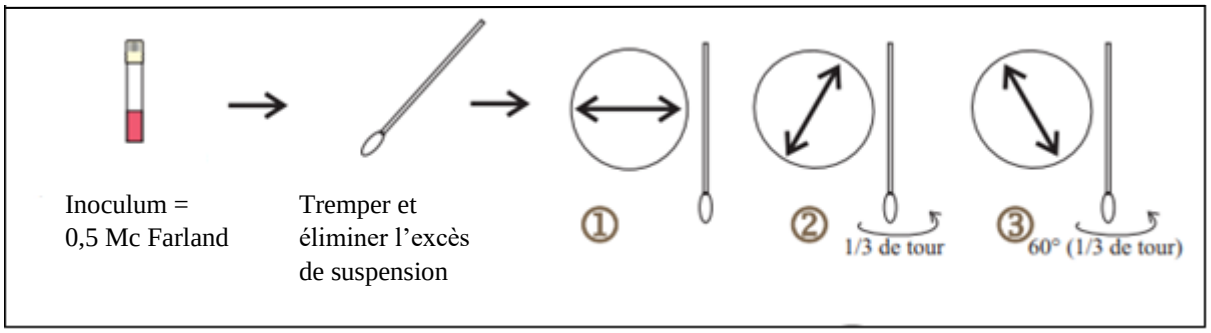


Figure 15 : Technique d'ensemencement

4 - Application des disques

Les disques imbibés d'antibiotiques ont été déposés à l'aide d'une pince flambée, tout en appuyant légèrement dessus pour qu'ils collent bien à la surface de la gélose, en prenant soin de les déposer à une distance minimale de 15 mm du bord de la boite. Aussi, deux disques doivent être éloignés au maximum de 30 mm de sorte que les zones d'inhibition ne chevauchent pas.

5 - Incubation

Les boites ont été ensuite mises à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures au bout desquels les résultats sont notés.

6 - Choix des antibiotiques

Les antibiotiques testés lors de la réalisation de l'antibiogramme différent selon les espèces bactériennes testés (recommandations CA-SFM 2013) [55].

A - *Staphylococcus aureus*

Selon la liste standard du comité de l'antibiogramme, 12 antibiotiques ont été testés sur les *Staphylococcus aureus* (tableau 4). L'abréviation du nom de l'antibiotique, la charge du disque et la famille à laquelle appartient cet antibiotique y figurent également.

Tableau 4 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme des *Staphylocoque aureus*

	Antibiotique	**Abréviation**	**Charge (µg)**	**Famille**
Staphylococcus aureus	Pénicilline G	P	1 unité	B-lactamine
	Céfoxitine	FOX	30	Céphalosporine 2G
	Gentamicine	GM	10	Aminoglycoside
	Rifampicine	RD	5	Rifamycine
	Levofloxacine	LEV	5	Fluoroquinolones
	Lincomycine	MY	-	Lincosamide
	Pristinamycine	PT	-	Streptogramine
	Co-trimoxazole	SXT	1.25/23.75	Sulfamide
	Fosfomycine	FOS	50	Fosfomycine
	Acide fusidique	FA	10	Fusidanine
	Teicoplanine	TEC	-	Glycopeptide
	Vancomycine	VA	-	Glycopeptide

B - Entérobactéries

Pour les isolats d'entérobactéries, 14 antibiotiques ont été testé (tableau 5).

Tableau 5 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme des entérobactéries.

	Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Famille
Enterobacteriaceae	Ampicilline	AMP	30	β-lactame
	Amoxicilline/acide clavulanique	AMC	10	β-lactame/inhibiteur
	Céfoxitine	FOX	30	Céphalosporine 2G
	Céfalotine	KF	30	Céphalosporine 1G
	Céftazidime	CAZ	30	Céphalosporine 3G
	Céfotaxime	CTX	30	Céphalosporine 3G
	Ertapénème	ETP	10	Carbapénème
	Gentamicine	GM	10	Aminoglycoside
	Amikacine	AK	30	Aminoglycoside
	Acide nalidixique	NA	30	Quinolone
	Ciprofloxacine	CIP	5	Fluoroquinolone
	Norfloxacine	NOR	10	Fluoroquinolone
	Co-trimoxazole	SXT	1.25/23.75	Sulfamide/triméthoprime
	Fosfomycine	FOS	50	Fosfomycine

C - *Pseudomonas aeruginosa*

Pour les isolats de *P. aeruginosa*, 11 antibiotiques ont été testés (tableau 6).

Tableau 6 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme de *P. aeruginosa*

	Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Famille
Pseudomonas	Pipéracilline	PIP	30	Urèidopenicillines
	Ticarcilline	TIC	75	Carboxypenicillines
	Ticarcilline/acide clavulanique	TIC/CLV	75-10	Pénicillines/inhibiteur
	Pipéraciline/tazobactam	PIP/TPZ	30-6	Pénicillines/inhibiteur
	Céftazidime	CAZ	30	Céphalosporine 3g
	Aztréonam	ATM	30	Monobactame
	Imipénème	IMP	10	Carbapénème
	Gentamicine	GM	10	Aminoglycoside
	Amikacine	AK	30	Aminoglycoside
	Tobramycine	TOB	10	Aminoglycoside
	Ciprofloxacine	CIP	5	Fluoroquinolone

D - *Acinetobacter baumannii*

Pour les isolats d'*A. baumannii*, 10 antibiotiques ont été testés (tableau 7).

Tableau 7 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme d'*A. baumannii*

	Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Famille
Acinetobacter	pipéracilline	PIP	30	Uréidopénicillines
	Ticarcilline	TIC	75	Carboxypénicillines
	Pipéraciline/Tazobactam	PTZ	75/10	Pénicillines/inhibiteur
	Céftazidime	CAZ	30	Céphalosporine 3G
	Imipenème	IMP	10	Carbapénème
	Gentamicine	GM	10	Aminoglycoside
	Amikacine	AK	30	Aminoglycoside
	Tobramycine	TOB	10	Aminoglycoside
	Ciprofloxacine	CIP	5	Fluoroquinolone
	Cotrimoxazole	SXT	1.25/23.75	Sulfamide+Triméthoprime

7 - Détection phénotypique de la résistance enzymatique

A - Détection des BLSE par le test de synergie chez les entérobactéries

Chez une entérobactérie donnée, le test de synergie permet la recherche de BLSE. Selon les recommandations du CA-SFM de 2013, le principe de ce test consiste à rechercher une image de synergie dite en "bouchon de champagne" entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β-lactamases et des disques de céphalosporines 3G (figure 16).



Figure 16 : Image de synergie dite en bouchon de champagne.

Lors du dépôt des disques d'antibiotiques, le disque d'amoxicilline/acide clavulanique (AMC) est placé en face des deux céphalosporines 3G : Céfotaxime (CTX) et Céftazidime (CAZ). La production des enzymes BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G.

B - Détection de la production de carbapénèmases chez les bactéries à Gram négatif

a - Test de Hodge « modifié »

Le test de Hodge « modifié » consiste à inoculer un milieu gélosé de Muller Hinton avec une suspension d'*E.coli* ATCC 25922 diluée au 1/10 d'une suspension 0,5 McFarland. Un disque de carbapénèmes (10µg) est déposé au centre de la gélose. A partir des suspensions bactériennes suspectées productrices de carbapénèmases, on réalise des stries de 20 à 25 mm en partant du disque de carbapénème vers l'extrémité de la gélose. La lecture se fait après incubation à 35±2°C pendant 24h en aérobiose. Il s'agit d'examiner l'intersection entre la zone d'inhibition de la souche de référence utilisée et la strie de celle suspectée d'être productrice de carbapénèmases. La croissance d'*E. coli* ATCC 25922 à proximité du disque de carbapénèmes autour de la strie de la souche suspecte donne une image de dépression dans la gélose signalant une activité carbapénèmases. A l'inverse, si la croissance d'*E. coli* ATCC 25922 continue d'être inhibée même en présence de la souche suspecte (bordure de la zone d'inhibition perpendiculaire à la strie réalisée) le résultat du test est négatif.

b - Test de métallo-beta lactamases (MBL)

La méthode de détection phénotypique MBL repose sur la méthode de disque combiné : Dans une seule boite gélosé, un disque d'Imipénème (IMP) seul (10 µg), et un autre disque d'IMP contenant 10 µl d'EDTA anhydre 0,1 M (292 g) a été placé à 25 mm de l'autre. après incubation à 37°C pendant 24h, une augmentation du diamètre d'inhibition d'au moins 4 mm autour du disque IPM-EDTA par rapport à celle du disque IPM seul témoigne d'une activité métallo β- lactamases [98].

Analyse moléculaire

Dans cette partie du travail, vingt gènes de résistance ont été recherchés. Ces gènes codent pour les β-lactamases à spectre élargie (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}2}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}9}$), les céphalosporinases (*bla*$_{MOX}$, *bla*$_{ACC}$, *bla*$_{DHA}$, *bla*$_{FOX}$, *bla*$_{EBC}$ et *bla*$_{CIT}$) et les carbapénèmases (*bla*$_{OXA\text{-}48}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{OXA\text{-}51}$, *bla*$_{OXA\text{-}58}$, *bla*$_{OXA\text{-}23}$, *bla*$_{OXA\text{-}24}$).

IX - Extraction de l'ADN total

La méthode du choc thermique a été adoptée pour extraire de l'ADN bactérien. Dans des tubes eppendorfs, cinq colonies de culture jeune ont été prélevées et mélangées avec 500µl d'eau distillée stérile. Ces tubes ont été homogénéisés à l'aide d'un vortex. Ensuite, ils ont été mis dans un bain marie à 100 °C pendant 10 minutes puis placés immédiatement dans de la glace durant 2 min. A la fin, une centrifugation de 14000 tr/min pendant 10 minutes a été réalisée afin de récupérer l'ADN présent dans le surnagent. Un aliquot de chaque ADN a été conservée à -20°C pour servir ultérieurement pour la réaction d'amplification par polymerase chain reaction (PCR).

X - Réaction d'amplification par PCR

1 - *Principe*

La PCR ou «Polymerase chain reaction» est une technique moléculaire d'amplification exponentielle d'une séquence d'ADN cible *in vitro*. Cette réaction repose sur le principe d'hybridation d'une séquence d'ADN simple brin avec sa séquence complémentaire et la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire en incorporant des acides nucléiques à une amorce (figure 17).

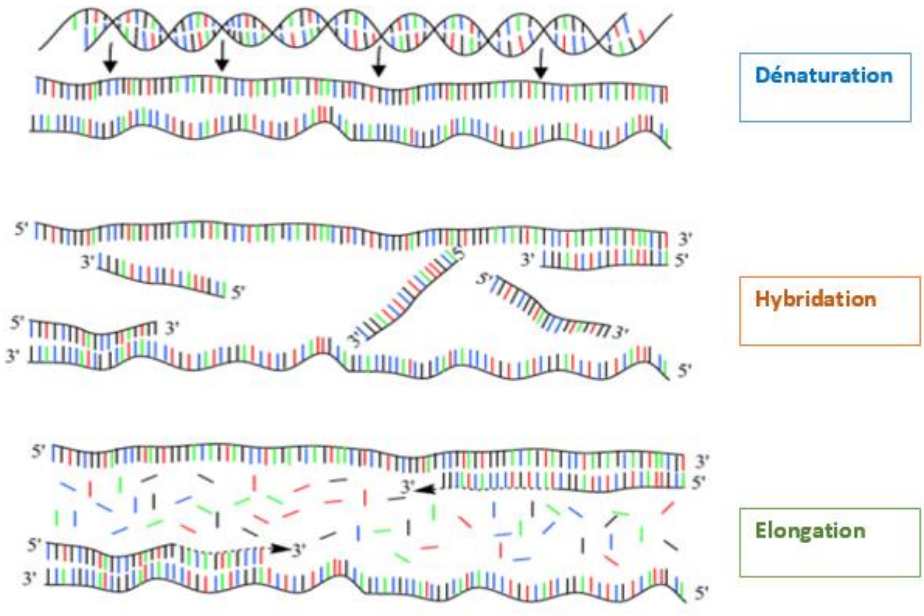


Figure 17 : les étapes d'une réaction d'amplification PCR.

Une réaction de PCR classique comprend une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 5 min à 95°C. Cette étape est suivie de 30 cycles d'amplification de l'ADN

d'intérêt pendant 1 min à 95°C (dénaturation), 1 min à 50-60°C (appariement des amorces avec une température variable selon le Tm des amorces) et 1 min à 72°C (élongation avec un temps variable selon la taille du fragment à amplifier). Une étape finale de 10 min à 72°C permet de terminer la synthèse des brins inachevés.

2 - Amorces utilisées

Afin de déterminer les génotypes des différentes BMR, des amorces spécifiques pour les gènes codants des BLSE, des CASE et des CARBA ont été utilisées. Le tableau 8 montre les différentes amorces utilisées dans ce travail, ainsi que les tailles des séquences nucléotidiques et les références.

Tableau 8 : Amorces utilisées pour la détermination des gènes codant les résistances BLSE, CASE et CARBA

	Gène	Amorces	Séquence d'amorce (5'- 3')	TSA (Pb)	Références
BLSE		OS-5	CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC	795	[99]
	***bla*$_{SHV}$**	OS-6	TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA		
		A-216	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1079	[99]
	***bla*$_{TEM}$**	A-217	GACAGTTACCAATGCTTAATCA		
	***bla*$_{CTXM-1}$**	CTXM1-F	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	863	[99]
		CTXM1-R	TTGGTGACGATTTTAGCCGC		
	***bla*$_{CTXM-2}$**	CTXM2-F	ATGATGACTCAGAGCATTCG	865	[99]
		CTXM2-R	TGGGTTACGATTTTCGCCGC		
	***bla*$_{CTXM-9}$**	CTXM9-F	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	869	[99]
		CTXM9-R	CCCTTCGGCGATGATTCTC		
	***bla*$_{NDM}$**	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	621	[100]
		NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		
	***bla*$_{KPC}$**	KPC-FM	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798	[100]
		KPC-RM	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG		
	***bla*$_{OXA-48}$**	OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	[100]
		OXA-48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
	***bla*$_{IMP}$**	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232	[100]
		IMP-R	GGTTTAAYAAAACAACCACC		
CARBA	***bla*$_{VIM}$**	VIM-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390	[100]
		VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG		
	***bla*$_{OXA-23}$**	*OXA-23-F*	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	501	[101]
		OXA-23-R	ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT		
	***bla*$_{OXA-24}$**	*OXA-24-F*	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	246	[101]
		OXA-24-R	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT		
	***bla*$_{OXA-51}$**	*OXA-51-F*	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353	[101]
		OXA-51-R	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG		
	***bla*$_{OXA-58}$**	*OXA-58-F*	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	599	[101]
		OXA-58-R	CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC		

TSA : taille de la séquence à amplifier ; pb : paire de base

	Gène	Amorces	Séquence d'amorce (5'- 3')	TSA (Pb)	Références
CASE	bla_{FOX}	FOXM-F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	[102]
		FOXM-R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		
	bla_{ACC}	ACCM-F	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	346	[102]
		ACCM-R	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC		
	bla_{EBC}	EBCM-F	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	302	[102]
		EBCM-R	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT		
	bla_{MOX}	MOXM-F	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	520	[102]
		MOXM-R	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C		
	bla_{CIT}	CITM-F	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	462	[102]
		CITM-R	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC		
	bla_{DHA}	DHAM-F	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	405	[102]
		DHAM-R	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC		

TSA : taille de la séquence à amplifier ; Pb : paire de base

3 - Mélange réactionnel (Mix PCR)

Tout isolat bactérien producteur de l'un des trois types d'enzymes : BLSE, EPC et CASE a fait l'objet d'une PCR. Les réactions standards de PCR ont été effectuées selon la méthode décrite précédemment [100]. Le mélange réactionnel classique a été réalisé dans un volume de 50 mL qui contient :

- La solution tampon de réaction (50 mM KCl ; 10 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 2,5 mM MgCl2).
- 100 µM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP).
- 0.4 mM de chaque amorce.
- 2 U de la Taq DNA polymérase (Promega, Madison, WI).
- 2 µL d'ADN.

4 - Programme d'amplification

Le mélange réactionnel est sujet à une amplification dans un thermocycleur : Applied biosystems veriti 96-well thermal cycler montré dans la figure ci-dessous. Toutes les réactions ont été réalisées à l'aide d'un témoin positif et un témoin négatif.



Figure 18 : Thermocycleur Applied biosystems veriti®

Le programme d'amplification consiste en 30 cycles dont les conditions sont résumées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Conditions d'amplification des gènes *bla* par PCR

Etapes d'amplification	**Condition de température/durée**			
	bla ***SHV, CTX-M, OXA-48, NDM, IMP, VIM, KPC***	***bla*** ***TEM***	***bla*** ***OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58***	***bla*** ***ACC, FOX, MOX, EBC, CIT, DHA***
Dénaturation initiale	95 °C/5 min	94 °C/5 min	94 °C/5 min	94 °C/3 min
Dénaturation cyclique	95 °C/1 min	94 °C/1 min	94 °C/25 s	94 °C/30 s
Hybridation	60 °C/1 min	52 °C/1 min	52 °C/40 s	64 °C/30 s
Elongation cyclique	72 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/50 s	72 °C/1 min
Elongation finale	72 °C/7 min	72 °C/7 min	72 °C/6 min	72 °C/7 min

XI - Electrophorèse sur gel d'agarose

La révélation des séquences d'ADN amplifiées a été réalisée par la technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique et selon leur poids

moléculaire [103]. La distance de migration est inversement proportionnelle au poids moléculaire des molécules à séparer.

1 - *Préparation du gel*

La concentration en agarose utilisé est de 1% dans le tampon TBE 0,5X. Ce gel d'agarose est solubilisé dans un four à micro-ondes pendant 2 min. une fois refroidi, 1,5 µl de Bromure d'éthidium pour 100 ml de TBE a été rajouté. Ensuite, l'agarose a été versé dans un moule pourvu d'un peigne creusant des puits pour y déposer les produits de la PCR.

Après solidification du gel, le peigne est retiré, ainsi que les rubans adhésifs qui fermaient les extrémités du moule. Le gel est ensuite placé dans la cuve d'électrophorèse, qui sera remplie de tampon TBE 0,5X jusqu'à ce que le gel soit complètement immergé.

2 - *Electrophorèse*

Après la préparation du gel, une électrophorèse horizontale est réalisée. Dans chaque puit du gel, un mélange de 12 µl contenant 10 µl de produit de PCR auquel ont été rajoutés 2 µl de bleu de bromothymol est introduit dans chaque puits. Le générateur a été réglé à une tension de 100Volts, un courant de 80 mA et une puissance de 55Watt et le temps de migration est ajustée à 1 heure.

Après une heure de migration, les bandes d'ADN ont été visualisées sous la lumière UV.

XII - Réaction de séquençage

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger modifiée [104]. Tous les produits amplifiés obtenus ont été séquencés au Centre Universitaire Régional d'Interface à Fès (C.U.R.I.) afin de valider leurs identités. Les deux brins des amplicons purifiés ont été séquencés avec un analyseur génétique 31301 (Applied Biosystems, Foster City, CA) avec les mêmes amorces que celles utilisées pour l'amplification par PCR. Le séquenceur utilisé est montré dans l'image ci-dessous.



Analyseur génétique 31301 (Applied Biosystems, Foster City, CA)

Les séquences de nucléotides et de protéines déduites ont été analysées à l'aide d'un logiciel disponible sur Internet sur le site Web du Centre national d'information sur la biotechnologie (NCBI).

XIII - Détermination du support génétique de la résistance aux antibiotiques

1 - *Conjugaison bactérienne*

La conjugaison bactérienne est le transfert d'un plasmide conjugatif ou d'un transposant, codant pour la résistance à un ou plusieurs antibiotiques, entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice. La sélection des transconjugants s'effectue en présence de deux antibiotiques : l'un correspond à l'une des résistances transférées de la souche donatrice et l'autre à la résistance non transférable de la souche réceptrice.

La conjugaison est réalisée en utilisant comme souche réceptrice la souche d'*E.coli* K12J5 résistante à l'azide de sodium selon le protocole décrit par Honoré et coll, 2006. Les transconjugants sont sélectionnés sur gélose LB (Luria Bertani) additionné de l'azide de sodium à 200 mg/L et la céfotaxime à 1 mg/L.

Protocole expérimental

A partir d'une culture de 24h de la SD et la SR réalisée sur milieu LB, 10 mL bouillon BHI sont inoculés avec une colonie de la SD ainsi que pour la SR. Ces bouillons sont ensuite incubés à 37°C pendant 2 à 3h jusqu'à avoir un inoculum correspondant à 0.5 McF. Un mélange de1 mL de la SR et 1 mL de la SD et 1 mL de BHI a été préparé dans un tube de 15 mL stérile, puis incubé à 37°C pendant 3 à 4h. À la fin, 100 µL de ce mélange ont été déposés et étalés sur une boite gélosée contenant le milieu MH additionnées aux agents de sélection (céftazidime et azide de sodium) puis incubés 18 à 24h à 37°C. L'analyse des transconjugants a été effectuée par le test de synergie et la PCR.

2 - Extraction plasmidique

La technique d'extraction plasmidique est basée sur la lyse bactérienne, par un traitement par du dodécylsulfate de sodium (SDS) alcalin combiné à la chaleur, suivi d'une élimination des contaminants majeurs comme les protéines, l'ADN chromosomique, l'ARN de haut poids moléculaire et les débris cellulaires en utilisant des solvants organiques.

L'extraction de l'ADN plasmidique des souches BLSE et de leurs transconjugants a été réalisée selon le protocole de Kado et Liu [105].

Les profils plasmidiques sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.75 % et la taille des plasmides est estimée par comparaison avec des plasmides de taille connue :

V517 (54 kb, 7.2 kb, 5.6 kb, 5.1 kb, 3.9 kb, 3 kb, 2.7 kb, 2.1 kb) et Pip173 (125 kb).

Protocole experimental

A partir d'une souche de 24h isolée sur gélose LB additionnée à 1µg/L de l'antibiotique approprié, plusieurs colonies ont été raclées et suspendues dans 50µL de tampon de pré-lyse (50 mM Tris, 1mM EDTA, pH=7,9). L'homogénéisation a été effectuée par aspiration et refoulement sans former de bulles. Ensuite, 100µL la solution de lyse (50 mM Tris-base, 3% SDS, 2N NaOH pH =12,6) a été rajoutée. Les tubes eppendorfs ont été mélangés par retournement et ont été ensuite incubés pendant 30 à 40 mn dans un bain marie, réglé à 56°C. Puis, 100µL du mélange phénol/chloroforme (1V/1V) ont été ajoutés et mélangés par retournement. La centrifugation de ce mélange a été réalisée à 12000 g pendant 20 mn à la température ambiante. Le surnagent a été transféré dans un nouveau tube eppendorf. A la fin, la révélation a été réalisée sur gel d'agarose de 0,7 % à 90V pendant 3h. Le dépôt de 30µL du

produit final sur ce gel a été suivi par une coloration de 15min dans une solution de bromure d'éthidium avant sa visualisation sous les rayons UV.

3 - *Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)*

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE pour Pulsed-Field Gel Electrophoresis) permet de mettre en évidence le polymorphisme génétique de différentes souches bactériennes d'une même espèce. Cette technique consiste à analyser sur gel d'agarose les segments d'ADN de grande taille, obtenus après digestion enzymatique de l'ADN total des souches bactériennes [106].

Protocole

Culture

A partir d'une culture bactérienne de 24h à 37°C, quelques colonies de l'isolat à tester ont été mis en suspension dans 2ml de CBS (Tris HCl (100mM), pH=8 ; EDTA (10mM), pH=8). La densité optique de chaque souche a été mesurée et réglée à une DO=1 à u,e longueur d'onde de 590. Ensuite 200µl de la suspension bactérienne ont été mélangés avec 200µl d'agarose Low melting point (2% dissoute dans CBS + 1% SDS). Cette mixture a été rapidement répartie dans des moules et les blocs ont été laissés se solidifier à une température de 4°C pendant 15 min. les blocs ont été mis deux à deux dans 1ml de solution de lyse CLS-1 (Tris-HCl (50mM), pH=8 ; EDTA (50mM), pH=9 ; Protéinase K (1,5mg/ml) ; Lysosyme (2,5mg/mL)) puis incubés au bain-marie à 37°C pendant 1h. Ces deux blocs ont été transférés sur un nouveau tube, contenant 1ml de CLS-2 {EDTA (0,5M) ; Sarcosyl (1%) ; Protéinase K (400µg/ml)}. L'ensemble des tubes sont incubés à 55°C pendant 2h.

Lavages

Les blocs ont été lavés 3 fois avec 4ml d'H_2O préchauffée à 50°C pour chaque lavage, puis ont été incubés au bain-marie à 50°C pendant 15 min sous agitation lente. Ensuite, transférés dans 4ml de TE buffer (Tris HCl (10mM), pH=8 ; EDTA (0,1mM), pH=8) préchauffés à 50°C et incubés au bain-marie à 50°C pendant 15min. cette étape a été répétée 2 fois.

Digestion

Un quart de chaque bloc a été coupé avec un scalpel. Il a été ensuite plongé dans 100µl de la solution tampon de restriction (1X) et laissé diffuser 15 min à 37°C au bain-marie.

La solution tampon a été remplacée par 100µl de tampon contenant 50 Unités d'enzyme XbaI puis, incubée à 37°C au bain-marie pendant 2h. Les bouchons digérés ont été ensuite mis dans 200µl de TBE (0,5X) pendant 10 min.

Les blocs ont été insérés dans les puits de gel agarose de 1%. Ces puits ont été ensuite remplis par l'agarose LMP (2% dissout dans TBE 0,5X).

Le gel a été placé dans la cuve d'électrophorèse contenant 3L de TBE 0,5X et l'électrophorèse a été effectuée selon les conditions suivants :

- Initial switch time: 5 secondes
- Final switch time: 30 secondes
- Temps de migration : 20-24h
- Volts/cm : 6V/cm^2
- Included angle : 120°
- Température : 14°C

A la fin, le gel est sorti puis déposé dans un bac à coloration contenant 300ml d'eau stérile ajoutée de 5µg/ml de bromure d'éthidium pendant 30 min à l'abri de la lumière.

Analyse statistique

Les facteurs de risque potentiels associés à la colonisation par les bactéries à Gram – multi-résistantes (BGN-MR) ont été étudiés. Les caractéristiques sociodémographiques et cliniques des patients ont été recueillies de manière prospective à l'aide d'une fiche d'étude et l'analyse statistique de ces éléments a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, États-Unis). Elle consiste d'abord à faire une description de la population étudiée. Les données qualitatives sont exprimées en pourcentage et les données quantitatives par la moyenne et l'écart type. Ensuite, une analyse univariée a été réalisée pour établir l'association entre le portage de BMR et plusieurs variables explicatives qui sont le sexe, l'âge, le poids à la naissance, la prématurité, le lieu de naissance, la provenance, la voie d'accouchement, la date d'hospitalisation et le diagnostic après admission au NICU.

En cours d'hospitalisation, l'association entre la colonisation par des BMR et les différentes variables étudiées a concerné également l'antibiothérapie, l'allaitement, le cathétérisme veineux central ou périphérique et la durée du séjour à l'hôpital. Le test du chi carré et le test exact de Fisher ont été utilisés dans cette comparaison. Lorsque p est inférieur à 0,05, le test est jugé significatif.

Une analyse multivariée par régression descendante a été réalisée pour identifier des facteurs de risque potentiels associés à la colonisation intestinale par des BGN-MR à l'aide d'une analyse de régression logistique binaire. Toutes les variables avec p <0,2 dans l'analyse univariée ont été incluses pour une analyse multivariée. L'Odds Ratio a été présenté avec un intervalle de confiance de 95%. (OR, IC 95%). Les mêmes variables ont été étudiées en analyse univariée. Ce sont le sexe, l'âge, le poids à la naissance, la prématurité, le lieu de naissance, la provenance, la voie d'accouchement, la date d'hospitalisation, le diagnostic après admission au NICU, l'antibiothérapie, l'allaitement, le cathétérisme veineux central ou périphérique et la durée du séjour à l'hôpital.

Résultats

Les résultats que nous allons présenter concernent :

- Les caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée.
- Les résultats de dépistage des BMR (SARM, E-BLSE, E-CASE, EPC, ABRI et PARI) au niveau nasal et intestinal, ainsi que les profils de résistance aux antibiotiques de ces bactéries de portage.
- Les résultats de l'étude de l'acquisition nosocomiale des BMR par les nouveau-nés au cours de leur hospitalisation.
- Les déterminants moléculaires de la résistance aux antibiotiques de toutes les bactéries isolées.
- Les facteurs de risques associés à la colonisation ainsi qu'à l'acquisition des BMR.
- Les résultats des prélèvements de l'environnement du service.

I - Caractéristiques sociodémographiques

Au total, 455 nouveau-nés ont été inclus dans cette étude, 301 patients NN ont fait l'objet du dépistage à l'admission et au cours de leur hospitalisation dans le service de Néonatologie et de réanimation néonatale. Cette proportion représente les NN inclus dans l'étude d'acquisition. Par contre, 154 NN ont été ont été exclus de cette étude car ils ont quitté le service avant le deuxième dépistage programmé. Ce sont les patients décédés, transférés à un autre service ou patients sortis dans un délai inférieur à 5 jours d'hospitalisation).

La médiane d'âge de ces NN a été de 1 jour avec un étendu de 147 jours et leur poids moyen a été de 2612±1023 grammes. La moitié des NN étaient des prématurés. 51,8% provenaient de la maternité du CHU. Une proportion de 57% de NN a été admise pour une détresse respiratoire. Les données sociodémographiques des patients hospitalisés sont présentées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Caractéristiques sociodémographiques de la population étudiée

Caractéristiques		Effectif (N=455)	Pourcentage (%)
Sexe	Masculin	267	58.7
	Féminin	188	41.3
Age (j)	0-2	308	67.6
	>2	147	32.3
Prématurité	Oui	223	49
	Non	232	51
Poids à la naissance (g)	<2500	226	49.6
	≥2500	229	50,3
Provenance	Maternité CHU	236	51.8
	Autres établissements	124	27.3
	Domicile	95	20,8
Lieu de naissance	Maternité CHU	265	58.2
	Autres établissements	164	36
	Domicile	26	5.7
Motifs d'hospitalisation	Détresse respiratoire	259	56.9
	Ictère	38	8.4
	Pathologie chirurgicale	31	6.8
	Souffrance néonatale	34	7.5
	Infection néonatale	35	7.7
	Détresse neurologique	44	9.7
	Malformation congénitale	11	2.4
	Autres	49	11.8

II - Dépistage de la colonisation par des BMR à l'admission

Le dépistage des BMR a concerné le portage intestinal aux entérobactéries multi-résistants et non entérobactéries : *P. aeruginosa* et *A. baumannii* multi-résistants, ainsi que le portage nasal à *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline.

1 - Dépistage du portage intestinal des entérobactéries multi-résistantes

A - Prévalence du portage intestinal d'EMR

Durant la période d'étude, 455 NN ont fait l'objet d'un prélèvement rectal lors de leur admission dans le service, 261 NN ont été colonisés par au moins une seule espèce bactérienne appartenant au groupe des BGN (57,3%), et 194 NN ont présenté un prélèvement négatif aux BGN à l'admission.

Le tableau 11 représente la fréquence du portage intestinal à l'admission des entérobactéries (BLSE, EPC et CASE) chez les NN.

Tableau 11 : Prévalence du portage intestinal des E-BLSE, des EPC et des E-CASE chez les nouveau-nés à l'admission

Entérobactéries MR	Fréquence du portage à l'admission* [%]	Nombre des non porteurs d'EMR /Nombre total des patients
E-BLSE	22,4	102/455
K. pneumoniae	77,4	79/102
E. coli	32,3	33/102
Autres	8,8	9/102
EPC	8,7	40/455
K. pneumoniae	42,5	17/40
E. coli	45	18/40
Autres	12,5	5/40
E-CASE	10,1	46/455
K. pneumoniae	21,7	10/46
E. coli	71,7	33/46
Autres	19,5	9/46

* un patient peut être colonisé par une E-BLSE, E-CASE et/ou EPC.

Parmi tous ces nouveau-nés évalués à l'admission, 33% étaient colonisés par des entérobactéries multi-résistantes MR dans leurs intestins (150/455).

Concernant les types de résistance, la **production de BLSE** a été enregistrée chez 22,4% des patients nouveau-nés (102/455), 77,4% de ces NN sont colonisés par *K. pneumoniae et* 32,3% portaient des *E. coli* producteurs de BLSE.

La résistance de type **carbapénèmase** a été notée chez 8,7% des nouveau-nés avec une prédominance d'*E. coli* (45%) suivie de *K. pneumoniae* avec 42,5%.

D'autre part, 46 patients été colonisés par des entérobactéries **céphalosporinases**, avec une prévalence de portage de 10%. *E. coli* était prédominante, présente chez 71,7% de ces NN, suivie de *K. pneumoniae* céphalosporinases (21,7%).

B - *Fréquence des entérobactéries identifiées*

Dans cette étude, un total de 755 bacille à Gram- (BGN) ont été isolés et identifiés par les prélèvements à l'admission et des prélèvements à la sortie. Parmi ces bacilles, 370, identifiés à l'admission, sont répartis entre entérobactéries, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*.

Les entérobactéries étaient majoritaires avec 313 isolats. E. *coli* était dominante avec 48.2% suivi de *K. pneumoniae* avec 39.6%.

La figure 18 présente la répartition de toutes les entérobactéries isolées en portage intestinal à l'admission chez la population étudiée.

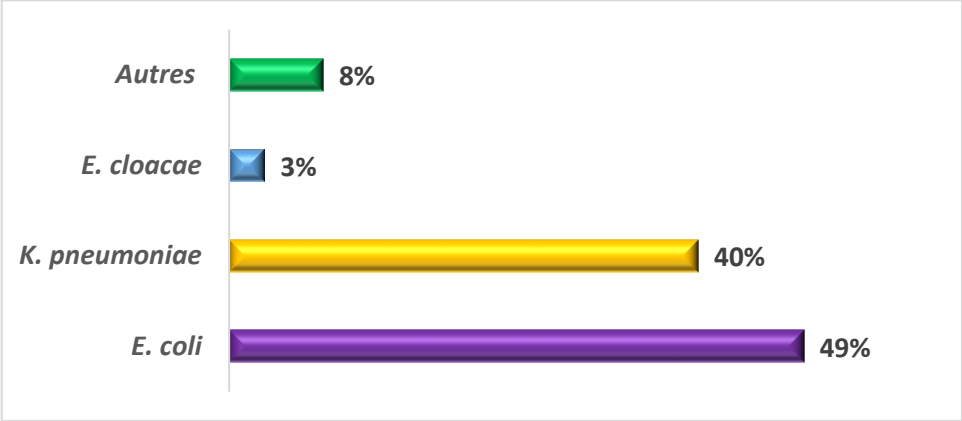


Figure 19 : diagramme des fréquences relatives des entérobactéries en portage intestinal chez les nouveau-nés à l'admission

C - *Profil de résistance aux antibiotiques des différents isolats d'entérobactéries*

a - *Fréquence de la résistance*

Les profils de résistance des entérobactéries vis-à-vis des différents antibiotiques testés chez les NN à l'admission ont montré un taux de résistance élevé pour l'ampicilline (75,3 %),

suivi par celui de l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique (53,9%). La résistance à céftazidime/céfotaxime était aussi élevée avec 47,6%. Cependant, le taux de résistance à l'Amikacine était de 0,9%.

Les différents profils de résistance trouvés en fonction des espèces bactériennes sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Fréquence de la résistance des différentes entérobactéries isolées

Entérobactéries identifiées (Nombre (%))	**Nombre des isolats résistants à l'admission**									
	AMP	**AMC**	**FOX**	**CTX/ CAZ**	**GN**	**AK**	**NA**	**NOR/ CIP**	**SXT**	**ETP**
E. coli (N=152 ; 48%)	88	65	36	56	51	2	53	46	38	18
K. pneumonia (N=124; 39.6%)	*	80	3	79	72	0	39	39	49	17
E. cloacae (N=11; 3.5%)	*	*	*	9	7	0	7	5	6	4
K. oxytoca (N=10; 3.1%)	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
C. freundii (N=5 ; 1.5%)	*	*	*	3	2	1	2	2	1	0
P. mirabilis (N=5 ; 1.5%)	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
M. morganii (N=2 ; 0.6%)	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0
C. braakii (N=1 ; 0.3%)	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0
P. vulgaris (N=1 ; 0.3%)	*	1	1	0	0	0	0	0	0	0
P. stuartii (N=1 ; 0.3%)	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0
S. marcescens (N=1 ; 0.3%)	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0
Total Des entérobactéries *(N=313 ; 100%)*	236 (75,3)	169 (53,9)	62 (19,8)	149 (47,6)	133 (42,4)	3 (0,9)	102 (32,5)	93 (29,7)	95 (30,3)	40 (12,7)

*résistance naturelle

AMP : ampicilline ; AMC : amoxicilline/acide clavulanique ; FOX : céfoxitine ;
CTX : céfotaxime ; CAZ : céftazidime ; GN : gentamicine ; AK : amikacine ;
NA : acide nalidixique ; NOR : norfloxacine ; CIP : ciprofloxacine, SXT : cotrimoxazol ;
ETP : ertapénéme.

b - Types de résistance chez les entérobactéries

Trois types de résistance ont été étudiés : la production de BLSE, de CASE et de CARBA.

- L'antibiogramme des bactéries isolées des NN à l'admission a montré la présence des E-**BLSE** avec 34% (108/313) et une prédominance de l'espèce *K. pneumoniae* (77 isolats) suivi

d'*E. coli* avec 25 isolats. D'autres espèces w<d'E-BLSE ont été identifiées : 3 isolats d'*E. cloacae*, 2 de *C. freundii* et 1 de *K. oxytoca*.

- Les **entérobactéries productrices de céphalosporinases** (E-CASE) présentaient également un taux de résistance assez élevée : 14.6% (46/313) dont 71% étaient des isolats d'*E. coli* (n=33), suivi d'*E. cloacae* avec 7 isolats ; les six souches restantes sont répartis entre *C. freundii* (n=3), *K. pneumoniae* (n=2) et *P. mirabilis* (n=1).
- Les **entérobactéries productrices de carbapénèmases** (EPC) présentaient à l'admission un taux de 12,7% (40/313). La fréquence de production de ces enzymes a été presque la même chez *K.pneumoniae* et *E. coli* avec 40% et 42.5% respectivement. Avec en plus de 4 souches d'*E. cloacae* et une souche de *K. oxytoca*.

c - Co-résistances chez les entérobactéries multi-résistantes

Les types de résistances étudiés (BLSE, CASE et CARBA) sont souvent associés à d'autres résistances, particulièrement, la résistance à la gentamicine, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine et le cotrimoxazol.

i - E-BLSE

La figure 19 montre que la co-résistance la plus associée à une BLSE a été la résistance à la gentamicine avec un taux de 86%. Autour de 50% à l'acide nalidixique et la Ciprofloxacine et au cotrimoxazol avec 44%.

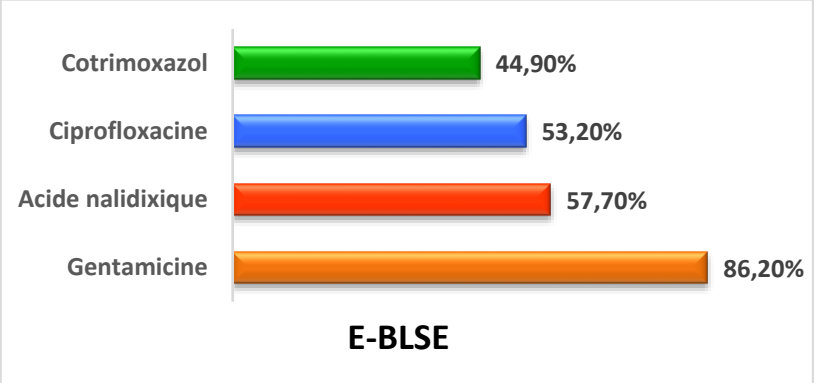


Figure 20 : Taux des résistances associées chez les isolats d'E-BLSE

ii - E-CASE

La co-résistance chez les E-CASE a été souvent associée à la gentamicine, à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine avec des pourcentages respectifs de 83%, 79% et 75%. Cependant, 30% de ces E-CASE ont été résistants au cotrimoxazol (figure 20).

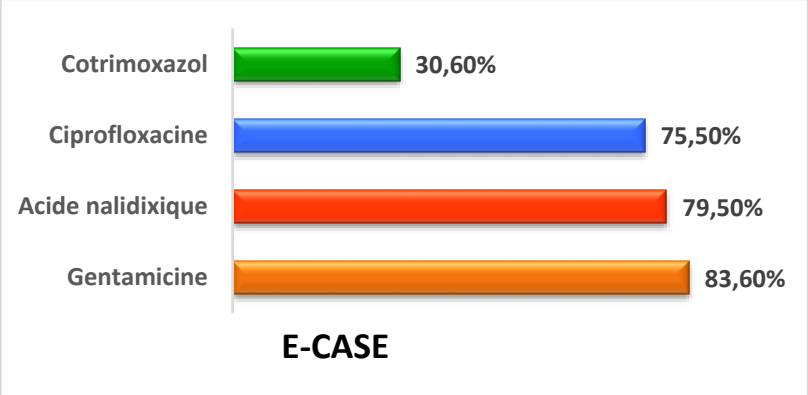


Figure 21 : Taux des résistances associées chez les isolats E-CASE

iii - EPC

Concernant les EPC, les co-résistances enregistrées ont été proche à celles obtenues avec les E-CASE comme le montre la figure 21.

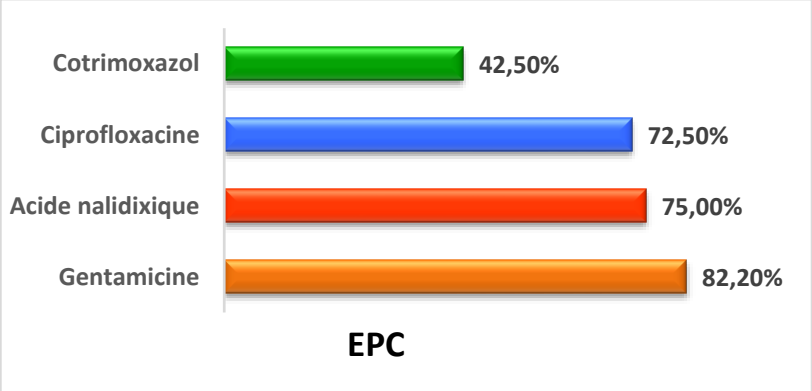


Figure 22 : Taux des résistances associées chez les EPC

2 - Dépistage intestinal des non entérobactéries

A - Prévalence du portage intestinal

Les mêmes NN dépistés à l'admission (n=455) pour la recherche des entérobactéries ont fait également l'objet d'un dépistage à la recherche d'*A. baumannii* MR et *P. aeruginosa* MR. Les résultats du dépistage ont montrés que 45 patients ont été porteurs d'*A. baumannii* à l'admission. Ce qui correspond à 9,8% des nouveau-nés colonisés par ce germe (45/455). Parmi ces 45 patients, 30 ont été porteurs d'A. *baumannii* multi-résistant (6,5%), dont 6 nouveau-nés colonisés par des isolats d'*A. baumannii* résistants à l'imipénème.

D'autre part, 21 isolats de *Pseudomonas aeruginosa*, ont été identifiés et ont été tous sensibles à tous les antibiotiques testés (pépiracilline, ticarcilline, ticarcilline/acide clavulanique,

pepiraciline/tazobactam, céftazidime, aztréonam, imipénème, gentamicine, amikacine, tobramycine, ciprofloxacine).

B - *Profil de résistance aux antibiotiques des isolats d'A. baumannii*

L'espèce *A. baumannii* est connue par sa multi-résistance à plusieurs antibiotiques. la figure 22 montre que dans notre étude, plus de 64% des isolats ont été résistante à la céftazidime, ciprofloxacine, gentamicine, tobramycine, ticarcilline, ticarcilline/acide clavulanique et pépiracilline.

La résistance à la pépiracilline/tazobactam et l'imipenème a été moins élevée avec une fréquence de 17,7% et 13,7% respectivement. La résistance à l'amikacine n'a été que de 2,2%.

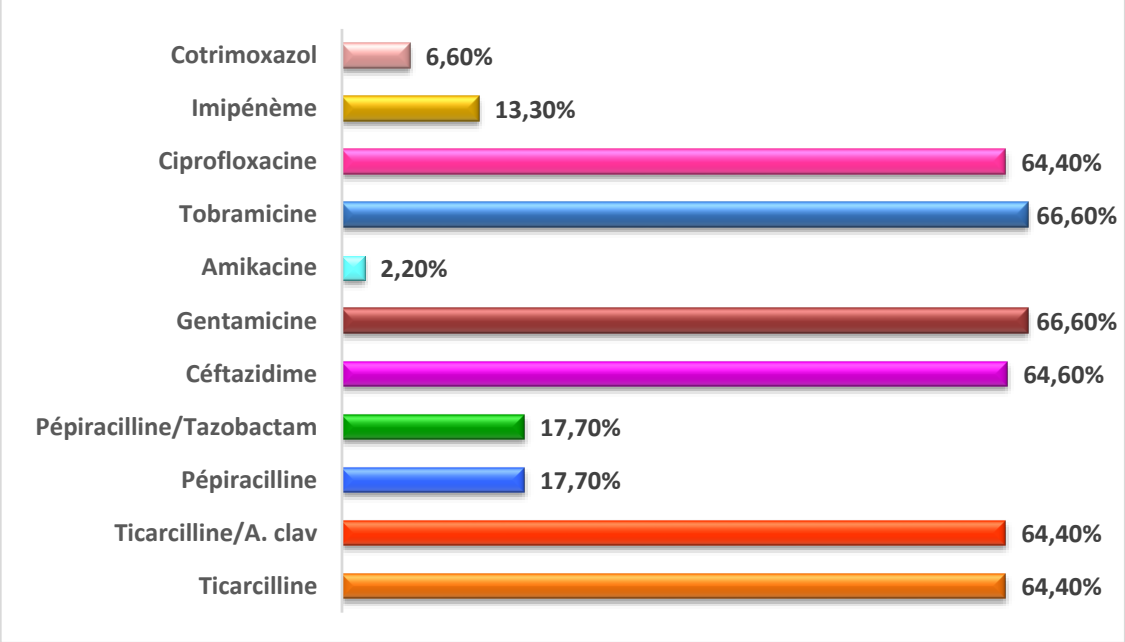


Figure 23 : Fréquence de résistance des isolats d'*A. baumannii* à l'admission en fonction des différentes antibiotiques testés

3 - *Dépistage du portage nasal du SARM*

L'étude du portage nasal de *Staphylocoques aureus* chez les mêmes NN étudiés était très faible. Entre les prélèvements d'admission et ceux réalisés au cours de l'hospitalisation suelement 8 isolats de *S. aureus* sensible à la méthicilline (SASM) ont été identifiés.

III - Acquisition de BMR au cours de l'hospitalisation

Les patients inclus dans cette étude d'acquisition ont bénéficié de deux prélèvements : un à l'admission et un deuxième après 5 jours d'hospitalisation. Ces patients qui ont été inclus ne sont pas porteurs de BMR à l'admission.

L'étude de l'acquisition de BMR a concerné l'acquisition nasal de *S. aureus* résistants à la méthicilline, ainsi que l'acquisition intestinale d'entérobactéries multi-résistantes et non entérobactéries : *P. aeruginosa* et *A. baumannii* multi-résistants.

1 - Acquisition d'EMR en cours d'hospitalisation

A - Sélection des patients

L'étude de la colonisation des nouveau-nés a concerné 455 patients lors de leurs admissions dans le service de néonatologie et réanimation néonatale, 150 NN ont été trouvés déjà colonisés par des EMR à l'admission, ils ont été de ce fait écarté de l'étude de l'acquisition. Parmi les 305 NN restants, 98 ont été exclus car ils ont quitté le service sans prélèvements de sortie (réparties entre patients décédés, patients transférés à un autre service ou patients sortis dans un délai inférieur aux 5 jours d'hospitalisation prédéfinis dans l'étude).

Ainsi, les 207 NN restants ont bénéficié d'un prélèvement à l'admission et d'un deuxième en cours d'hospitalisation. Ces NN constituent la population incluse dans l'étude d'acquisition des EMR.

La figure 23 représente un récapitulatif des prélèvements réalisés sur les NN à l'admission et en cours de l'hospitalisation.

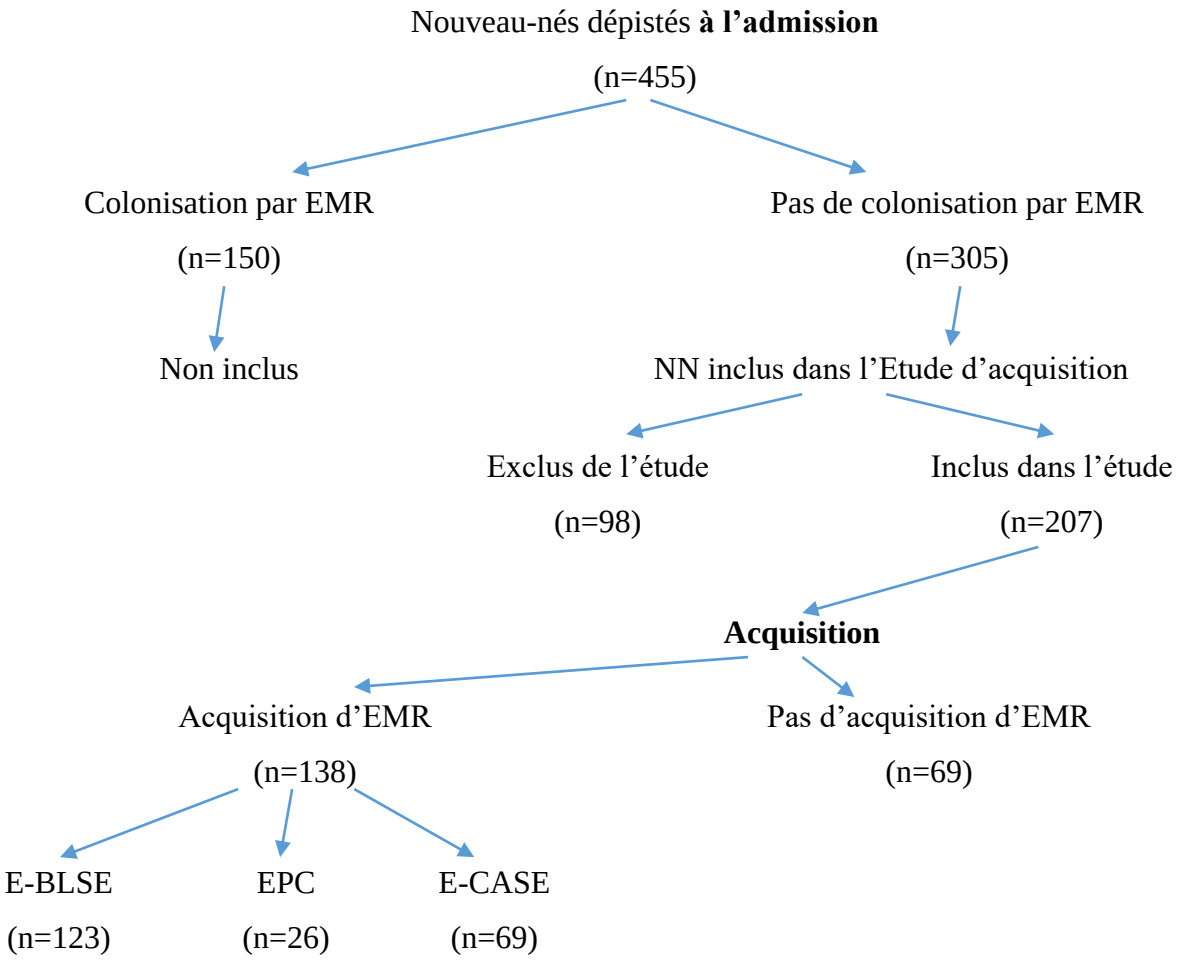


Figure 24 : Organigramme des patients inclus dans l'étude d'EMR

B - *Prévalence d'acquisition nosocomiale des entérobactéries multi-résistantes (EMR)*

La population incluse dans l'étude d'acquisition nosocomiale d'EMR est composé de 207 nouveau-nés dont 138 ont acquis au moins une entérobactérie multi-résistante (66,6%). Cent vingt-trois des NN sont devenues colonisés par des **E-BLSE** (59,4%). Ces entérobactéries BLSE ont été représentées principalement par *K. pneumoniae* BLSE avec 94,3%

La résistance de type **carbapénèmase** a été enregistrée chez 26 nouveau-nés. Ainsi, 12,5% des NN ont acquis une EPC au cours de leur hospitalisation, avec une prédominance d'*E. coli* (61.5%) suivie de *K. pneumoniae* avec 46,1%.

D'autre part, 69 NN ont été trouvés colonisés par des E-CASE en cours d'hospitalisation, ce qui correspond à une prévalence d'acquisition de 33%. Chez ces NN, *E. coli* était prédominante avec 84,7%, suivie de *K. pneumoniae* avec 56,5%.

Le tableau 13 présente la fréquence d'acquisition intestinale des entérobactéries productrices de BLSE, CASE et CARBA chez les NN.

Tableau 13 : Prévalence d'acquisition intestinale des E-BLSE, EPC et E-CASE chez les nouveau-nés en cours d'hospitalisation (n=207)

Entérobactéries MR	Fréquence d'acquisition d'EMR en cours d'hospitalisation * [%]	Nombre de NN ayant acquis d'EMR en cours d'hospitalisation /Nombre total des NN
E-BLSE	59.4	123/207
K. pneumoniae	94.3	116/123
E. coli	26	32/123
Autres	8.1	10/123
EPC	12.5	26/207
K. pneumoniae	46.1	12/26
E. coli	61.5	16/26
Autres	7.6	2/26
E-CASE	33.3	69/207
K. pneumoniae	56.5	26/69
E. coli	84.7	39/69
Autres	8.6	4/69

* un même patient peut être colonisé par une E-BLSE, E-CASE et/ou EPC.

C - *Répartition des entérobactéries identifiées*

Parmi les 755 BGN isolés durant notre étude, 385 ont été identifiées à partir des prélèvements réalisés en cours d'hospitalisation. Ces bactéries sont répartie entre entérobactéries *Pseudomonas* et *Acinetobacter*.

Les entérobactéries étaient majoritaires avec 328 isolats. *K. pneumoniae* a été identifié chez 195 nouveau-nés avec 59,4% suivie d'E. *coli* avec 33,2%.

D'autres entérobactéries ont été identifiées à des taux inférieur à 2%. La figure 24 montre la répartition d'espèces d'entérobactéries isolées chez les nouveau-nés en cours d'hospitalisation.

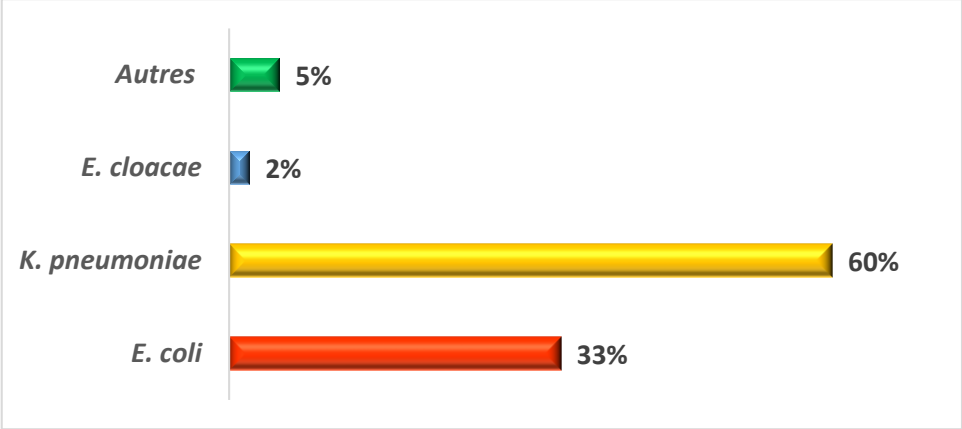


Figure 25 : Répartition des entérobactéries isolées chez les nouveau-nés en cours d'hospitalisation

D - *Profil de résistance aux antibiotiques des différents isolats d'entérobactéries*

a - *Fréquence de la résistance*

L'étude des profils de résistance des entérobactéries isolées en cours d'hospitalisation a montré que la quasi-totalité des isolats sont résistantes à l'ampicilline (97%) et à l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique (92%). La résistance à la céftazidime/céfotaxime a été de 89,9% et de 82,9% à la gentamicine. Plus que la moitié des isolats sont résistants à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine. Tandis que, 3% des isolats seulement ont été résistants à l'amikacine.

Le tableau 14 montre les différents profils de résistance trouvée en fonction des espèces bactériennes.

Tableau 14 : Fréquence de la résistance des différentes entérobactéries isolées en cours d'hospitalisation

Entérobactéries identifiées (Nombre. %)	**Nombre d'isolats résistants identifiés (%)**									
	AMP	**AMC**	**FOX**	**CTX/ CAZ**	**GN**	**AK**	**NA**	**NOR/ CIP**	**SXT**	**ETP**
K. pneumoniae (N=195; 59.4%)	*****	184	10	184	169	0	95	90	99	18
E. coli (N=109; 33,2%)	100	96	63	93	89	9	79	77	28	26
E. cloacae (N=6; 1.8%)	*	*	*	6	3	1	3	3	3	2
K. oxytoca (N=6; 1.8%)	*	5	1	5	5	0	2	2	3	2
C. freundii (N=5; 1.5%)	*	*	*	4	3	0	1	1	0	1
P. mirabilis (N=4; 1.2%)	4	3	0	2	2	0	2	0	0	0
M. morganii (N=2; 0.6%)	*	*	*	1	1	0	0	0	0	0
E. aerogenes (N=1; 0.3%)	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0
Total des Enterobacteries (N=328; 100%)	319 (97.2)	302 (92)	88 (26.8)	295 (89.9)	272 (82.9)	10 (3)	182 (55.4)	173 (52.7)	133 (40.5)	49 (14.9)

*résistance naturelle

AMP : ampicilline ; AMC : amoxicilline/acide clavulanique ; FOX : céfoxitine ; CTX : céfotaxime ; CAZ : céftazidime ; GN : gentamicine ; AK : amikacine ; NA : acide nalidixique ; NOR : norfloxacine ; CIP : ciprofloxacine, SXT : cotrimoxazol ; ETP : ertapénéme.

b - Types de résistances chez les entérobactéries

Trois types de résistance ont été étudiés chez les entérobactéries : la production de BLSE, de CASE et de CARBA.

L'antibiogramme des bactéries isolées a montré que les entérobactéries BLSE étaient le type de résistance le plus dominant avec 222 isolats (67%). Parmi E-BLSE, 177 sont des isolats de *K. pneumoniae* suivi de 30 isolats d'*E. coli*. D'autres espèces d'entérobactéries sont également sécrétrices de *β-lactamases* à spectre étendu. Ce sont : *E. cloacae* (5), *K. oxytoca* (5), *C. freundii* (3) et *P. mirabilis* (2).

Les E-CASE ont représenté 26% des EMR (86/328) avec prédominance d'*E. coli* (64 isolats). Par ailleurs, 15% des EPC (49/328) avec 53% d'*E. coli* (26 /49) et 36,7% de *K. pneumoniae* (18/49).

c - Co- résistances chez les entérobactéries multi-résistantes

Chez les isolats d'EMR isolés en cours d'hospitalisation, la production des enzymes BLSE, CASE et CARBA est souvent associés à l'expression d'autres résistances particulièrement, la résistance à la gentamicine, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine et le cotrimoxazol.

i - E-BLSE

La figure 25 montre que la co-résistance à la gentamicine représente le type de résistance le plus associé à une BLSE avec 89%. La moitié des E-BLSE sont co-résistantes à l'acide nalidixique, à la ciprofloxacine et à la cotrimoxazol avec des pourcentages respectifs de 50, 46 et 53%.

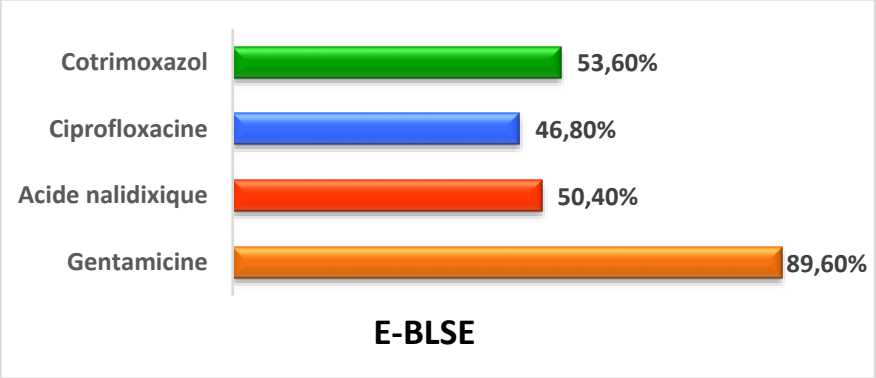


Figure 26 : Taux de résistances associées chez les isolats d'E-BLSE

ii - E-CASE

La résistance des E-CASE a été souvent associée à la résistance à la gentamicine, à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine avec des pourcentages respectifs de 90, 88 et 87%. Tandis que, 12% des isolats ont été co-résistante à la cotrimoxazol (figure 26).

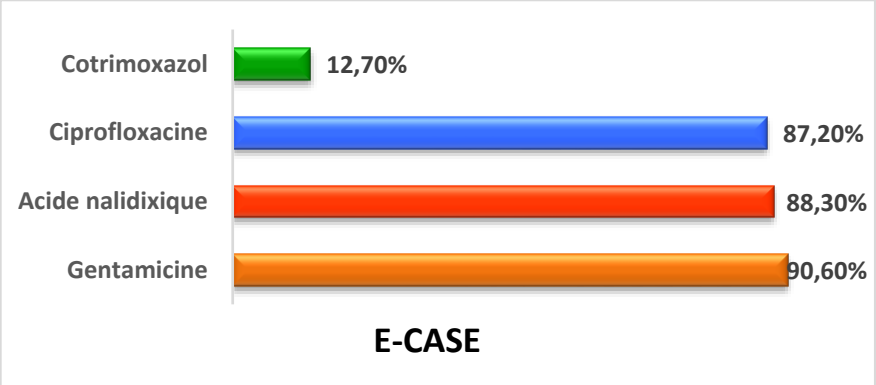


Figure 27 : Taux de résistances associées chez les isolats d'E-CASE

iii - EPC

Les entérobactéries productrices de carbapénèmases présentés sur la figure 27 ont un taux de résistance associée de 96% à la gentamicine, de 83,6% à l'acide nalidixique et de 83,6% à la ciprofloxacine et un taux beaucoup moins élevé à la cotrimoxazol (28,5%).

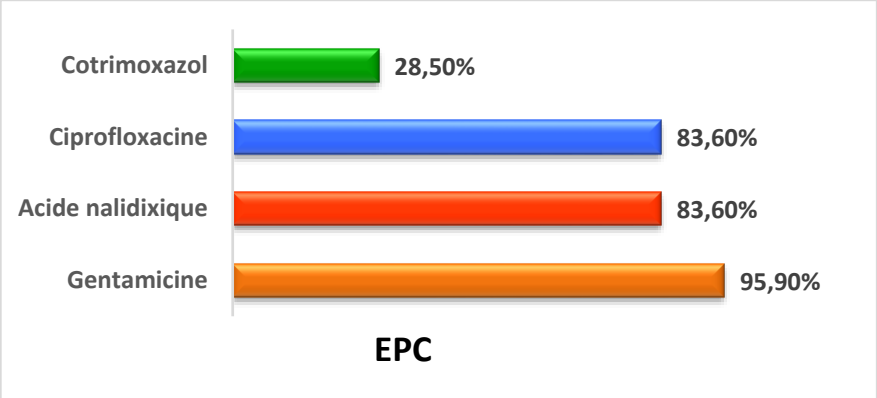


Figure 28 : Taux de résistances associées chez les isolats d'EPC

2 - Acquisition des non Entérobactéries multi-résistants (A. baumannii)

A - Sélection des patients

L'étude de la colonisation des nouveau-nés par *A. baumannii* et *P. aeruginosa* a concerné les mêmes patients admis au SNRN durant notre étude (n=455). A l'admission, 45 NN ont été écarté de l'étude d'acquisition car ils étaient déjà colonisés par *A. baumannii*. Parmi les 410 NN non colonisés restants, 133 NN ont été exclus car ils ont quitté le service pour avoir été transférés dans un autre service, ou pour cause de décès, ou bien pour une sortie précoce dans un délai inférieur à 5 jours d'hospitalisation.

Ainsi, les 277 NN qui ont bénéficié d'un prélèvement d'entrée et d'un deuxième prélèvement réalisé le 5ème jour d'hospitalisation ont constitué la population incluse dans l'étude d'acquisition d'*A. baumannii*.

La figure 28 montre un récapitulatif des prélèvements réalisés chez les NN à l'admission et en cours de l'hospitalisation.

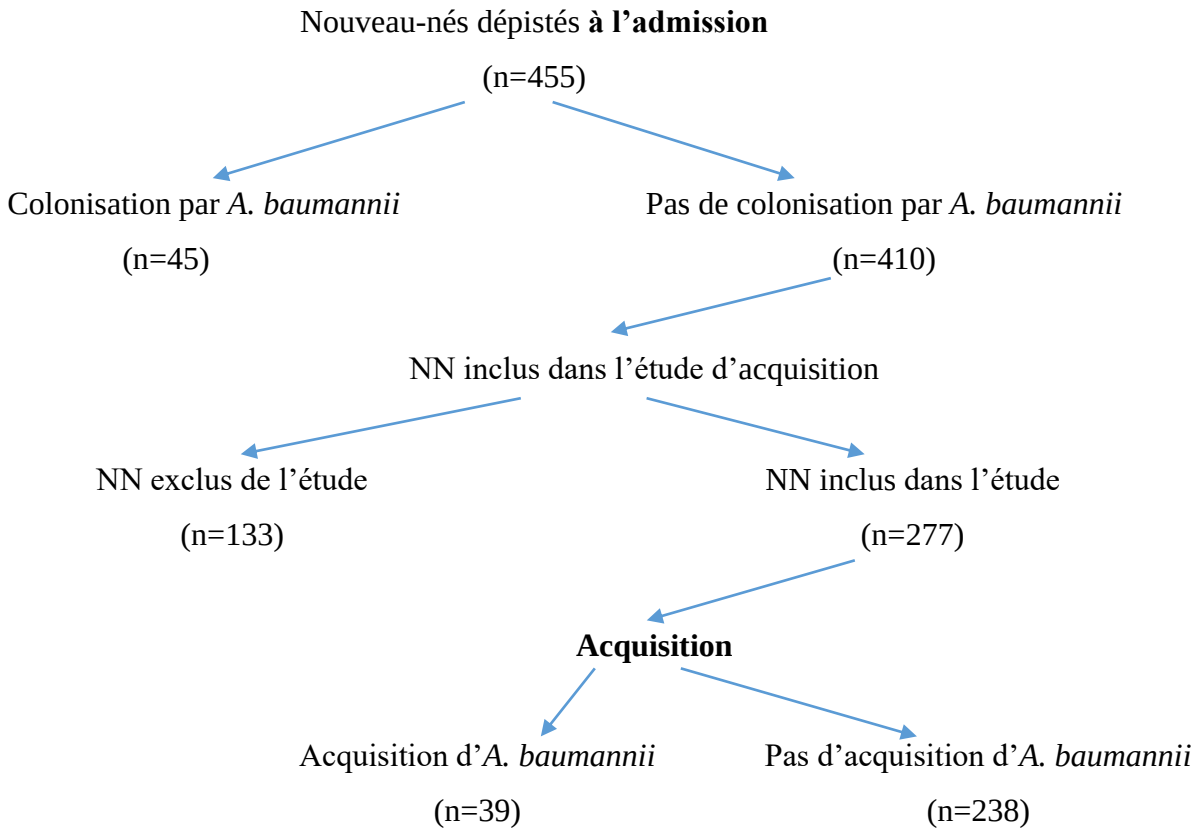


Figure 29 : Organigramme des patients de l'étude d'acquisition d'*A. baumannii*

B - Prévalence de l'acquisition d'A. baumannii en cours d'hospitalisation

L'étude de l'acquisition d'*A. baumannii* a montré que 39 NN l'ont acquis durant leur séjour à l'hôpital, ce qui correspond à une prévalence de 14% (39/277) dont 13 NN avaient un *A. baumannii* multi-résistant dans leurs intestins (13.7%) et 3 avaient un *A. baumannii* producteurs de carbapénèmases (1%).

C - Profil de résistance aux antibiotiques des différents isolats d'A. baumannii isolés en cours d'hospitalisation

L'étude du profil de résistance des *A. baumannii* isolés au cours de l'hospitalisation des NN représenté dans la figure 29 montre que la plupart des souches présentent une résistance à : la céftazidime avec un pourcentage de 97.4%, gentamicine avec 94.8%, tobramycine avec 94.8%, ticarcilline avec 92.3%, ticarcilline/acide clavulanique avec 92.3% et ciprofloxacine avec 89.7%. La résistance à la pépiracilline/tazobactam a été de 35%. Tandis que 7% seulement ont été résistantes à l'imipénème (figure 29).

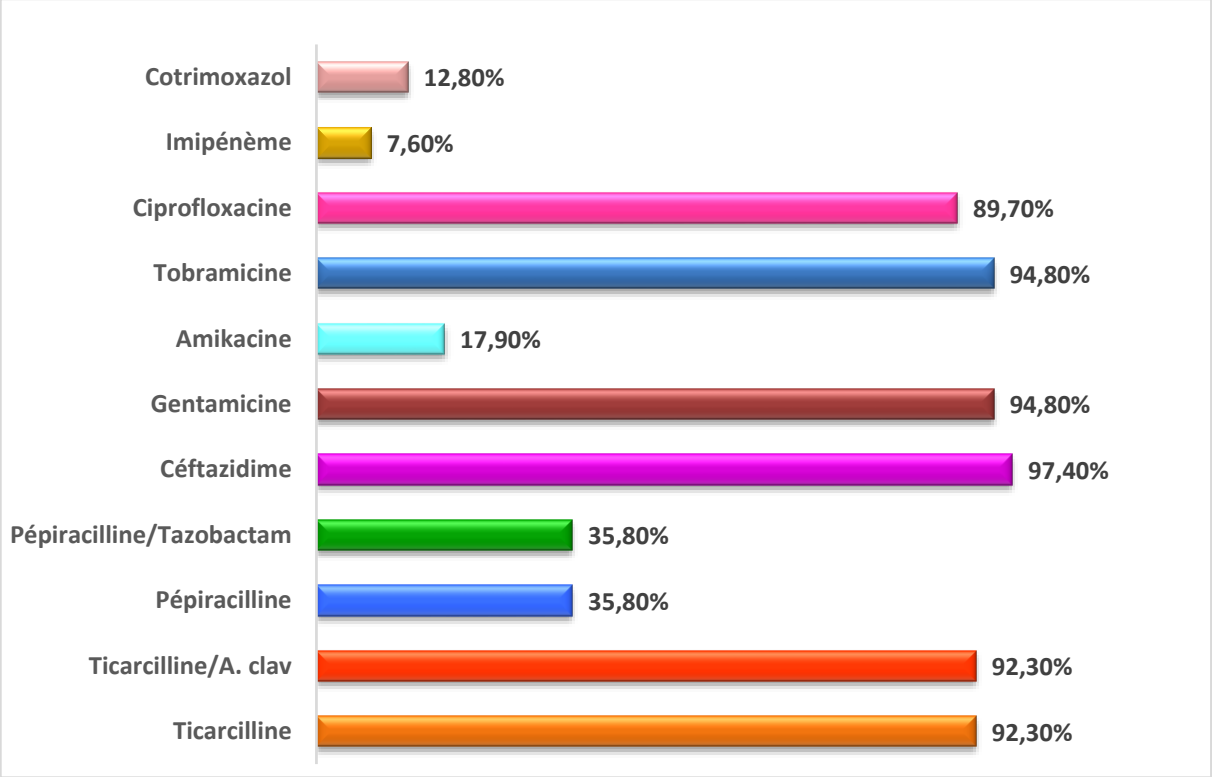


Figure 30 : Fréquence de résistance des isolats d'*A. baumannii* à l'admission en fonction des différents antibiotiques testés

IV - Profil phénotypique et génotypique des BMR isolées

Tous les isolats trouvés résistants aux Céphalosporines 3G et/ou à l'imipénème ont fait l'objet d'une recherche de gènes de résistance. Les tests phénotypiques de confirmation de la production des trois enzymes (BLSE, CASE ou CARBA). Pour cela, les tests de synergie, le test de Hodge et le test des MBL ont été réalisés.

1 - *Entérobactéries BLSE*

A - *Description phénotypique des isolats*

Parmi les 641 isolats d'entérobactéries collectées durant cette étude, 330 étaient BLSE (51,4%) dont l'espèce majoritaire était *Klebsiella pneumoniae* avec une fréquence de 76,9% (254/330), alors que 16,6% des isolats étaient des *Escherichia coli* (55/330). Ces souches ont été confirmées productrices BLSE par le test de synergie comme le montre l'image en bouchon de champagne sur la figure 30.

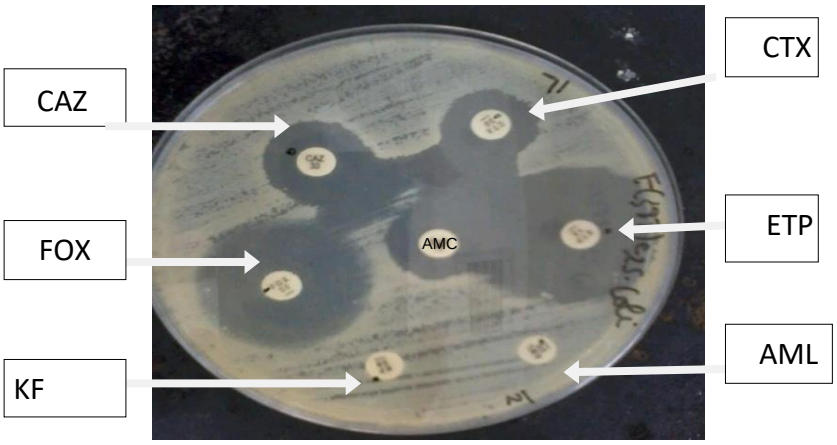


Figure 31 : Photo d'un test de synergie + d'un isolat de *K. pneumoniae* productrice de BLSE réalisé dans notre laboratoire

AML : Amoxicilline ; CAZ : Céftazidime ; CTX : Céfotaxime ;

FOX : céfoxitine ; ETP : ertapénéme et KF : Céfalotine

B - *Profil génotypique des entérobactéries BLSE*

Pour établir le profil génotypique de cette résistance, les gènes recherchés qui codent fréquemment pour la résistance BLSE étaient : bla_{SHV}, bla_{TEM} et $bla_{CTX\text{-}M\ 1}$, $bla_{CTX\text{-}M\ 2}$ et bla_{CTXM9}.

Comme le montre la figure 31, le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ était le plus dominant avec un pourcentage de 81,2% (268/330), suivi de bla_{SHV} avec un pourcentage de 69,6% (230/330).

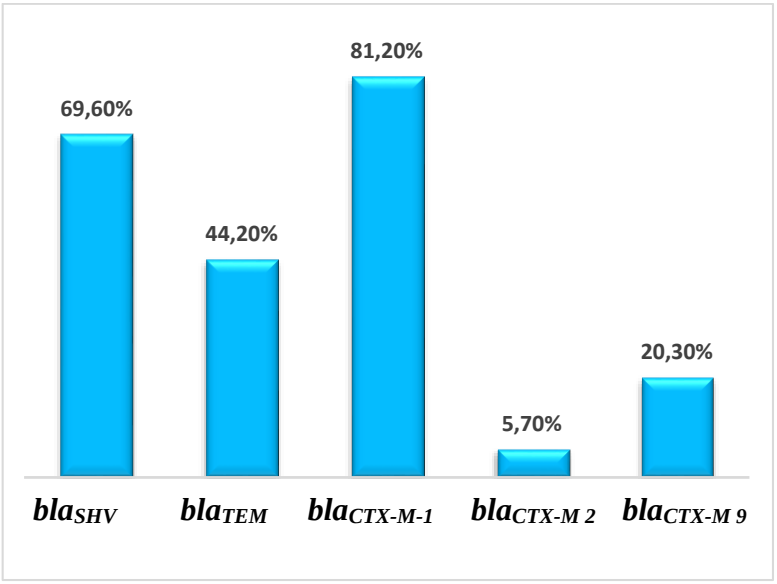


Figure 32 : Pourcentage de répartition des gènes codant une BLSE chez les entérobactéries

C - Répartition des gènes détectés en fonction des différentes espèces d'entérobactéries BLSE

Sur les 330 isolats BLSE, le gène *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ était présent chez 268 isolats répartis comme suit : 208 isolats de *K. pneumoniae,* 46 *E. coli*, 3 *E. cloacae*, 3 *K. oxytoca* et 8 *C. freundii.* Par ailleurs, le gène *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}2}$ n'a été détecté que chez l'espèce *K. pneumoniae* seulement (19 souches).

Le tableau 15 présente la répartition des différents gènes détectés en fonction des espèces bactériennes. Les gènes *bla* détectés ont été variables selon les espèces.

Tableau 15 : **Répartition des gènes codant pour une BLSE en fonction d'espèces d'entérobactéries.** N : nombre d'isolats

gènes		***bla*$_{SHV}$**	***bla*$_{TEM}$**	***bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$**	***bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}2}$**	***bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}9}$**
K. pneumoniae	%	74,7	59,5	77,6	100	71.6
	N	172	87	208	19	48
E. coli	%	10,4	20,5	17,1	0	28.3
	N	24	30	46	0	19
E. cloacae	%	5,6	7,5	1.1	0	0
	N	13	11	3	0	0
K. oxytoca	%	2,1	3,4	1.1	0	0
	N	5	5	3	0	0
C. freundiii	%	4,7	5,4	2.9	0	0
	N	11	8	8	0	0
P. mirabilis	%	2,1	3,4	0	0	0
	N	5	5	0	0	0
Total	%	69.6	44.2	81.2	5.75	20.3
	N	230	146	268	19	67

D - Séquençage

L'analyse de la séquence nucléotidique de *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ a montré que toutes les souches portaient le sous-groupe *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$. Pour les produits d'amplification du gène *bla*$_{TEM}$, le sous-groupe trouvé dans les isolats était *bla*$_{TEM\text{-}1}$ (87,5%) et *bla*$_{TEM\text{-}104}$ (12,5%). Le produit d'amplification du *bla*$_{SHV}$ présentait différents types d'enzymes, notamment *bla*$_{SHV\text{-}1}$ (33,3%), *bla*$_{SHV\text{-}49}$ (33,3%), *bla*$_{SHV\text{-}44}$ (16,7%) et *bla*$_{SHV\text{-}133}$ (16%).

E - Conjugaison bactérienne

Des isolats de *K. pneumoniae* producteurs de BLSE ont été sélectionnés pour des tests de transfert de résistance. Le transfert d'un phénotype de BLSE sur *E. coli* K12J5 récepteur résistant à l'azide de sodium par conjugaison a été réussi pour tous les isolats testés. Tous les transconjugants étaient résistants aux β-lactames, à la gentamicine, à la tobramycine, à la kanamycine, au cotrimoxazol, à la tétracycline, à l'acide nalidixique, à la norfloxacine et à la ciprofloxacine.

Après la réaction PCR, les résultats ont montrés que toutes les souches ont coproduit les enzymes CTX-M–1 et TEM, et un isolat a coproduit CTX-M–1, TEM et SHV.

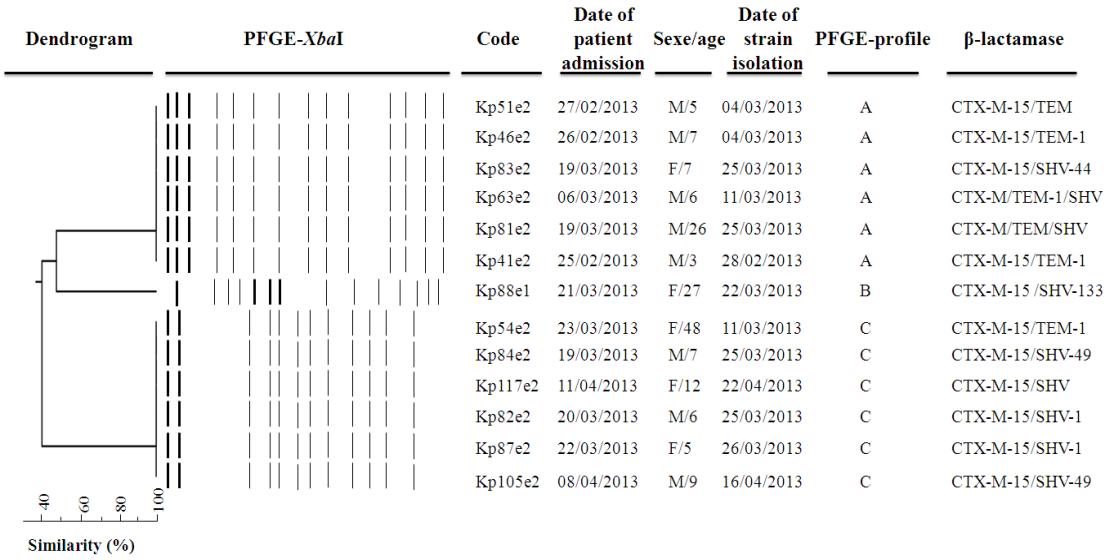
Après extraction de l'ADN total, les résultats de la PCR ont confirmé la transférabilité du gène *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ et de *bla*$_{TEM}$, mais pas du gène *bla*$_{SHV}$. En outre, un co-transfert d'autres déterminants codant la résistance au cotrimoxazol, ciprofloxacine, tétracycline, acide nalidixique et gentamicine ont été mis en évidence.

L'électrophorèse réalisée sur les isolats testés a montré que ces gènes étaient situés sur un plasmide de haut poids moléculaire d'environ 125 kb.

F - Etude de la relation clonale par PFGE

L'électrophorèse en champs pulsé a permis de vérifier la parenté de 13 isolats de *K. pneumoniae* comme étant l'entérobactérie BLSE la plus fréquente. L'étude de la relation clonale entre les différents isolats de *K. pneumoniae* a été réalisée. Ces derniers, collectés sur une période de 54 jours ont été obtenus chez des nouveau-nés ayant passé plus de 3 jours dans le SNRN.

La figure 32 résume les profils et les génotypes PFGE des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE. Trois profils PFGE différents ont été observés (A, B et C). Le clone A comprenait six isolats identiques productrices de CTX-M-15 à partir de six nouveau-nés. Deux souches ont été isolées chez deux NN partageant la même chambre et la même période d'hospitalisation dans l'unité de réanimation. Trois autres isolats provenaient de bébés partageant la même unité d'hospitalisation, alors qu'un autre isolat provenait d'un bébé hospitalisé dans la deuxième unité (l'unité des prématurés). De même, pour le groupe C, six isolats avaient les mêmes génotypes. Cinq isolats du clone C ont été isolés chez des nouveau-nés partageant la même unité d'hospitalisation (unité des prématurés) et un isolat provenait d'un bébé hospitalisé dans l'unité de réanimation néonatale. Le groupe B représente un isolat identifié chez un patient provenant d'un autre établissement.



Code	Date of patient admission	Sexe/age	Date of strain isolation	PFGE-profile	β-lactamase
Kp51e2	27/02/2013	M/5	04/03/2013	A	CTX-M-15/TEM
Kp46e2	26/02/2013	M/7	04/03/2013	A	CTX-M-15/TEM-1
Kp83e2	19/03/2013	F/7	25/03/2013	A	CTX-M-15/SHV-44
Kp63e2	06/03/2013	M/6	11/03/2013	A	CTX-M/TEM-1/SHV
Kp81e2	19/03/2013	M/26	25/03/2013	A	CTX-M/TEM/SHV
Kp41e2	25/02/2013	M/3	28/02/2013	A	CTX-M-15/TEM-1
Kp88e1	21/03/2013	F/27	22/03/2013	B	CTX-M-15 /SHV-133
Kp54e2	23/03/2013	F/48	11/03/2013	C	CTX-M-15/TEM-1
Kp84e2	19/03/2013	M/7	25/03/2013	C	CTX-M-15/SHV-49
Kp117e2	11/04/2013	F/12	22/04/2013	C	CTX-M-15/SHV
Kp82e2	20/03/2013	M/6	25/03/2013	C	CTX-M-15/SHV-1
Kp87e2	22/03/2013	F/5	26/03/2013	C	CTX-M-15/SHV-1
Kp105e2	08/04/2013	M/9	16/04/2013	C	CTX-M-15/SHV-49

Figure 33 : Relations phylogénétiques entre les isolats de *K. pneumoniae* produisant la BLSE par électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE)

2 - Entérobactéries productrices de céphalosporinases

A - Profil phénotypique

Pour la détection de la production de CASE et à défaut du test à la cloxacilline préconisé, nous nous somme basé sur les résultats de l'antibiogramme concernant la résistance à la céfoxitine associée à la résistance aux céphalosporines 3G ainsi que l'absence d'image de synergie typique aux isolats BLSE.

B - Répartition des isolats en fonction des espèces bactériennes

Parmi toutes les entérobactéries identifiées, 132 isolats ont été trouvé producteurs de CASE. D'après la figure 33, les isolats d'*E. coli* étaient majoritaires avec 97 souches suivi de *K. pneumoniae* avec 15 isolats.

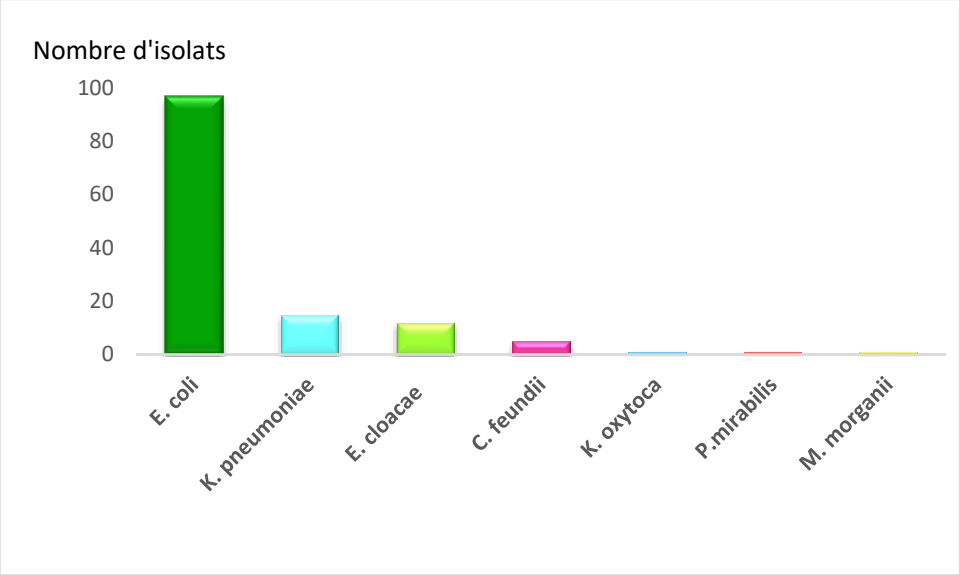


Figure 34 : Répartition des entérobactéries productrices de CASE isolées chez les NN

C - Profil génotypique

Durant notre travail, la recherche de six gènes : *bla*$_{MOX}$, *bla*$_{ACC}$, *bla*$_{DHA}$, *bla*$_{FOX}$, *bla*$_{EBC}$ *et bla*$_{CIT}$ codant pour une CASE a été effectué. Le résultat était négatif pour tous les isolats sauf pour deux isolats de *C. freundii* qui hébergent toutes les deux le gène *bla*$_{CIT.}$

3 - Entérobactéries carbapénèmases

A - Profil phénotypique

Les résultats de l'antibiogramme ont montré que 89 isolats sont résistants au carbapénèmes ; Imipenème et/ou Ertapénème. Le test de Hodge a permis de sélectionner 42 isolats positifs ce qui correspond à 47%. *K. pneumoniae* vient en première position avec 35 isolats suivi d'*E. coli* avec 44 souches.

La figure 34 montre un résultat positif du test de Hodge pour deux entérobactéries testées. En effet, L'inactivation d'un carbapénème par des souches productrices de carbapénèmases (les deux isolats d'essai) permettant à une souche indicatrice susceptible d'être induite par le carbapénème (*E. coli* ATCC 25922) d'étendre la croissance vers un disque contenant du carbapénème le long de l'inoculum de la souche d'essai. Un résultat de test positif donne une image semblable à une feuille de trèfle.

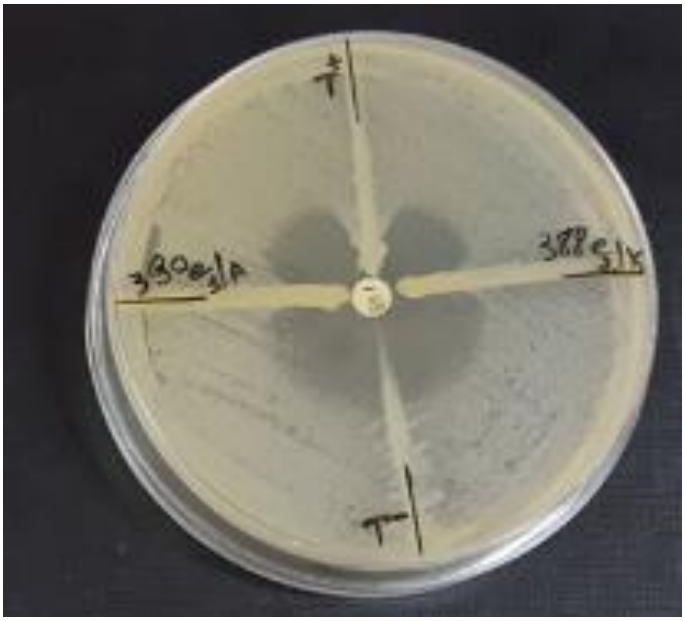


Figure 35 : Test de Hodge réalisé sur deux isolats d'entérobactéries

T+ : un témoin positif (producteur de carbapénèmases)

T- : un témoin négatif (*E. coli* ATCC 25922)

B - Profil génotypique des entérobactéries carbapénèmases

Tous les isolats positifs obtenus avec le test de Hodge ont fait l'objet d'une recherche de production de carbapénèmases par PCR. Les résultats de recherche des gènes bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP}, bla_{VIM} et bla_{OXA-48} ont montré que les isolats *K. pneumoniae, K. oxytoca* et *E. coli* portaient exclusivement le gène bla_{OXA-48}. Cependant, les isolats d'*E. cloacae* et *C. freundii* n'hébergeaient aucun de ces gènes étudiés. L'analyse des séquences a permis de confirmer la présence de la séquence nucléotidique $bla_{OXA-48.}$

C - Association de la production de CARBA avec celle de BLSE et CASE

L'étude des isolats producteurs de CARBA a montré que parmi les 42 isolats positifs obtenus avec le test de Hodge, 33 isolats sont également producteurs de BLSE ce qui représente 78.5% et 15 isolats sont producteurs de CASE (35.7%). Trois isolats d'*E. cloacae* et un seul isolat de *C. freundii* étaient sécréteurs des trois enzymes de résistance ; les CARBA, les CASE et les BLSE.

Le tableau 16 comporte les détails des associations de ces enzymes en fonction des différentes entérobactéries carbapénèmases.

Tableau 16 : Association des entérobactéries résistantes à l'imipénème avec la production de BLSE et CASE

	Nombre d'isolats				
Entérobactéries	Résistants à l'imipénème	Test de Hodge positif	CARBA et BLSE	CARBA et CASE	CARBA, BLSE et CASE
K. pneumoniae	38	26	25	1	0
E. coli	47	9	3	8	0
E. cloacae	7	5	3	5	3
C. freundii	1	1	1	1	1
K. oxytoca	3	1	1	0	0
Total	96	42	33	15	4

4 - *A. baumannii carbapénèmases*

A - *Description phénotypique des isolats*

Parmi les 84 isolats d'*A. baumannii* collectées, 68/84 sont multi-résistants (80.6%). La résistance à l'imipénème a été observée chez 16% des isolats (9/68). Alors que 21.3% (16/68) sont intermédiaires et 60% (45/68) sont sensibles. Le test de Hodge était positif pour tous les isolats résistants à l'imipénème. De même, des tests avec IMP et IMP / EDTA ont indiqué la présence d'une Metallo-β-lactamases dans ces isolats (figure 35).

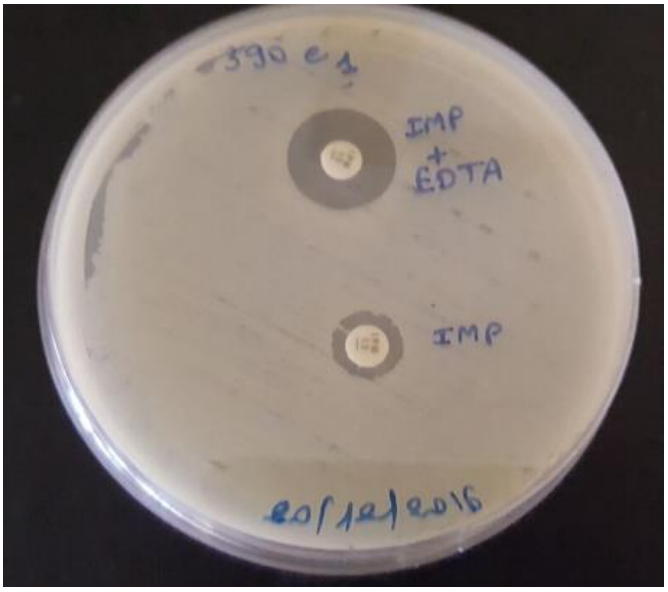


Figure 36 : Test des MBL réalisé sur une souche d'*A. baumannii* résistante à l'imipénème.

B - Profil génotypique

Parmi tous les isolats résistants à l'imipénème, les gènes de résistance *bla*$_{OXA-23}$, *bla*$_{OXA-24}$, *bla*$_{OXA-51}$, *bla*$_{OXA-58}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{IMP}$ *et bla*$_{VIM}$ ont été recherchés.

Les résultats de la PCR ont montré que tous les isolats étaient positifs pour le gène *bla*$_{OXA-51}$ (n = 84), ce qui confirme l'identification de l'espèce *A. baumannii*. De plus, 8 des 9 isolats carbapénèmases étaient positifs pour le gène codant *bla*$_{OXA-23}$. Cependant, aucune souche n'hébergeait les gènes *bla*$_{OXA-24}$ et *bla*$_{OXA-58}$ dans son génome. De même, les PCR pour la recherche de *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{IMP}$ *et bla*$_{VIM}$ étaient négatives.

Le séquençage a confirmé qu'il s'agit bien des séquences nucléotidique qui correspond aux gènes *bla*$_{OXA-51}$ et *bla*$_{OXA-23.}$

V - Analyse des facteurs de risque

1 - Analyse des facteurs de risque à l'admission

A - Association entre les paramètres cliniques des patients et portage des EMR

L'analyse univariée réalisée entre les caractéristiques des patients et le portage intestinal des entérobactéries à l'admission a montré que 57,3% des NN admis âgés de moins de 48h sont porteurs d'EMR (p=0,001), 54,7% des nouveau-nés non allaités étaient colonisés à l'admission (p=0,042) (tableau 17). La totalité des résultats d'analyses statistiques est représentée dans l'annexe 3.

Tableau 17 : variables associés au portage d'EMR à l'admission

Catégorie		Nombre (%) n=455	EMR- [N (%)]	EMR + [N (%)]	Valeur p
Age (jours)	**0-2**	308 (67,6)	222 (72,8)	86 (57,3)	**0,001**
	> 2	147 (32,3)	83 (27,2)	64 (42,7)	
Lieu de naissance	**Maternité du CHU Fès**	265 (58,2)	190 (41,8)	75 (50)	**0,026**
	Autres établissements	164 (36)	97 (31,8)	67 (44,7)	
	Domicile	26 (5,7)	18 (5,9)	8 (5,3)	
Provenance	**Maternité du CHU Fès**	235 (51,6)	178 (58,4)	57 (38)	**0,000**
	Autres établissements	124 (27,3)	77 (25,2)	47 (31,3)	
	Domicile	96 (21,1)	50 (16,4)	46 (30,7)	
Allaitement	**Oui**	179 (39,3)	111 (36,4)	68 (45,3)	**0,042**
	Non	276 (60,7)	194 (63,6)	82 (54,7)	

EMR + : portage d'EMR ; EMR- : pas de portage d'EMR

L'analyse multivariée a montré que les nouveau-nés provenant de la maternité du CHU de FES (IC à 95%, 1.859 à 5.129 ; P = 0,000) avaient un risque 3 fois plus élevé d'être porteurs d'EMR que ceux provenant de leurs maisons. En plus, les nouveau-nés qui présentent une détresse neurologique ont 2 fois plus de risque d'être porteurs d'EMR (IC à 95%, 1.038 à 4.694 ; P = 0,040) que ceux qui ne souffrent pas de cette détresse. Le tableau 18 représente tous les facteurs de risques du portage d'EMR définis dans cette étude.

Tableau 18 : Facteurs de risque liés au portage d'EMR à l'admission

Variable	**L'analyse multivariée du portage d'EMR à l'admission**	
	OR (IC 95%)	Valeur p
Détresse Neurologique	2.207 (1.038-4.694)	0.040
Provenance de la maternité du CHU FES	3.088 (1.859-5.129)	0.000
Provenance d'autres établissements	2.010 (1.251-3.230)	0.004

B - Association entre les paramètres cliniques des patients et portage d'A. baumannii à l'admission

L'association entre les caractéristiques des patients et le portage d'*A. Baumannii* à l'admission a montré que le sexe masculin (P = 0,028) et le lieu de naissance (P = 0,043) ont été les deux paramètres trouvé significatifs (tableau 19). En effet, 24 porteurs d'*A. baumannii* MR sont nés à la maternité du CHU (80%). Parmi lesquels, 18 nouveau-nés ont été transférés directement de la maternité à la réanimation néonatale.

D'autre part, la majorité des porteurs d'*A. baumannii* MR étaient de sexe masculin (76,7%). La totalité des résultats d'analyses statistiques est montré dans l'annexe 4.

Tableau 19 : Variables trouvés associés au portage d'*A. baumannii* à l'admission

Catégorie		**Nombre (%) n=455**	**AB MR- [N (%)]**	**AB MR + [N (%)]**	**Valeur p**
Genre	**Masculin**	267(58,7)	244 (57,4)	23 (76,7)	**0,028**
	Féminin	188(41,3)	181 (42,6)	7 (23,3)	
Lieu de naissance	**Maternité du CHU Fès**	265(58,2)	241 (56,7)	24 (80)	**0,043**
	Autres établissements	164(36)	159 (37,4)	5 (16,7)	
	Domicile	26(5,7)	25 (5,9)	1 (3,3)	

L'analyse multivariée a permis de définir trois facteurs de risques significativement associés au portage d'*A. baumannii* à l'admission (tableau 20), qui sont :

Le sexe (OR, 0,382 ; IC à 95%, 0,158 à 0,921 ; P = 0,03)

Un âge ≤48h à l'admission au SNRN (OR, 2,803 ; IC à 95%, de 1,191 à 6,596 ; P = 0,01)

La naissance à la maternité du CHU (OR, 0,196 ; IC 95%, 0,071 à 0,540 ; p = 0,002).

Tableau 20 : Facteurs de risque liés au portage d'*A. baumannii* à l'admission

Variable	**Analyse multivariée**	
	OR (IC 95%)	Valeur p
Genre masculin	0.382 (0,158-0.921)	0,032
Age entre 0-2 jours	2,803 (1,191-6,596)	0,018
Naissance à la maternité du CHU Fès	0.196 (0,071-0,540)	0,002

2 - Analyse des facteurs de risque en cours d'hospitalisation

A - Association entre les paramètres cliniques des patients et l'acquisition des entérobactéries multi-résistantes

L'analyse univariée entre les paramètres des nouveau-nés et l'acquisition intestinale d'EMR en cours d'hospitalisation a montré qu'il existe une association significative entre un âge inférieur à 48h (p=0.001) et l'acquisition d'EMR en cours du séjour (table 21). Les résultats globaux de l'analyse statistique univariée sont présentés dans l'annexe 5.

Tableau 21 : Variables trouvés associés à l'acquisition d'EMR en cours d'hospitalisation

Catégorie		Nombre (%) n=207	EMR- [N (%)]	EMR + [N (%)]	Valeur p
Age (jours)	**0-2**	151 (72,9)	39 (70,9)	112 (73,7)	**0,001**
	> 2	56 (27,5)	16 (29,1)	40 (26,3)	

B - Association entre les paramètres cliniques des patients et l'acquisition d'A. baumannii multi-résistant

L'analyse statistique a montré qu'il existait une différence significative entre les nouveau-nés qui sont devenus colonisés et ceux non colonisés par *A. baumannii* MR en ce qui concerne l'âge (p = 0,01), la prématurité (p = 0,05), la détresse respiratoire (p = 0,03) et la provenance (p = 0,01) (tableau 23). Les résultats totaux sont montrés dans l'annexe 6.

Tableau 22 : Variables trouvées associées à l'acquisition d'*A. baumannii* en cours d'hospitalisation

Catégorie		Nombre (%) n=277	AB MR- [N (%)]	AB MR + [N (%)]	Valeur p
Age (jours)	**0-2**	187 (67,5)	155(64,9)	32(84,2)	**0,018**
	> 2	90 (32,4)	84(35,1)	6(15,8)	
Prématurité	**Oui**	142(51,3)	117(49)	25(65,8)	**0,054**
	Non	135(48,7)	122(51)	13(34,2)	
Pathologie	**Détresse respiratoire**	160(57,8)	132(55,2)	28(73,7)	**0,032**
Provenance	**Maternité du CHU Fès**	137(49,5)	112(46,9)	25(65,8)	**0,010**
	Autres établissements	83(30)	71(29,7)	12(31,6)	
	Domicile	57(20,6)	56(23,4)	1(2,5)	

L'analyse multivariée a montré que les nouveau-nés qui présentent une détresse respiratoire ont 2 fois plus de risque d'être porteurs d'*A. baumannii* (IC à 95%, 1,055 à 4,881 ; P = 0,03) que ceux qui ne souffre pas de cette détresse. Par conséquent, cette pathologie a été considéré comme le seul facteur de risque défini et significativement associé à l'acquisition d'*A. baumannii* MR en cours d'hospitalisation.

VI - Etude de la contamination de l'environnement proche des nouveau-nés hospitalisés

Dans cette partie, nous présentons les résultats de la contamination de l'environnement proche des nouveau-nés hospitalisés : les surfaces de couveuses, les surfaces de tables chauffantes, les matelas, les hublots pivotants, les scopes, les écrans de couveuses, les plateaux des soins, les tables de chevet et les poignées de portes.

1 - *Taux de contamination des différents points de surface*

Un total de 151 prélèvements d'environnement ont été effectués à différents points de surface au cours de la période d'étude dont 93 étaient positifs pour au moins un Bacille à Gram-. Tandis que, 58 prélèvements étaient négatifs.

Le niveau de contamination microbienne des points de surface différait selon les sites prélevés. Le taux de contamination a été de 100% pour les poignées de portes, 66% pour les plateaux de soins, 50%. Alors que, les tables de chevet étaient le site le moins contaminé avec une fréquence de 21% (figure 36).

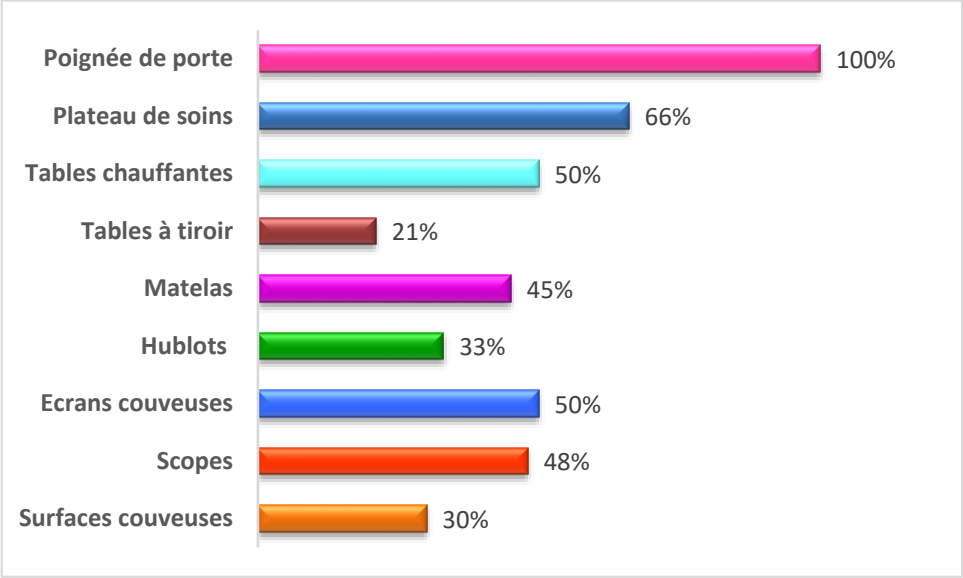


Figure 37 : Pourcentage de contamination bactérienne sur les différents points de surface

2 - *Répartition globale des BGN isolées*

Dans ce travail, nous avons identifié 123 BGN sur un total de 93 prélèvements positifs. L'analyse des espèces d'entérobactéries identifiées a montré une dominance de *k. pneumoniae* avec 35.7% comportant 44 souches. Les isolats d'*E.coli* occupent la deuxième position avec 36

souches ce qui représente un pourcentage de 29.2%. Les isolats de *P. mirabilis*, *R. terrigena* et *E. cloacae* ont été moins fréquentes avec respectivement 8, 4 et 1 isolat. D'autre part, les BGN non fermentant étaient également identifiées ; 27 isolats de *P. aeruginosa* et 3 isolats d'*A. baumannii* (figure 37).

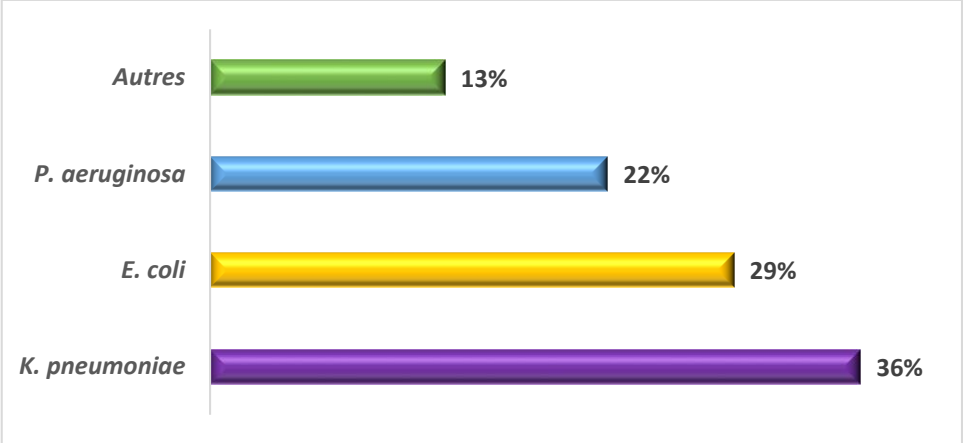


Figure 38 : Répartition globale des BGN isolées de l'environnement

3 - Répartition des espèces BGN isolées en fonction des sites de prélèvements

Les BGN isolées ont été trouvées sur la majorité des sites de prélèvements définis durant cette étude. *K. pneumoniae* et *E. coli* ont été les bactéries les plus fréquemment isolés et ont été identifiées sur presque la totalité des sites. *P. aeruginosa* a été également identifié sur tous les sites sauf sur les tables chauffantes et les poignées de portes (tableau 24).

Tableau 23 : Répartition des espèces d'entérobactéries, de *P. aeruginosa* et d'*A. baumannii* en fonction des sites de prélèvements

Points de prélèvements	*K. pneumoniae*	*E.coli*	*P. mirabilis*	*R. terrigena*	*E. cloaceae*	*P. aeruginosa*	*A. baumannii*
Surfaces couveuses	8	11	0	0	0	3	1
Scopes	9	5	3	0	1	7	0
Ecrans couveuses	4	2	0	1	0	2	0
Hublots	7	9	0	3	0	6	1
Matelas	6	5	1	0	0	5	0
Tables à chevet	4	2	3	0	0	2	1
Tables chauffantes	1	1	1	0	0	0	0
Plateau de soins	2	1	0	0	0	2	0
Poignée de porte	3	0	0	0	0	0	0
Total	44	35	8	4	1	27	3

4 - Profil de résistance des isolats d'environnement identifiés

A - Entérobactéries

Sur l'ensemble des BGN identifiées, la présence de 93 entérobactéries a été constatée, dont 65 isolats (69.8%) sont sécrétrices de BLSE et 9 souches (9.6%) sont productrices de CASE. Les profils de résistances des isolats d'entérobactéries sont montrés dans la figure 38.

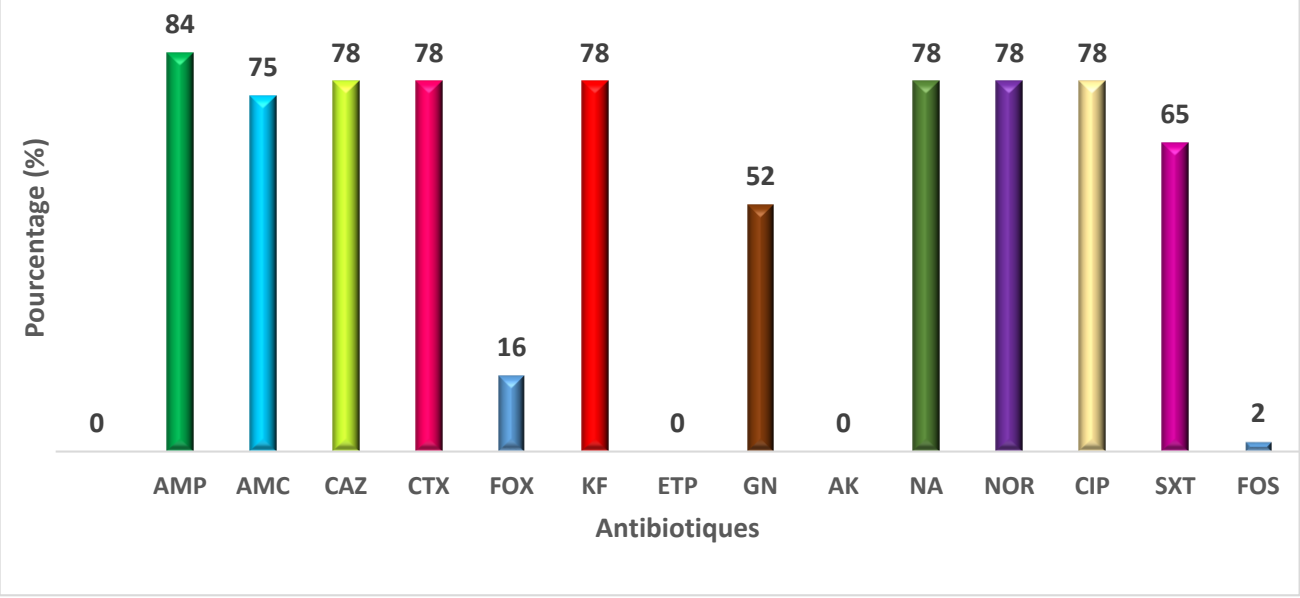


Figure 39 : Profil de résistance des entérobactéries isolées à partir de l'environnement

B - *P. aeruginosa et A. baumannii*

Toutes les souches de *P. aeruginosa* qui ont été isolées à partir des différents sites, ont présenté une sensibilité totale vis-à-vis des différents antibiotiques testés à savoir la tobramicine, la colistine, la pipéracilline, l'imipénème, l'aztréonam, la ticarcilline, la ciprofloxacine, la céftazidime, le tazobactam et l'aztréonam. Cependant, les trois isolats *d'Acinetobacter baumannii* étaient multi-résistants principalement à la céftazidime, la gentamicine et à la ciprofloxacine.

C - *Staphylococcus aureus*

Le *S. aureus* était présent dans trois prélèvements d'environnement notamment sur le poignée de porte, le hublot pivotant de la couveuse et le scope. Ces trois souches ont été sensibles à tous les antibiotiques testés sauf à la pénicilline G.

5 - *Résultats des analyses moléculaires des BMR isolés à partir des surfaces de l'environnement du SNRN*

A - *Entérobactéries BLSE*

Sur les 93 entérobactéries identifiées au niveau des surfaces, 65 sont sécrétrices de BLSE (69.8%). Le gène *bla*CTXM1 est le plus dominant ; 54 souches hébergent le gène *bla*$_{CTXM1}$ soit 83%, suivi de *bla*$_{SHV}$ avec 46 entérobactéries soit 70.7%. Alors que 5 souches seulement hébergeaient le gène *bla*$_{CTXM9}$. La figure 39 montre la fréquence des gènes *bla* codant une BLSE.

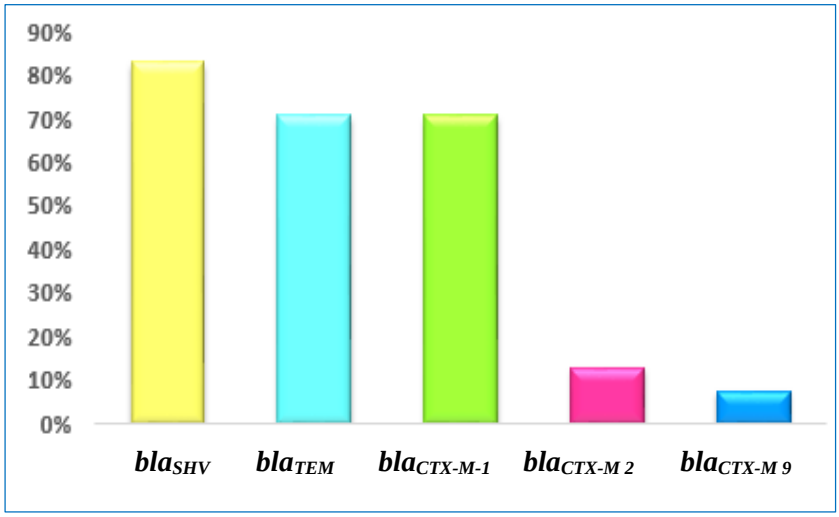


Figure 40 : Fréquence des gènes *bla* codant une BLSE chez les E-BLSE isolées à partir de l'environnement

Pour ce qui est des souches isolées à partir des surfaces, aucune n'a été résistante à l'imipénème.

Les isolats producteurs de CASE étaient moins fréquents avec un pourcentage de 9%.

B - *A. baumannii carbapénèmases*

On note l'identification de 3 isolats seulement d'*A. baumannii* dans l'environnement proche du patient. Ces isolats étaient tous sensibles à l'imipénème.

Discussion

Discussion

L'infection néonatale constitue l'étape finale succédant à une série d'évènements antérieurs : portage, colonisation, contamination de la mère, du personnel soignant et de l'environnement. En effet, il a été rapporté que la colonisation postnatale par les BMR peut être suivie d'infection en particulier chez les patients immunodéprimés [107]. En 2014, Liu et coll. ont estimé que 6,9 millions est le nombre de cas d'infections néonatales aux BMR sévères ont été rapportés dans les pays à revenu faible ou intermédiaire [108]. Un élément particulièrement important en termes de santé est le fait que ces infections aux BMR surviennent souvent par épidémies, touchant un nombre important de patients.

Les réservoirs des BMR sont multiples, notamment l'environnement hospitalier et le portage endogène des nouveau-né. En effet, plusieurs études ont montré que le portage d'E-BLSE est susceptible de jouer un rôle important dans l'infection des nouveau-nés au cours de leur première semaine de vie [109,110]. Les mains du personnel ou le manuportage constitue le principal mode de transmission et d'acquisition de ces BMR dans les services de soins [111]. De plus, les procédures invasives notamment l'utilisation des cathéters veineux, la ventilation mécanique ou les interventions chirurgicales effectuées dans les USI augmentent le risque d'acquisition bactérienne en cours d'hospitalisation.

Nous avons étudié le portage de BMR chez des nouveau-nés en cours d'hospitalisation. A notre connaissance, cette étude est la première dans son genre au Maroc. Ainsi, nous présentons une analyse systématique de la colonisation et/ou d'acquisition par des BMR multi-résistantes notamment les *S. aureus*, les entérobactéries, *A. baumannii* et *P. aeruginosa* chez les nouveau-nés hospitalisés dans le service de néonatologie et de réanimation néonatale du CHU Hassan II à Fès.

Dans cette partie, nous discuterons les résultats de la colonisation et/ou d'acquisition nasale et intestinale par les BMR (*Staphylococcus* sp., entérobactéries, *A. baumannii* et *P. aeruginosa*). Ensuite, l'analyse des profils de résistance phénotypiques et génotypiques de ces BMR de portage ou d'acquisition nosocomiale, suivie de l'étude des facteurs de risques associés à la colonisation ainsi qu'à l'acquisition des BMR. Enfin, la discussion des résultats obtenus après les prélèvements de l'environnement du service seront présentés à la fin de ce chapitre.

I - Colonisation intestinale des nouveau-nés à l'admission et en cours d'hospitalisation

1 - *Entérobactéries*

L'étude de la colonisation par des entérobactéries MR chez les NN hospitalisés a montré que 33% des patients admis dans le service de réanimation sont colonisés et 59,4% des non colonisés ont acquis une EMR durant leur séjour dans le service. Une exposition antérieure dans des établissements de santé pourrait expliquer en partie le taux de portage de 33% à l'admission enregistré dans notre étude. En effet, l'analyse des facteurs de risque associés à la colonisation a mis en évidence une association importante (p<0,001) entre colonisation à BMR et patients provenant d'un autre établissement comme cela a été signalé dans la partie résultat.

Les données sur le portage communautaire à E-ESBL varient en fonction des pays : les taux de colonisation à l'admission reportés varient entre 10 et 21% à Madagascar [112,113], ils sont de 33% à Guinée-Bissau [114], de 34% au Gabon [115] et de 55% au Cameroun [116]. En Allemagne le taux de colonisation est de 6% seulement [117] et aux États-Unis d'Amérique, il est de 1,6% [56]. Au Maroc, une étude antérieure réalisée à l'hôpital cheikh Zaid en 2009 a montré que 29% des patients admis aux services de réanimation pédiatrique et polyvalente ont été porteurs de BMR [118].

Au total, 225 isolats d'EBLSE ont été identifiés réparties entre 102 isolés à l'admission et 123 EBLSE en cours d'hospitalisation des NN. Le tableau 24 présente le résumé de l'ensemble des BMR isolées à l'admission et en cours d'hospitalisation. Le taux élevé d'acquisition de BMR s'explique par le fait que l'application des précautions standards n'est pas optimale dans les services hospitaliers, ce qui contribue ainsi à la dissémination de bactéries résistantes dans les services de réanimation.

Tableau 24 : Récapitulatif des bactéries multi-résistantes isolées en portage chez les NN à l'admission et en cours d'hospitalisation

	E-BLSE	**E-CASE**	**EPC**	***P. aeruginosa* MR**	***A. baumannii* MR**	**SARM**
ADMISSION	102	46	40	0	30	0
EN COURS D'HOSPITALISATION	123	69	26	0	39	0
TOTAL	225	115	66	0	69	0

Dans notre étude, le mécanisme de résistance prédominant a été la production de BLSE. Ainsi, 66% des NN sont devenus colonisés par des E-BLSE durant leurs séjours à l'hôpital. Un certain nombre d'études ont évalué la prévalence de la colonisation par des E-BLSE parmi les patients hospitalisées dans les USI [119]. Notre prévalence est supérieure à celle d'une étude réalisée en Italie [120]. Selon Detsis et ses collaborateurs en 2017, le risque d'infection subséquente par les E-BLSE chez les patients colonisés est environ 50 fois plus élevé que chez les patients non colonisés, ainsi, la colonisation du tube digestif avec des E-BLSE peut expliquer l'infection par ces dernières [121]. En outre, ces nouveau-nés colonisés ou infectés peuvent servir de réservoirs à d'autres nouveau-nés ainsi qu'à l'apparition potentielle des épidémies [122,123].

Parmi les entérobactéries, *K. pneumoniae* productrice de BLSE a été largement impliquée dans de nombreuses épidémies nosocomiales notamment les épidémies néonatales à travers le monde [124]. Cette bactérie a été à l'origine de 16 à 28% des cas de bactériémies dans différentes régions du monde [125]. Dans notre étude, 94% des cas d'acquisition d'E-BLSE sont des acquisitions de *K. pneumoniae* productrice de BLSE ce qui concorde avec l'étude italienne menée par Bagattini et coll. [120].

Par ailleurs, la dissémination d'entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) représente le défi le plus récent en matière de résistance aux β-lactamines dans le monde entier [126]. Nous avons constaté dans notre étude, que déjà à l'admission, 8,7% des patients dépistés étaient colonisés par une EPC, et 12,5% au cours de leur séjour. Une étude marocaine réalisée à l'hôpital Cheikh Zaid en 2009 a rapporté un taux de colonisation similaire de 12,8% chez des patients adultes hospitalisés [118].

2 - *A. baumannii*

La colonisation par *A. baumannii* multi-résistant dans les hôpitaux est une préoccupation majeure mondiale, principalement en raison des options thérapeutiques limitées pour le traitement des infections à *A. baumannii* résistant. Infectious Diseases Society of America (IDSA) a classé *A. baumannii* parmi les six microorganismes dangereux prioritaires [127]. *A. baumannii* est un pathogène opportuniste qui peut se trouver en portage intestinal des patients dans le monde entier. Cependant, c'est un microorganisme puissant qui héberge plusieurs résistances intrinsèques à plusieurs antibiotiques. Lorsqu'il est responsable d'une infection associée aux soins, celle-ci s'avère très sévère et la majorité d'antibiotiques utiles ne sont plus efficaces.

Une étude réalisée en France en 2015 a rapporté un taux d'acquisition d'*A. baumannii* MR de 11% chez des nouveau-nés durant leur séjour [128]. Dans notre étude, 14% des patients ont

acquis *A .baumannii* dont 97% des isolats étaient multi-résistants avec 1% résistants à l'imipénème. Le même taux d' *A. baumannii* CARBA a été rapporté en France par Armand-Lefèvre en 2013 et en Turquie par Yeşilbağ en 2014 [129,130] tandis qu'en Australie, seulement 4,5% a été enregistré [131].

D'autre part, dans notre étude, le portage à l'admission a montré qu'environ 10% de nouveau-nés de très bas âge se sont trouvés colonisé à l'admission par *A. baumannii* avec un taux de multi-résistance de plus de 66%. Dans un service de réanimation Turque, des échantillons prélevés à l'admission au niveau de la bouche, la gorge, la peau et le rectum, ont révélé que 6,3% sont colonisés par *A. baumannii* [128]. Cependant, une étude effectuée en Taïwan a indiqué un taux de prévalence de 0,2% seulement chez des adultes admis aux USI [132].

3 - *Pseudomonas aeruginosa*

Le principal réservoir de *P. aeruginosa* chez les nouveau-nés est la voie respiratoire [133]. Dans notre étude, la colonisation intestinale par *P. aeruginosa* multi-résistants a été faible chez les nouveau-nés dépistés. Dans une autre étude, le dépistage intestinal a permis d'identifier 3/31 cas de colonisation par *P. aeruginosa* chez des NN ventilés [133].

Chez des adultes hospitalisés dans des USI [134], le dépistage à partir des narines, du pharynx, du rectum et/ou des sécrétions respiratoires a montré que 8% des patients admis étaient colonisés par *P. aeruginosa* et 13% ont acquis ce pathogène au cours de leur séjour.

4 - *Staphylococcus aureus résistants à la méthicilline*

Selon Hubner et al. [135], la peau du nouveau-né est très vite colonisée après leur naissance par les Staphylocoques à coagulase négative (SCN) notamment *S. epidermidis* qui joue un rôle de barrière vis-à-vis de bactéries résistantes. À cet âge où le système immunitaire n'est pas encore bien développé, les SCN résistant à la méthicilline peuvent être responsables d'infections associées aux soins [136].

Par ailleurs, l'association entre la colonisation nasale à *S. aureus* et l'infection secondaire a été rapportée dans de nombreuses études. Wertheim et al. ont souligné que le risque de bactériémies nosocomiales par *S. aureus* peut être multiplié par 3 chez les patients non chirurgicaux porteurs de *S. aureus* au niveau nasal [33]. De même, chez les patients hémodialysés chroniques ou les patients transplantés hépatiques, les infections à *S. aureus* postopératoires étaient significativement importantes en cas de colonisation préalable.

Dans nos résultats relatifs à la colonisation par *S. aureus*, nous avons noté 8 isolats de *S. aureus*, tous sensibles à la méthicilline et une absence des SARM chez les NN à l'admission et en cours d'hospitalisation.

II - Profils de résistances phénotypiques et génotypiques des bactéries isolées

1 - *Entérobactéries*

Les entérobactéries qui colonisent fréquemment l'intestin du nouveau-né hospitalisé sont *K. pneumoniae* et *E. coli* [114]. Ces deux bactéries sont naturellement sensibles à de nombreux antibiotiques mais elles peuvent acquérir une résistance à de nombreuses molécules, en particulier aux bêta-lactamines qui sont souvent les antibiotiques les plus utilisés dans les SNRN. Ces résistances acquises sont la conséquence de la pression de sélection due à l'utilisation abusive de ces antibiotiques et de leur déterminisme génétique qui fait qu'elles ont un grand pouvoir de dissémination [137].

Nous avons enregistré une fréquence élevée de résistance aux céphalosporines 3G ou à la gentamicine chez les isolats identifiés dans notre étude. Ainsi, 90% des entérobactéries résistantes sont productrices de BLSE et/ou CASE. Aussi, pour la gentamicine, 95% des bactéries productrices de carbapénèmase (EPC) sont également résistantes à la gentamicine. En outre, plus de 80% de ces EPC ont des co-résistances avec les quinolones et les fluoroquinolones. Plusieurs auteurs ont rapporté le même large spectre de résistance chez des souches d'entérobactéries isolées chez les nouveau-nés hospitalisés [138–140].

L'un des plus importants mécanismes à l'origine de la transmission et la dissémination de cette résistance aux BLSE et aux CARBA sont les plasmides conjugatifs [141]. Ces plasmides sont souvent aussi porteurs de nombreux gènes codant pour la résistance à d'autres classes d'antibiotiques tels que les aminosides, les quinolones, le cotrimoxazol, les tétracyclines et les sulfamides [142]. L'étude de conjugaison et l'analyse plasmidique que nous avons réalisée ont confirmé que les gènes codant pour la résistance BLSE ont été transférés d'une bactérie donatrice résistante vers une autre bactérie réceptrice sensible. En plus, nos résultats ont démontré que ces mêmes gènes sont portés par un plasmide de haut poids moléculaire. La transmission rapide de ces gènes a été associée à divers éléments génétiques mobiles notamment les séquences d'insertion [143]. Ces dernières sont préférentiellement liés à des gènes spécifiques comme la *ISEcp1* elle-même liée à la plupart des gènes $bla_{CTX\text{-}M}$, et la *ISCR1* liée à $bla_{CTX\text{-}M\text{-}2}$ ou $bla_{CTX\text{-}M\text{-}9}$ [144].

Ces dernières décennies, le génotype prédominant chez les entérobactéries productrices de β-lactamases est passé de TEM et / ou de SHV à CTX-M (gènes codant pour une BLSE) [145]. En effet, nous avons identifié le gène *bla*$_{TEM}$ dans 44,2% des isolats étudiés, alors que le gène *bla*$_{SHV}$ avec les sous-groupes SHV-1, SHV-49, SHV-44 et SHV-133 était plus fréquent. Il était de 69,6%. Ceci pourrait être lié aux grands nombre d'isolats de *K. pneumoniae* analysés qui hébergent naturellement ce gène dans leur chromosome.

Les prévalences de ces enzymes varient largement dans le monde. En Arabie Saoudite, des taux de 97,3% pour SHV et 84,1% pour TEM ont été rapportés par Al-Agamy et coll. [146]. En revanche, en France, Birgy et al. ont rapportés chez *E. coli* une prévalence de 6,3 et 9,4% respectivement pour TEM et SHV [147].

Dans notre étude et concernant la β-lactamase de type CTX-M, le groupe *bla*$_{CTX-M-1}$ était le plus détecté (81,2%), suivi du groupe *bla*$_{CTX-M-9}$ (20, 3%) et de *bla*$_{CTX-M-2}$ groupe (5,7%). Nos résultats sont en concordance avec une étude réalisée en 2010 au Maroc à l'institut Pasteur [58]. En Asie du Sud, les groupes CTX-M-1 et CTX-M-9 ont été identifiés, mais l'enzyme CTX-M2 n'a pas été détectée [146]. Une étude menée en France a révélé que 4,7% des *E. coli* producteurs de BLSE étaient codés par CTX-M-2 [147]. Cependant, l'enzyme CTX-M-2 est la plus répandu dans la plupart des pays d'Amérique du Sud [148].

Le sous-groupe *bla*$_{CTX-M-15}$ est considéré comme le type de BLSE le plus répandu dans le monde [76,141,149]. Dans la population marocaine, 92% des *E. coli* communautaires producteurs de BLSE produisent le sous-groupe CTX-M-15 [150], tandis que dans les hôpitaux, CTX-M-15 et CTX-M-28 étaient les enzymes identifiées chez les patients [58]. Dans la présente étude, nous avons identifié uniquement le CTX-M-15 parmi tous les isolats hébergeant le gène CTX-M-1.

D'autre part, l'enzyme OXA-48 est une β-lactamase du groupe D, ayant la plus grande propriété catalytique vis-à-vis de l'imipénème. Elle hydrolyse également les pénicillines et épargne les céphalosporines à large spectre. Cette enzyme codée par le gène *bla*$_{oxa-48}$, a été identifiée initialement à partir d'une souche de *K. pneumoniae* isolée en Turquie [151]. Ce gène est localisé sur un plasmide et a été également identifié chez *E. coli* et *Citrobacter freundii*, mais pas chez *A. baumannii* [152,153]. Depuis, les entérobactéries productrices de l'enzyme OXA-48 connaissent une distribution mondiale. Elles ont été rapportées en Europe et en Afrique et dans la région méditerranéenne [154]. Dans notre étude, parmi les gènes carbapénèmases recherchés (*bla*$_{OXA-48}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$), le gène *bla*$_{oxa-48}$ a été le seul détecté chez ces bactéries. Ce phénotype de résistance est le plus répandu en Afrique du Nord.

Les bêta-lactamases AmpC plasmidiques ont été observées dans le monde entier, mais ils sont moins courants que les BLSE. Chez *E. coli*, ces enzymes semblent moins souvent être une cause de résistance à la céfoxitine qu'une production accrue d'AmpC chromosomique. Les résultats que nous avons obtenus montrent l'absence des gènes plasmidiques codant les CASEs chez tous les isolats d'*E. coli* CASE testés. Ceci pourrait s'expliquer par la présence d'une hyperproduction d'une CASE chromosomique. En effet, ces CASEs chromosomiques constitutives d'AmpC s'expriment généralement à très bas niveau chez *E. coli* et ne contribuent pas de façon significative à la résistance aux β-lactamines chez cette espèce. Cependant, des mutants promoteurs forts peuvent exister et entraîner une hyperproduction de la céphalosporinase (46). Dans ce cas, les bactéries deviennent résistantes à l'amoxicilline et à la céfalotine. L'activité des C2G et C3G peut être alors diminuée tandis que celle de l'imipénème reste normale.

2 - *A. baumannii*

A. baumannii pose actuellement un grand problème de multi-résistance aux antibiotiques, notamment aux β-lactamines. Au sein de cette famille, la résistance aux carbapénèmes est d'incidence croissante alors que ces molécules étaient considérées il y a encore peu de temps comme le traitement de choix des infections à *A. baumannii*. Dans le service de SNRN, l'imipénème reste le traitement de base en cas de suspicion d'infection par ce microorganisme. Sur les 84 isolats analysés dans notre étude, 13% ont présenté une résistance à l'imipénème. Aussi, un très haut niveau de résistance aux antibiotiques couramment utilisés dans le SNRN a été enregistré chez ces isolats. Ceci est en accord avec plusieurs études menées à l'échelle mondiale [155–157].

Les résultats du génotypage de ces isolats d'*A. baumannii* CARBA ont confirmé d'abord l'espèce *A. baumannii* par la présence du gène intrinsèque $bla_{OXA\text{-}51}$ retrouvé chez 100% des isolats, et qui constitue un critère pour différencier *A. baumannii* des autres espèces du complexe *A. calcoaceticus-baumannii* [158]. Cependant, et pour exprimer la résistance aux carbapénèmes, ce gène chromosomique doit être régulé en amont par la séquence d'insertion *ISAba1* [159].

D'autre part, le principal gène responsable de la production de carbapénèmases dans notre série a été le gène $bla_{OXA\text{-}23}$ avec un taux de 89%. Il s'agit du gène le plus répandu dans la région méditerranéenne [160]. Une étude marocaine effectuée à Rabat en 2017 a détecté $bla_{OXA\text{-}23}$, $bla_{OXA\text{-}51}$ chez tous les isolats analysés [161]. En revanche, nous n'avons trouvé aucun gène codant les métallo-*β-lactamase* (bla_{IMP}, bla_{VIM} et bla_{NDM}). En effet, la prévalence de ces gènes

est généralement faible parmi les souches cliniques ou en portage d'*A. baumannii* isolées dans les unités de soins intensifs [129,162–164].

Le gène *bla*$_{KPC}$ a été identifié dans le monde entier parmi les isolats d'*Enterobacteriaceae* et de *Pseudomonas aeruginosa* [126,165]. Ce gène n'a pas été détecté dans notre étude. A ce jour, *A. baumannii* producteur de KPC, n'a été signalé qu'à Porto Rico en 2010 [166].

III - Facteurs de risques

L'identification des facteurs de risques favorisant la colonisation des NN hospitalisés par des BMR permet de mettre en place des stratégies préventives de transmission des BMR dans les structures de soins. Dans les SNRN, les facteurs les plus rapportés sont : le poids à la naissance, l'âge gestationnel, la durée d'hospitalisation, l'utilisation de dispositifs invasifs et le traitement antérieur par des antibiotiques [124,167].

Nous avons retrouvé dans la présente étude que la détresse neurologique et la provenance d'un autre service hospitalier sont des facteurs de risque associés au portage d'une EMR à l'admission. En effet, 51,6% des nouveau-nés provenant de la maternité du CHU de Fès sont porteurs d'EMR. Ces patients constituent alors un réservoir important de BMR et contribueront, souvent via les mains du personnel soignant, à la transmission de ces bactéries à d'autres nouveau-nés hospitalisés. Dans le même contexte, Khiev et Veber (2010) ont signalé qu'un transfert des patients intra- ou extra-établissement augmente le risque de colonisation par des BMR [168].

En tenant compte de la colonisation par *A. baumannii*, l'analyse statistique réalisée a dévoilé d'autres facteurs différents de ceux relevés en analysant tous les EMR notamment : le genre, la naissance à la maternité et la détresse respiratoire. En effet, 80% des NN colonisés étaient nés à la maternité. Ce service connait une très forte affluence des femmes parturientes provenant de la région de Fès ainsi que d'autres régions. Cette situation fait que les pratiques d'hygiènes manquent terriblement lors de l'accouchement et durant les soins post-nataux, ce qui favoriserait par conséquent cette colonisation au cours de la première semaine de la vie du NN [169].

Au cours de l'hospitalisation, la détresse respiratoire était le seul facteur de risque associé à la colonisation par *A. baumanii* MR (OR, 2,270 ; IC à 95%, 1,055 à 4,881 ; P = 0,03). Cisneros-Herreros et al. [170] ont rapporté que le syndrome de détresse respiratoire aiguë était un facteur de risque de pneumonie nosocomiale provoqué par *A. baumannii* en réanimation. Plus de 80% des patients infectés étaient associés à une ventilation mécanique selon Richards et coll. [171].

D'autres auteurs ont souligné que le contact du patient avec le ventilateur représente un facteur de risque clé de la transmission d'*A. baumannii* MR [49].

La prématurité, l'âge précoce et la provenance des NN ont également été rapportés comme des paramètres augmentant considérablement le risque d'acquisition et/ou d'infection par *A. baumannii* MR dans les SNRN [172,173]. Dans l'analyse univariée, ces facteurs étaient significativement associés à l'acquisition d'*A. baumannii* MR. De même, le très faible poids à la naissance de ces NN dans les SNRN augmente le risque de colonisation par les isolats d'*A. baumannii* nosocomiaux [157]. Cette variable avait tendance à être associée à nos patients, mais les valeurs n'étaient pas statistiquement significatives.

IV - Contamination de l'environnement proche du nouveau-né par des BMR

La contamination environnementale des surfaces hospitalières par les BMR varie grandement en fonction de l'endémicité des microorganismes, de la transmissibilité des bactéries et du mécanisme de résistance, des protocoles de désinfection et des techniques d'échantillonnage. Plusieurs études ont rapporté la contamination fréquente des surfaces dans les chambres des patients porteurs de BMR [8,174]. Les mains et les gants du personnel de santé sont susceptibles de transmettre des agents pathogènes après le contact avec des surfaces contaminées à l'hôpital. La contamination des poignées de portes a été 2,5 fois plus importante dans la chambre des patients porteurs que ceux des non porteurs [175]. En revanche, la présence des microorganismes sur les portes des patients non porteurs souligne l'étendue de leur dissémination dans l'environnement hospitalier. Cette dissémination a été confirmée par une autre étude menée par Price et coll. en 2017 qui a noté ainsi une large diffusion des SARM dans l'environnement hospitalier en situation endémique, et a suggérée l'hypothèse d'une acquisition à partir d'un foyer environnemental de 3 patients [176].

Dans notre étude, les entérobactéries ont été les plus isolées dans les sites de prélèvements étudiés, suivis de *P. aeruginosa* et d'*A. baumannii*. En effet, les espèces isolées, les profils de résistance des bactéries ainsi que les déterminants moléculaires de cette résistance suivent la même tendance aussi bien dans les prélèvements de l'environnement que dans les prélèvements de portage sur les patients ce qui suggère que ces bactéries connaissent une dynamique de transmission croisée entre le patient et l'environnement. Ces résultats devraient être confirmés par des études phylogénétiques à fin d'établir la clonalité entre les isolats.

Les taux de résistance des entérobactéries identifiées dans notre étude ont été supérieurs à 70% vis-à-vis de la céfotaxime et de la céftazidime dont 69,8% des isolats étaient des EBLSE.

Le gène CTX-M1 a été également le plus dominant dans cette résistance identifiée chez 65 entérobactéries BLSE provenant de 94 prélèvements de surface. *A. baumanii* a été également présente sur les surfaces analysées avec des résistances liées à la céftazidime et à la ciprofloxacine. En revanche, les souches de *P. aeruginosa* isolées au niveau des différents points de prélèvements étaient toutes sensibles aux antibiotiques testés.

Concernant nos résultats, seulement 3 souches de *S. aureus* résistantes aux pénicillines G ont été identifiés sur les surfaces prélevées. Ce résultat concorde avec celui enregistré sur les isolats de *S. aureus* prélevés chez les NN, où les *S. aureus* identifiées ne dépassaient pas 8 souches. Aucun SARM n'a été détecté. Une étude similaire a enregistré une diffusion clonale des souches *S. aureus* isolées à partir des patients hospitalisés, des équipements médicaux et de l'environnement hospitalier. Cette étude a notée également des taux de résistance élevés notamment aux pénicillines qui sont supérieurs à 98% [176].

Dans notre étude, le taux de résistance aux fluoroquinolones chez les entérobactéries isolées des surfaces hospitalières a été aussi élevé (77%). Ce taux de résistance a été également élevé en portage intestinal des NN. La résistance aux fluoroquinolones chez les bactéries de l'environnement hospitalier a été également rapporté dans plusieurs pays du monde dont la chine, le Hong Kong, les Philippines et Singapour [177].

Selon Han et ses coll. (2015), l'entretien de l'environnement hospitalier peut être considéré comme un des moyens de prévention de la transmission des infections associées aux soins dans les établissements de santé [45]. Malgré cela, plusieurs études ont montré que les protocoles de nettoyage et de désinfection adoptés dans les établissements de santé étaient souvent inadéquats [45]. Les résultats de notre étude serviront d'outil pédagogique à l'intention du personnel hospitalier pour le sensibiliser au processus de nettoyage en milieu hospitalier et pour faire en sorte que les procédures de nettoyage de l'environnement soient rigoureusement suivies. En effet, tous les hôpitaux devraient fournir un protocole écrit de nettoyage et développer des programmes visant à optimiser l'efficacité du nettoyage des surfaces fortement touchées dans le cadre du nettoyage et du bionettoyage des salles au moment du départ ou du transfert des patients notamment colonisés [178].

V - Prévention de la transmission croisée des BMR

La transmission croisée des BMR entre les nouveau-nés à travers l'environnement et le personnel soignant reste la voie de colonisation des NN la plus probable. La prévention de la

colonisation par des BMR chez le nouveau-né est certes difficile. Le dépistage à l'admission permet une détection précoce des patients colonisés et contribue au contrôle de la dissémination de ces souches par l'application de plusieurs mesures de contrôle appropriées [179,180].

Le SNRN du CHU Hassan II de Fès fournit des services à plus de 1200 patients par an, et draine une population très importante de la région de Fès et d'ailleurs. Cette situation amplifie le risque de transmission et de dissémination des souches épidémiques. La mise en place d'une capacité supplémentaire du SNRN dans la région et un nombre suffisant de personnel en respectant le ratio patient/soignant recommandé, contribuerait à réduire la charge et la demande locale, ce qui permettrait une prise en charge correcte des patients.

Les résultats du dépistage de la colonisation des NN ont incités à l'application de plusieurs mesures au fur et à mesure de l'avancement des résultats notamment:

- L'isolement géographique et technique des patients porteurs quand c'est possible ou au moins le cohorting.
- La communication simultanée des résultats de l'antibiogramme à l'équipe médicale pour adapter la meilleure antibiothérapie en fonction de l'évolution de chaque patient.
- Plusieurs séances de formations ont été programmées principalement sur les techniques de l'hygiène des mains étant la principale stratégie de prévention de l'infection. Ces formations ont concernées le personnel soignant permanent, ainsi que pour les internes et résidents pour chaque nouvelle promotion.
- Les résultats d'acquisition bactérienne enregistrés ont été utilisés à visée pédagogique pour montrer les taux élevés de l'acquisition bactérienne enregistrés et ainsi sensibiliser les personnes concernées au respect des précautions standard et à l'observance de l'hygiène des mains.
- La rédaction des protocoles de désinfection des dispositifs médicaux et des protocoles de bionettoyage a été réalisée et validé par le chef de service.

Ces mesures ont contribué à l'amélioration de la prise en charge des patients, à sensibiliser le personnel soignant au respect des précautions standard et de l'observance de l'hygiène des mains, ce qui a value au service d'obtenir le 1er prix du label de qualité: ***Respect ! hand hygiène***, en 2018. C'est un programme qui se base sur la stratégie multimodale de l'OMS pour la promotion de l'hygiène des mains dans services de soins.


RESPECT!
Hand hygiene
Label
RESPECT! Hand hygiene

Conclusion générale

Ce travail contribuera non seulement à l'enrichissement des données épidémiologiques nationales et internationales relatives à la prévalence d'acquisition de BMR chez des NN hospitalisés, mais également à la l'identification des génotypes codant pour ces résistances. Mais aussi à l'identification de certains facteurs de risques d'acquisition de BMR. La colonisation des nouveau-nés par des BMR est un sérieux problème dans les structures de soin car elle constitue une étape préalable à diverses infections pulmonaires, osseuses, ainsi que de bactériémies notamment dans les unités de soins intensifs. Le dépistage du portage intestinal réalisé à l'admission durant notre étude a mis en évidence une prévalence élevée de 33% des entérobactéries multi-résistantes notamment celles des entérobactéries productrices de BLSE avec une prédominance des souches de *K. pneumoniae* et d'*E. coli*. En cours d'hospitalisation, environ 60% des NN ont acquis des EMR notamment des E-BLSE ce qui témoigne de la transmission croisée d'un réservoir à un autre.

D'autre part, la colonisation des NN par des *A. baumannii* multi-résistants a été de 13,7%. Cette bactérie redoutable, est d'autant plus préoccupante qu'elle persiste dans l'environnement et se développe préférentiellement chez des malades immunodéprimés et vulnérables. La résistance à plus de deux classes d'antibiotiques était fréquente dans cette étude, avec environ une résistance de 90% à la gentamicine et de 50% à la ciprofloxacine reflétant ainsi leur large utilisation dans les traitements.

Ces enzymes BLSE ont été codées principalement par le gène $bla_{CTXM-15}$ avec un taux de 81,2%. De même, les gènes bla_{oxa-48} et bla_{oxa-23} codant pour la carbapénèmase ont été souvent rapporté dans les pays du Maghreb et ceux riverains de la méditerranée. Heureusement, nous n'avons pas identifié des métallo-beta lactamases qui occasionnent de vives inquiétudes en raison de leur dissémination intercontinentale et de leur impact clinique très important.

Au-delà du risque individuel du patient colonisé, la transmission de BMR à d'autres patients et leur dissémination dans la communauté constituent également une préoccupation majeure. L'amélioration des capacités de diagnostic, le dépistage systématique à l'admission et le suivi de la propagation dans la communauté sont souhaitables. Réduire la surpopulation à l'hôpital et augmenter le nombre d'employés sont probablement des contre-mesures efficaces de la transmission. Au-delà d'une réévaluation critique de la prescription d'antibiotiques, des mesures d'hygiène des mains pour les soignants devraient être également appliquées.

Empêcher la diffusion interindividuelle de BMR doit être considéré par tous les professionnels de santé comme un enjeu de qualité des soins. Une stratégie active de maîtrise de la dissémination des BMR devrait être appliquée et pour être efficace, elle doit s'inscrire dans la durée et la continuité, et s'appuyer sur la mobilisation de l'ensemble des professionnels de santé. Plusieurs recommandations peuvent être ainsi avancées :

1- L'instauration du dépistage systématique des NN à l'admission et en cours de leur séjour (dépistage hebdomadaire), afin d'identifier les patients porteurs de BMR et d'établir les mesures de prévention de la transmission croisée notamment l'isolement géographique ou au moins technique.

2- La mise en place des mesures d'hygiène réunies sous l'appellation "précautions standards" afin de diminuer également le risque de transmission croisée et le taux d'infections associées aux soins.

3- La surveillance épidémiologique de la résistance dans l'environnement hospitalier comme étant un élément important dans une politique de prévention de l'infection associée aux soins et de transmission des BMR.

4- La mise en place des protocoles de nettoyage et de désinfection adéquate pour maîtriser la contamination environnementale par des microorganismes multi-résistants.

5- Mettre en place une politique d'antibiothérapie rationnelle basée sur ces données de dépistage (traitement probabiliste) et sur la documentation bactériologique de toute infection.

Perspectives

Ce travail offre plusieurs perspectives d'axes de recherche:

- L'évaluation de la relation clonale entre les isolats identifiées chez les patients hospitalisées et ceux isolés à partir des surfaces contaminés afin de confirmer une éventuelle transmission croisée.
- La recherche d'autres gènes de résistances codant pour d'autres familles d'antibiotiques tels que les aminosides et les quinolones vu le taux de résistance élevé trouvé chez ces isolats identifiés.
- L'étude de la relation entre colonisation et infection par ces même BMR isolées en portage, afin de mieux cerner les facteurs de risque causant le passage de la colonisation à l'infection.
- Développement de la coopération interuniversitaire et hôpital/faculté des sciences.
- Création des services d'hygiène hospitalière (en bonne et due forme) pour gérer la problématique des BMR au sein des établissements de soins.
- Constitution des CNR et de pôles d'excellence en matière de BMR.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

[1] Mehrad B., Clark N. M., Zhanel G. G., Lynch J. P. 2015. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. Chest ; 147:1413–21.

[2] O'neill J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally. Le rapport final et recommandations de la revue« antimicrobial resistance ».

[3] Zingg W., Hopkins S., Gayet-Ageron A., Holmes A., Sharland M., Suetens C. 2017. Health-care-associated infections in neonates, children, and adolescents: an analysis of paediatric data from the European Centre for Disease Prevention and Control point-prevalence survey. Lancet Infect Dis ; 17:381–9.

[4] World health Organization. 2018. Health care-associated infections.

[5] Mathers A. J., Peirano G., Pitout J. D. D. 2015. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Rev ; 28:565–91.

[6] Bonnet R..2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother ; 48:1–14.

[7] Reygaert W. C. 2013. Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*. 1ère edition du livre : Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education ; 1 (1).

[8] Boyce J. M. 2007. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. J Hosp Infect ; 65:50–4.

[9] Zwittink R. 2014. Intestinal colonization in premature and very low birth weight infants : Influencing factors and necrotizing enterocolitis Utrecht Wageningen. Front Cell Infect Microbiol.

[10] Vergnano S., Sharland M., Kazembe P., Mwansambo C., Heath P. T. 2005. Neonatal sepsis: An international perspective. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed ; 90.

[11] Sydnor E. R. M., Perl T. M.. 2011. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. Clin Microbiol Rev ; 24:141–73.

[12] El Kettani A., Maaloum F., Diawara I., Katfy K., Harrar N., Zerouali K. 2017. Prevalence of*Acinetobacter baumannii*bacteremia in intensive care units of Ibn Rochd University Hospital, Casablanca. Iran J Microbiol ; 9:318–23.

[13] Ben Jaballah N., Bouziri A., Kchaou W., Hamdi A., Mnif K., Belhadj S. 2006. Épidémiologie des infections bactériennes nosocomiales dans une unité de réanimation néonatale et pédiatrique tunisienne. Médecine Mal Infect ; 36:379–85.

[14] Maoulainine F. M. R., Elidrissi N. S., Chkil G., Abba F., Soraa N., Chabaa L. 2014. Épidémiologie de l'infection nosocomiale bactérienne dans un service de réanimation néonatale Marocain. Arch Pediatr ; 21:938–43.

[15] Waligora-Dupriet A. J., Doucet-Populaire F., Kalach N., Dupont C., Butel M. J. 2008. Gastroentérologie clinique et biologique. Société nationale française de gastroentérologie,Masson.

[16] Lachassinne E., Letamendia-Richard E., Gaudelus J. 2004. Épidémiologie des infections nosocomiales en néonatalogie. Arch Pédiatrie ; 11:229–33.

[17] Saiman L. 2002. Risk Factors for Hospital-acquired Infections in the Neonatal Intensive Care Unit. Semin Perinatol. ; 26(5):315-21.

[18] Clark R., Powers R., White R., Bloom B., Sanchez P., Benjamin D. K. 2004. Prevention and Treatment of Nosocomial Sepsis in the NICU. J Perinatol ; 24:446–53.

[19] Lundequist B., Nord C. E., Winberg J. 1985. The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks. Acta Paediatr Scand ; 74:45–51.

[20] Gayvallet-Montredon N., Sauvestre C., Bergeret M., Gendrel D., Raymond J. 2002. Bactériémies nosocomiales en pédiatrie : Nosocomial bloodstream infection in a children's hospital. Archives de Pédiatrie ; 9 (7) 679-684.

[21] Foglia E., Meier M. D., Elward A. 2007. Ventilator-associated pneumonia in neonatal and pediatric intensive care unit patients. Clin Microbiol Rev ; 20:409–25.

[22] Gopal Katherason S., Naing L., Jaalam K., Imran Musa K., Nik Mohamad N. A., Aiyar S. 2009. Ventilator-associated nosocomial pneumonia in intensive care units in Malaysia. J Infect Dev Ctries ; 3:704–10.

[23] Benedetto C. D., Bernasconi A. 2013. Infection du site chirurgical : facteurs de risque, prévention, diagnostic et traitement. Revue Médicale Suisse ; 9 : 1832-1839.

[24] Calil R., Marba S.T.M., von Nowakonski A., Tresoldi A.T. 2001. Reduction in colonization and nosocomial infection by multiresistant bacteria in a neonatal unit after institution of educational measures and restriction in the use of cephalosporins. Am J Infect Control ; 29:133–8.

[25] Gray J., Arvelo W., McCracken J., Lopez B., Lessa F.C., Kitchel B. 2012. An outbreak of *Klebsiella pneumoniae* late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit in Guatemala. Am J Infect Control ; 40:516–20.

[26] Gordon R. J., Lowy F. D. 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Clin Infect Dis. ; 46(5): S350–S359.

[27] Landman D., Quale J. M., Mayorga D., Adedeji A., Vangala K., Ravishankar J. 2002. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. Arch Intern Med ; 162:1515–20.

[28] Bourigault C., Corvec S., Bretonnière C., Guillouzouic A., Crémet L., Marraillac J. 2013. Investigation and management of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* spread in a French medical intensive care unit: One outbreak may hide another. Am J Infect Control ; 41:652–3.

[29] Struve C., Krogfelt K. A. 2004. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. Environ Microbiol ; 6:584–90.

[30] Quinet B., Mitanchez D., Salauze B., Carbonne A., Bingen E., Fournier S. 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 néonatologie. Arch Pédiatrie ; 17:S145–9.

[31] Bloemendaal A. L., Fluit A. C., Jansen W. M., Vriens M. R., Ferry T., Argaud L. 2009. Acquisition and Cross-Transmission of *Staphylococcus aureus* in European Intensive Care

Units. Infect Control Hosp Epidemiol ; 30:117–24.

[32] Legeay C., Bourigault C., Kouatchet A. T., Lepelletier D., Zahar J. R.. 2015. De la colonisation à l'infection par des bactéries multirésistantes aux antibiotiques : identification et maîtrise du risque chez les patients hospitalisés en réanimation. Reanimation ; 24:297–303.

[33] Wertheim H. F., Vos M. C., Ott A., van Belkum A., Voss A., Kluytmans J. A. 2004. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. Lancet ; 364:703–5.

[34] Lucet J. C., Grenet K., Armand-Lefevre L., Harnal M., Bouvet E., Regnier B. 2005. High prevalence of carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission in elderly patients: implications for infection control strategies. Infect Control Hosp Epidemiol ; 26:121–6.

[35] Société Française d'Hygiène Hospitalière. 2017. Recommandations : Actualisation des précautions standard - Établissements de santé - Établissements médicosociaux - Soins de ville ; 13–8.

[36] Rutala W. A., Weber D. J. 1997. Water as a reservoir of nosocomial pathogens. Infect Control Hosp Epidemiol ; 18:609–16.

[37] Durocher A, Hajjar J, Hugonnet S. 2002. Prévention de la transmission des micro-organismes en réanimation. Indicateurs et modalités de surveillance. Rapport d'experts français en réanimation.

[38] Hayden M. K., Blom D. W., Lyle E. A., Moore C. G., Weinstein R. A. 2008. Risk of Hand or Glove Contamination After Contact With Patients Colonized With Vancomycin-Resistant *Enterococcus* or the Colonized Patients Environment. Infect Control Hosp Epidemiol ; 29:149–54.

[39] Huslage K., Rutala W. A., Sickbert-Bennett E., Weber D. J. 2010. A Quantitative Approach to Defining "High-Touch" Surfaces in Hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol ; 31:850–3.

[40] Barbut F., Neyme D. 2006. Les difficultés d'interprétation des contrôles microbiologiques environnementaux. Rev Francoph Des Lab ; 2006:27–32.

[41] Wendt C., Wiesenthal B., Dietz E., Rüden H. 1998. Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. J Clin Microbiol ; 36:3734–6.

[42] Squinazi F. 2006. Analyses en microbiologie - Environnement microbien (air, surfaces, eau). Rapport Qualité Sécurité Au Lab.

[43] Otter J. A., Yezli S., French G. L. 2011. The Role Played by Contaminated Surfaces in the Transmission of Nosocomial Pathogens. Infect Control Hosp Epidemiol ; 32:687–99.

[44] Hartemann P., Blech M. F., Simon L. 1997. Les contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier. Rev Fr Des Lab ; 43–7.

[45] Han J. H., Sullivan N., Leas B. F., Pegues D. A., Kaczmarek J. L., Umscheid C. A. 2015. Cleaning Hospital Room Surfaces to Prevent Health Care–Associated Infections. Ann Intern Med ; 163:598.

[46] Calop J., Limat S., Fernandez C. 2008. Chapitre 11 et 12 dans Pharmacie clinique et thérapeutique 3^{éme} édition.

[47] Kohanski M. A., De Pristo M. A., Collins J. J. 2010. Sublethal Antibiotic Treatment Leads to

Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. Mol Cell ; 37:311–20.

[48] Bryskier A. 1984. Classification of beta-lactams. Pathol Biol ; 32:658–67.

[49] Alain P., Jacoby R. L. 1989. Extended-Spectrum beta-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother ; 33:1131–6.

[50] Kattan J. N., Villegas M. V., Quinn J. P. 2008. New developments in carbapenems. Clin Microbiol Infect ; 14:1102–11.

[51] Chopra I., O'Neill J., Miller K. 2003. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. Drug Resist Updat ; 6:137–45.

[52] Davies J. E. 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. Ciba Found Symp ; 207:15–27; 27-35.

[53] Rowe-Magnus D. A., Mazel D. 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. Curr Opin Microbiol ; 4:565–9.

[54] Rowe-Magnus D. A., Guerout A. M., Ploncard P., Dychinco B., Davies J., Mazel D. 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. Proc Natl Acad Sci ; 98:652–7.

[55] Société Francaise de Microbiologie. 2013. Comite de l'Antibiogramme de la Societe Francaise De Microbiologie Recommandations.

[56] Woerther P. L., Burdet C., Chachaty E., Andremont A. 2013. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β-lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M. Clin Microbiol Rev ; 26:744–58.

[57] Lahlou Amine I., 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 ; 11:90–6.

[58] Bouchakour M., Zerouali K., Gros Claude J. D. P., Amarouch H., El Mdaghri N., Courvalin P. 2010. Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae in Morocco. J Infect Dev Ctries ; 4:779–803.

[59] Girlich D., Bouihat N., Poirel L., Benouda A., Nordmann P. 2014. High rate of faecal carriage ofextended-spectrum β-lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at a University hospital in Morocco. Clin Microbiol Infect ; 20:350–354.

[60] Sankar S., Narayanan H., Kuppanan S., Nandagopal B. 2012. Frequency of extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing Gram-negative bacilli in a 200-bed multi-specialty hospital in Vellore district, Tamil Nadu, India. Infection ; 40:425–9.

[61] Ewers C., Li G., Wilking H., Kieβling S., Alt K., Antáo E. M. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they?. Int J Med Microbiol ; 297:163–76.

[62] Temkin E., Adler A., Lerner A., Carmeli Y. 2014. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Biology, epidemiology, and management. Ann New York Acad Sci ; 1323:22–42.

[63] Nordmann P., Naas T., Poirel L. 2011. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis ; 17:1791–8.

[64] Barguigua A, Zerouali K, Katfy K, El Otmani F, Timinouni M, Elmdaghri N. 2015. Occurrence

of OXA-48 and NDM-1 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Moroccan university hospital in Casablanca, Morocco. Infect Genet Evol ; 31:142–148.

[65] Hancock R. 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. Trends Microbiol ; 5:37–42.

[66] Trias J., Nikaido H. 1990. Protein D 2 channel of the *Pseudomonasaeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. J Biol Chem ; 265:15680–4.

[67] McMurry L., Petrucci R. E., Levy S. B. 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA ; 77:3974–7.

[68] Bonnet R. 2004. Minireview Growing Group of Extended-Spectrum β-Lactamases : the CTX-M Enzymes. Antimicrob Agents Chemother ; 48(1):1-14.

[69] Poirel L., Thomas I. L. E., Naas T., Karim A., Nordmann P. 2000. Biochemical Sequence Analyses of GES-1 , a Novel Class A Extended-Spectrum β-Lactamase , and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother ; 44(3):622-32.

[70] Poirel L., Naas T., Guibert M., Chaibi E. L. B., Labia R., Nordmann P. 1999. Molecular and Biochemical Characterization of VEB-1 , a Novel Class A Extended-Spectrum β-Lactamase Encoded by an *Escherichiacoli* Integron Gene.Antimicrob Agents Chemother ; 43(3):573-81.

[71] Matsumoto Y., Inoue M. 1999. Characterization of SFO-1 , a Plasmid-Mediated Inducible Class A β-Lactamase from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother ; 43(2):307-13.

[72] Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A.A. 1995.A Functional Classification Scheme for β-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. Antimicrob Agents Chemother ; 39(6):1211-33.

[73] Bradford P. A. 2001. Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century : characterization , epidemiology , and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev ; 14(4): 933–951.

[74] Huletskysg A., Knoxll J. R., Levesquesll R. C. 1993. Role of Ser-238 and Lys-240 in the Hydrolysis of Third-generation Cephalosporins by SHV-type beta-lactamases Probed by Site-directed Mutagenesis and Three-dimensional Modeling.J Biol Chem ; 15 268(5):3690-7.

[75] Evans B. A., Brown S., Hamouda A., Findlay J., Amyes S. G. B. 2007. Eleven novel OXA-51-like enzymes from clinical isolates of *Acinetobacterbaumannii*. Clin Microbiol Infect ; 13:1137–8.

[76] Cantón R., Coque T. M. 2006. The CTX-M β-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol ; 9:466–75.

[77] Dolejska M., Frolkova P., Florek M., Jamborova I., Purgertova M., Kutilova I. 2011. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiellaspp*. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. J Antimicrob Chemother ; 66(12):2784-90.

[78] Hiroi M., Yamazaki F., Harada T., Takahashi N., Iida N. 2012. Prevalence of Extended-Spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Food-Producing Animals. J Vet Med Sci ; 74(2):189-95.

[79] Karim A., Poirel L., Nagarajan S., Nordmann P. 2001. Plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence IS Ecp1.FEMS Microbiol Lett ; 201:237–41.

[80] Cantón R., González-alba J. M., Galán J. C. 2012. CTX-M enzymes : origin and diffusion. Front Microbiol ; 2;3:110.

[81] Corvec S., Prodhomme A., Giraudeau C., Dauvergne S., Reynaud A., Caroff N. 2007. Most *Escherichia coli* strains overproducing chromosomal AmpC β-lactamase belong to phylogenetic group A. J Antimicrob Chemother ; 60:872–6.

[82] Bush K., Jacoby G. A. 2010. Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother ; 54:969–76.

[83] Watanabe M., Iyobe S., Inoue M., Mitsuhashi S. 1991. Transferable Imipenem Resistance in *Pseudomonasaeruginosa*.Antimicrob Agents Chemother ; 35(1):147-51.

[84] Lauretti L., Riccio M. L., Mazzariol A., Cornaglia G., Amicosante G., Fontana R. 1999. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother ; 43:1584–90.

[85] Lee H. K., Park Y. J., Kim J. Y., Chang E., Cho S. G., Chae H. S. 2005. Prevalence of decreased susceptibility to carbapenems among *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, and *Citrobacter freundii* and investigation of carbapenemases. Diagn Microbiol Infect Dis ; 52:331–6.

[86] Yong D., Toleman M. A., Giske C. G., Cho H. S., Sundman K., Lee K. 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiellapneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother ; 53:5046–54.

[87] Shibata N., Doi Y., Yamane K., Yagi T., Kurokawa H., Shibayama K. 2003. PCR Typing of Genetic Determinants for Metallo-β-Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan , with Focus on the Class 3 Integron. J Clin Microbiol ; 41:5407–13.

[88] Lincopan N., Mcculloch J. A., Reinert C., Cassettari C., Gales A. C., Mamizuka E. M. 2005. First Isolation of Metallo-β-Lactamase-Producing Multiresistant *Klebsiellapneumoniae* from a Patient in Brazil. J Clin Microbiol ; 43:516–9.

[89] Barguigua A., Otmani F., Talmi M., Reguig A., Jamali L. 2013. Prevalence and genotypic analysis of plasmid- mediated β-lactamases among urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. J Antibiot (Tokyo) ; 66:11–6.

[90] Yan J., Ko W., Tsai S., Wu H. 2001. Outbreak of Infection with Multidrug-Resistant *Klebsiellapneumoniae* Carrying bla_{IMP-8} in a University Medical Center in Taiwan. J Clin Microbiol ; 39:4433–9.

[91] Giakkoupi P., Xanthaki A., Kanelopoulou M., Vlahaki A., Miriagou V., Kontou S. 2003. VIM-1 Metallo-β-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Greek Hospitals. J Clin Microbiol ; 41:3893–6.

[92] Luzzaro F., Docquier J., Endimiani A., Lombardi G., Amicosante G., Rossolini G. M. 2004. Emergence in Klebsiella pneumoniae and Enterobacter cloacae Clinical Isolates of the VIM-4 Metallo-β-Lactamase Encoded by a Conjugative Plasmid. Antimicrob Agents Chemother ; 48:648–50.

[93] Kim M., Yong D., An D., Chung H., Woo J. H., Lee K. 2012. Nosocomial clustering of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 strains in four patients at a South Korean tertiary care hospital. J Clin Microbiol ; 1433–6.

[94] Findlay J., Hamouda A., Dancer S. J., Amyes S. G. B. 2011. Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of *Klebsiella pneumoniae* arising during meropenem therapy. Clin Microbiol Infect ; 18:140–6.

[95] Mena A., Plasencia V., Garci L., Hidalgo O., Ayestara I., Borrell N. 2006. Characterization of a Large Outbreak by CTX-M-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* and Mechanisms Leading to In Vivo Carbapenem Resistance Development. J Clin Microbiol ; 44:2831–7.

[96] Oteo J., Delgado-iribarren A., Vega D., Bautista V., Cruz M., Velasco M. 2008. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy.International Journal of Antimicrobial Agents ; 32:534–7.

[97] Poirel L., Benouda A., Hays C., Nordmann P. 2011. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. J Antimicrob Chemother ; 66:2781–3.

[98] Franklin C., Liolios L., Peleg A. Y. 2006. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-lactamase-producing Gram negative bacilli in the clinical laboratory. J Clin Microbiol ; 44:3139–44.

[99] Barguigua A., Otmani F., Talmi M., Bourjilat F., Haouzane F., Zerouali K. 2011. Characterization of extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco. J Med Microbiol ; 60(9):1344-52.

[100] Poirel L., Walsh T. R., Cuvillier V., Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis ; 70:119–23.

[101] Woodford N., Ellington M. J., Coelho J. M., Turton J. F., Ward M. E., Brown S. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacterspp*.Int J Antimicrob Agents ; 27:351–3.

[102] Javier Pérez-Pérez F., Hanson N. D. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol ; 40:2153–62.

[103] Voytas D. 2001. Resolution and recovery of DNA fragments. Curr Protoc Immunol ; 1–8.

[104] Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.Proc Natl Acad Sci USA ; 74(12):5463-7.

[105] Kado C.I., Liu S. T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol ; 145(3):1365-73.

[106] Durmaz R., Otlu B., Koksal F., Hosoglu S., Ozturk R., Ersoy Y. 2009. The Optimization of a Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for the Typing of *Acinetobacterbaumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.*Jpn J Infect Dis ; 62(5):372-7.

[107] Singh N., Patel K. M., Léger M. M., Short B., Sprague B. M., Kalu N. 2002. Risk of resistant infections with Enterobacteriaceae in hospitalized neonates. Pediatr Infect Dis J ; 21:1029–33.

[108] Liu L., Hill K., Oza S., Hogan D., Chu Y., Cousens S. 2016. Levels and Causes of Mortality under Age Five Years. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank ; 2 (4).

[109] Denkel L. A., Schwab F., Kola A., Leistner R., Garten L., von Weizsacker K. 2014. The mother as most important risk factor for colonization of very low birth weight (VLBW) infants with extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E). J Antimicrob Chemother ; 69:2230–7.

[110] Chan G. J., Lee A. C. C., Baqui A. H., Tan J., Black R. E. 2013. Risk of early-onset neonatal infection with maternal infection or colonization: a global systematic review and meta-analysis. PLoS Med ; 10:e1001502.

[111] L'organisation mondiale de santé. 2013. Evidence of hand hygiene to reduce transmission and infections by multi-drug resistant organisms in health-care settings..

[112] Andriatahina T., Randrianirina F., Ratsima Hariniana E., Talarmin A., Raobijaona H., Buisson Y. 2010. High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichiacoli* and *Klebsiellapneumoniae* in a pediatric unit in Madagascar.BMC Infectious Diseases ; 10 (204).

[113] Herindrainy P., Dé Rique Randrianirina F., Ratovoson R., Ratsima Hariniana E., Buisson Y., Genel N. 2011. Rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in community settings in Madagascar.PLoS One ; 6(7):e22738

[114] Isendahl J., Turlej-Rogacka A., Manjuba C., Rodrigues A., Giske C. G., Nauclé P. 2012. Fecal Carriage of ESBL-Producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in Children in Guinea-Bissau: A Hospital-Based Cross-Sectional Study.PLoS One ; 7(12):e51981.

[115] Schaumburg F., Alabi A., Kokou C., Grobusch M. P., Köck R., Kaba H. 2013. High burden of extended-spectrum β-lactamase-producing enterobacteriaceae in Gabon. J Antimicrob Chemother ; 68:2140–3.

[116] Lonchel C. M., Melin P., Gangoué-Piéboji J., Assoumou M. C. O., Boreux R., De Mol P. 2013. Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Cameroonian hospitals. Eur J Clin Microbiol Infect Dis ; 32:79–87.

[117] Valenza G., Nickel S., Pfeifer Y., Eller C., Krupa E., Lehner-Reindl V. 2014. Extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichiacoli*as intestinal colonizers in the German community. Antimicrob Agents Chemother ; 58:1228–30.

[118] Bourich T. 2009. Prévalence de portage des bactéries multirésistantes à l'admission dans les services de réanimation de l'hôpital cheikh Zaïd de rabat. Rapport de l'université Mohammed V de Rabat.

[119] Berezin E. N., Solórzano F. 2014. Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. J Infect Dev Ctries ; 8:942–53.

[120] Bagattini M., Crivaro V., Di Popolo A., Gentile F., Scarcella A., Triassi M. 2006. Molecular epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. J Antimicrob Chemother ; 57:979–82.

[121] Detsis M., Karanika S., Mylonakis E. 2017. ICU Acquisition rate, risk factors, and clinical significance of digestive tract colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: a systematic review and meta-analysis. Crit Care Med ; 45:705–14.

[122] Gupta A., Della-Latta P., Todd B., San Gabriel P., Haas J., Wu F. 2004. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamaseproducing *Klebsiellapneumoniae* in a neonatal intensive care unit linked to artificial nails. Infect Control Hosp Epidemiol ; 25:210–5.

[123] Beck-Sague C. M., Azimi P., Fonseca S. N., Baltimore R. S., Powell D. A., Bland L.A. 1994. Bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: results of a multicenter study. Pediatr Infect Dis J ; 13:1110–6.

[124] Crivaro V., Bagattini M., Salza M. F., Raimondi F., Rossano F., Triassi M. 2007. Risk factors

for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* acquisition in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect ; 67:135–41.

[125] Zaidi A. K. M., Huskins W. C., Thaver D., Bhutta Z. A., Abbas Z., Goldmann D. A. 2005. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. Lancet ; 1;365(9465):1175-88.

[126] Nordmann P., Cuzon G., Naas T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. Lancet Infect Dis ; 9:228–36.

[127] Boucher H. W., Talbot G. H., Bradley J. S., Edwards J. E., Gilbert D., Rice L. B. 2009. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis ; 48:1–12.

[128] Catal F., Akgul O., Sapmaz B., Atal T., Karasakal M. F., Zyurt E. 2015. The colonization and infection relationship in hospitalized patients at intensive care unit. Indian Journal of Applied Research ; 5 (9).

[129] Armand-Lefèvre L., Angebault C., Barbier F., Hamelet E., Defrance G., Ruppé E. 2013. Emergence of imipenem-resistant gram-negative bacilli in intestinal flora of intensive care patients. Antimicrob Agents Chemother ; 57:1488–95.

[130] Yeşilbağ Z., Çağatay A. A., Karadeniz A., Başaran S., Orhun G., Özcan P. E. 2015.Is there a relationship between rectal colonization and nosocomial infection of patients in intensive care unit.Mikrobiyol Bul ; 49(3):327-39.

[131] Playford E. G., Craig J. C., Iredell J. R. 2007. Carbapenem resistant *Acinetobacterbaumannii* in intensive care unit patients : risk factors for acquisition, infection and their consequences. J Hosp Infect ; 65(3): 204-11.

[132] Thuy D. B., Campbell J., Van N., Hoang M., Thi T., Trinh T. 2017. A one-year prospective study of colonization with antimicrobial-resistant organisms on admission to a Vietnamese intensive care unit. PLoS One ; 12(9):e0184847.

[133] Hu H., Huang H., Peng Q., Lu J., Lei X. 2010. Prospective study of colonization and infection because of *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients at a neonatal intensive care unit in China. Am J Infect Control ; 38:746–50.

[134] Cobos-Trigueros N., Solé M., Castro P., Torres J. L., Hernández C., Rinaudo M. 2015. Acquisition of *Pseudomonasaeruginosa* and its resistance phenotypes in critically ill medical patients: role of colonization pressure and antibiotic exposure. Crit Care ; 19:218.

[135] Hübner J., Kropec A. 1995. Cross infections due to coagulase-negative staphylococci in high-risk patients. Zentralbl Bakteriol ; 283:169–74.

[136] Silva G. D. I., Justice A., Wilkinson A. R., Buttery J., Herbert M., Day N. P. J. 2001. Genetic population structure of coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in preterm infants. Clin Infect Dis ; 33:1520–8.

[137] Rakotonirina H. C., Garin B., Randrianirina F., Richard V., Talarmin A., Arlet G. 2013. Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated in Antananarivo, Madagascar. BMC Microbiol ; 13:85.

[138] Jett B. D., Ritchie D. J., Reichley R., Bailey T. C., Sahm D. F. 1995. In vitro activities of various beta-lactam antimicrobial agents against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* resistant to oxyimino cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother ; 39:1187–90.

[139] Villa L., Pezzella C., Tosini F., Visca P., Petrucca A., Carattoli A. 2000. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum beta-lactamase gene and a class 1 integron. Antimicrob Agents Chemother ; 44:2911–4.

[140] Ghafourian S., Sadeghifard N., Soheili S., Sekawi Z. 2015. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. Curr Issues Mol Biol ; 17:11-21.

[141] Lee M. Y., Ko K. S., Kang C. I., Chung D. R., Peck K. R., Song J. H. 2011. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: Diverse clones and clonal dissemination. Int J Antimicrob Agents ; 38:160–3.

[142] Chong Y., Ito Y., Kamimura T. 2011. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Infect Genet Evol ; 11:1499–504.

[143] Poirel L., Naas T., Nordmann P. 2008. Review Genetic support of extended-spectrum β-lactamases. Clinical microbiology and infection ; 14Suppl 1 : 75-81

[144] García A., Navarro F., Miró E., Mirelis B., Campoy S., Coll P. 2005. Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*$_{CTX-M-9}$ gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. J Antimicrob Chemother ; 56:819–26.

[145] Rodriguez-Villalobos H., Struelens M. J. 2006. Résistance bactérienne par β-lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur Extended spectrum β-lactamases mediated bacterial resistance: Implications for the intensivist. Réanimation 15 (3), 205-213.

[146] Al-Agamy M. H. M., Shibl A. M., Tawfik A. F. 2009. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. Ann Saudi Med ; 29:253–7.

[147] Birgy A., Mariani-Kurkdjian P., Bidet P., Doit C., Genel N., Courroux C., Arlet G., Bingen E. 2013. Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains involved in maternal-fetal colonization: Prevalence of *E. coli* ST131. J Clin Microbiol ; 51:1727–32.

[148] Gomes Chagas T. P., Alves R. M., Vallim D. C., Seki L. M., Campos L. C., Asensi M. D. 2011. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. Brazilian J Infect Dis ; 15:420–5.

[149] Rakotonirina H. C., Garin B., Randrianirina F., Richard V., Talarmin A., Arlet G. 2013. Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated in Antananarivo, Madagascar. BMC Microbiol ; 17;13:85.

[150] Barguigua A., Otmani F., Talmi M., Bourjilat F., Haouzane F., Zerouali K. 2011. Characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco. J Med Microbiol ; 60:1344–52.

[151] Poirel L., Héritier C., Tolün V., Nordmann P. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother ; 48:15–22.

[152] Matar G. M., Dandache I., Carrër A., Khairallah M. T., Nordmann P., Sabra A. 2010. Spread of OXA-48-mediated resistance to carbapenems in Lebanese *Klebsiellapneumoniae* and *Escherichiacoli* that produce extended spectrum β-lactamase. Ann Trop Med Parasitol ; 104:271–4.

[153] Nazic H. 2005. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in

enterobacteriaceae in Turkey.Antimicrob Agents Chemother ; 49(5): 2146–2147.

[154] Potter R. F., D'Souza A. W., Dantas G. 2016. The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Drug Resist Updat ; 29:30–46.

[155] Moghnieh R., Siblani L., Ghadban D., Mchad H., Zeineddine R., Abdallah D. 2016. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Lebanese intensive care unit : risk factors for acquisition and determination of a colonization score. J Hosp Infect ; 92:47–53.

[156] Clock S. A., Ferng Y. H., Tabibi S., Alba L., Patel S. J., Jia H. 2017. Colonization with antimicrobial-resistant gram-negative bacilli at neonatal intensive care unit discharge. J Pediatric Infect Dis Soc ; 6:219–26.

[157] Al Jarousha A. M., El Jadba A. H., Al Afifi A. S., El Qouqa I. A. 2009. Nosocomial multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the neonatal intensive care unit in Gaza City , Palestine. Int J Infect Dis ; 13(5):623-8.

[158] Nordmann P. 2010. Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. Med Sci (Paris) ; 26 : 950–959

[159] Turton J. F., Ward M. E., Woodford N., Kaufmann M. E., Pike R., Livermore D.M. 2006. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett ; 258:72–7.

[160] Djahmi N., Dunyach-remy C., Pantel A., Dekhil M., Sotto A., Lavigne J. 2014. Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries.Biomed Res Int ; 2014:305784.

[161] Uwingabiye J., Lemnouer A., Roca I., Alouane T., Frikh M., Belefquih B. 2017.Clonal diversity and detection of carbapenem resistance encoding genes among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from patients and environment in two intensive care units in a Moroccan hospital. Antimicrob Resist Infect Control ; 26;6:99.

[162] Hammami S., Dahdeh C., Mamlouk K., Ferjeni S., Maamar E., Hamzaoui Z. 2017.Rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase producing gram negative bacilli in intensive care units in Tunisia. Microb Drug Resist ; 23(6):695-702.

[163] Aljindan R., Bukharie H., Alomar A., Abdalhamid B. 2015. Prevalence of digestive tract colonization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Saudi Arabia. J Med Microbiol ; 64:400–6.

[164] Safari M., Mozaffari Nejad A. S., Bahador A., Jafari R., Alikhani M. Y. 2015. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of intensive care units (ICU). Saudi J Biol Sci ; 22:424–9.

[165] Queenan A. M., Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev ; 20:440–58.

[166] Robledo I. E., Aquino E. E., Santé M. I., Santana J. L., Otero D. M., León C. F. 2010. Detection of KPC in *Acinetobacter spp*. in Puerto Rico. Antimicrob Agents Chemother ; 54:1354–7.

[167] Huang Y., Zhuang S., Du M. 2007. Risk factors of nosocomial infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in a neonatal intensive care unit in China. Infection ; 35:339–45.

[168] Khiev B., Veber B. 2010. Patient BMR+ : risques de contamination et prévention en

préhospitalier et aux urgences. 52e congrès national d'anesthésie et de réanimation en France.

[169] Zaidi A. K. M., Thaver D., Ali S. A. 2009. Pathogens associated with sepsis in newborns and young infants in developing countries.Pediatr Infect Dis J ; 28(1):S10-8.

[170] Cisneros-Herreros J. M., Garnacho-Montero J., Pachón-Ibáñez M. E. 2005. Nosocomial pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. Enferm Infecc Microbiol Clin ; 23 (3) :46–51.

[171] Richards M. J., Edwards J. R., Culver D. H., Gaynes R. P. 1999. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. Crit Care Med ; 27:887–92.

[172] Zhou B., Liu X., Wu J., Jin B., Zhang Y. 2016. Clinical and microbiological profile of babies born with risk of neonatal sepsis. Exp Ther Med ; 12(6): 3621–3625.

[173] Ertugrul S., Aktar F., Yolbas I., Yilmaz A., Elbey B., Yildirim A. 2016.Risk factors for health care-associated bloodstream infections in a neonatal intensive care unit.Iran J Pediatr ; 26(5):e5213.

[174] Oumokhtar B., El Ouali LalamiA., Benaicha N., Arhoune B., Bono W. 2017. Environmental surfaces in healthcare setting: A great potential risk of pathogens transmission. Biomed Res ; 28:2398–401.

[175] Oliveira D. C., Tomasz A., de Lencastre H. 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect Dis ; 2:180–9.

[176] Price J. R., Cole K., Bexley A., Kostiou V., Eyre D. W., Golubchik T. 2017. Transmission of *Staphylococcus aureus* between health-care workers, the environment, and patients in an intensive care unit: a longitudinal cohort study based on whole-genome sequencing. Lancet Infect Dis ; 17:207–14.

[177] Kang C. I., Song J. H. 2013. Antimicrobial Resistance in Asia: Current Epidemiology and Clinical Implications. Infect Chemother ; 45:22.

[178] Guh A., Carling P. 2010. Environmental Evaluation Workgroup. Options for Evaluating Environmental Cleaning. Centers for disease control and prevention report of USA.

[179] Schwaber M. J., Lev B., Israeli A., Solter E., Smollan G., Rubinovitch B. 2011. Containment of a Country-wide Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli Hospitals via a Nationally Implemented Intervention. Clin Infect Dis ; 52:848–55.

[180] Kochar S., Sheard T., Sharma R., Hui A., Tolentino E., Allen G. 2009. Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Infect Control Hosp Epidemiol ; 30:447–5

Annexes

Annexes

I - Annexe 1

Fiche d'exploitation

N° de prélèvement……..…….

N° de lit……..…….

IP Patient……Adresse…….……

Identité

Date d'hospitalisation: _ _ /_ _ / _ _ _ Date de sortie : _ _ /_ _ / _ _ _

Nombre de jours d'hospitalisation :……..

Sexe: Masculin ☐ Féminin ☐

Date et heure de naissance……..……Lieu de naissance……..……

Date et heure d'admission……..……

Provenance: service☐…….…… Hôpital☐…….....clinique☐……

Motif d'hospitalisation : .....

Age gestationnel…….. Poids ……...…….

Infection périnatale……germe en cause……

Antibiothérapie maternelle : non☐ oui☐ type……durée…….……..

Voie d'accouchement: voie basse ☐ césarienne☐

Hospitalisation : couveuse ☐ table chauffante☐

VVC ☐ VP☐ autre☐…….……....

Alimentation : sein☐ sonde ☐ biberons☐ diet☐

Antibiothérapie : oui ☐type :…….non ☐

Infection nosocomiale: oui☐ Non☐

Transfert : sortie normale☐ service……..……☐ hôpital……☐

Prélèvements microbiologiques

Consentement parentale : oui ☐ Non☐

Bébé : heure de prélèvement……..

Entrée : Nasal ☐ Rectal ☐

Sortie : Nasal ☐ Rectal ☐

Résultats des prélèvements

Germes identifiés :

Entrée:……..…….

Sortie……….

Antibiogramme……

……

II - Annexe 2

- *EMB: éosine bleu de méthylène:*

Formule en g/L d'eau distilée:

Peptone de viande ou de gélatine	10
Lactose	10
Eosine	0,4
Bleu de méthylène	0,065
Hudrogénophosphate de potassium	2
Agar	15

pH=6,8

- *Chapman:*

Sa composition, en grammes par litres d'eau disillée, est la suivante:

Peptones	11 g
Extrait de viande	1 g
Chlorure de sodium	75 g
Mannitol	10 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar	15 g
Eau distillé	1000 mL

- *BHI (Brain Heart Infusion) ou Bouillon cœur cervelle:*

Formule en g/L d'eau distilée

Infusion de cerville de veau	200g
Infusion de cœur de bœuf	250g
Peptone	10g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	2,5g
Glucose	2g
pH final	7,4

- *Gélose Pseudomonas:*

Sa composition, en grammes par litres d'eau disillée, est la suivante

Peptone	20
Sulfate de potassium	10
chlorure de potassium	3
Phosphate dipotassique	0,3
Cétrimide	0,2
Acide nalidixique	0,015
Agar	13
pH final	7,1

- *Kligler-Hajna:*

Formule en g/L d'eau distilée

Peptone	15 g
Extrait de viande	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone	5 g
Glucose	1 g
Lactose	10 g
Rouge de phénol	25 mg
Chlorure de sodium	5 g
Sulfate ferreux	0,2 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Agar-agar	11g
pH	7,5

- *Urée-indole:*

Tryptophane	3 g
Urée	20 g
Monophydrogénophosphate de potassium	1 g
Dihydrogénophosphate de potassium	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Éthanol	10 ml
Rouge de phénol	25 mg
Eau distillée	1 L

- *Gélose Muller Hinton gélosé:*

Formule en g/L d'eau distilée

infusion de viande de bœuf	300 ml
peptone de caséine	17,5g
amidon de maïs	1,5g
Agar	17g
pH final	7,4

III - Annexe 3

Tableau 25 : association entre toutes les caractéristiques des patients et la colonisation par des EMR à l'admission

Catégorie		Nombre (%) n=455	EMR- [N (%)]	EMR + [N (%)]	Valeur p
Genre	**Masculin**	267 (58,7)	180 (59)	87 (58)	0,457
	Féminin	188 (41,3)	125 (41)	63 (42)	
Age (jours)	**0-2**		222 (72,8)	86 (57,3)	**0,001**
	> 2		83 (27,2)	64 (42,7)	
Prématurité	**Oui**	224 (49,2)	156 (51,1)	68 (45,3)	0,145
	Non	231 (50,8)	149 (48,9)	82 (54,7)	
Poids à la naissance (g)	**< 2500**		158 (51,8)	68 (45,3)	0,115
	≥ 2500		147 (48,2)	82 (54,7)	
Pathologie*	**Détresse respiratoire**	259 (56,9)	182 (59,7)	77 (51,3)	**0,056**
	Ictère	38 (8,4)	21 (6,9)	17 (11,3)	0,078
	Pathologies chirurgicales	31 (6,8)	17 (5,6)	14 (9,3)	0,099
	Souffrances néonatale	34 (7,5)	24 (7,9)	10 (6,7)	0,401
	Infections néonatales	35 (7,7)	20 (6,6)	15 (10)	0,134
	Détresse neurologiques	44 (9,7)	34 (11,1)	10 (6,7)	0,086
	Malformations congénitales	11 (2,4)	9 (3)	2 (1,3)	0,239
	Autres	49 (10,8)	29 (9,5)	20 (13,3)	0,141
Lieu de naissance	**Maternité du CHU Fès**	265 (58,2)	190 (41,8)	75 (50)	**0,026**
	Autres établissements	164 (36)	97 (31,8)	67 (44,7)	
	Domicile	26 (5,7)	18 (5,9)	8 (5,3)	
Provenance	**Maternité du CHU Fès**	235 (51,6)	178 (58,4)	57 (38)	**0,000**
	Autres établissements	124 (27,3)	77 (25,2)	47 (31,3)	
	Domicile	96 (21,1)	50 (16,4)	46 (30,7)	
Mode d'accouchement	**Vaginal**	310 (68,1)	205 (67,2)	105 (70)	0,312
	Césarienne	145 (31,9)	100 (32,8)	45 (30)	
Allaitement	**Oui**	179 (39,3)	111 (36,4)	68 (45,3)	**0,042**
	Non	276 (60,7)	194 (63,6)	82 (54,7)	

IV - Annexe 4

Tableau 26 : association entre toutes les caractéristiques des patients et la colonisation par *A. baumannii* à l'admission

Catégorie		Nombre (%) n=455	AB MR- [N (%)]	AB MR + [N (%)]	Valeur p
Genre	**Masculin**	267(58,7)	244 (57,4)	23 (76,7)	**0,028**
	Féminin	188(41,3)	181 (42,6)	7 (23,3)	
Age (jours)	**0-2**		290 (68,2)	18 (60)	0,200
	> 2		135 (31,8)	12 (40)	
Prématurité	**Oui**	223(49)	205 (48,2)	18 (60)	0,145
	Non	232(51)	220 (51,7)	12 (40)	
Poids à la naissance (g)	**< 2500**		207 (48,7)	19 (63,3)	0,087
	≥ 2500		218 (51,3)	11 (36,7)	
Pathologie*	**Détresse respiratoire**	259(56,9)	240 (52,7)	19 (63,3)	0,296
	Ictère	38(8,4)	35 (8,2)	3 (10)	0,467
	Pathologies chirurgicales	31(6,8)	31 (7,3)	0 (0)	0,112
	Souffrances néonatale	34(7,5)	32 (7,5)	2 (6,7)	0,608
	Infections néonatales	35(7,7)	31 (7,3)	4 (13,3)	0,191
	Détresse neurologiques	44(9,7)	42 (9,9)	2 (6,7)	0,428
	Malformations congénitales	11(2,4)	11 (2,6)	0 (0)	0,468
	Autres	49(11,8)	47 (11,1)	2 (6,7)	0,351
Lieu de naissance	**Maternité du CHU Fès**	265(58,2)	241 (56,7)	24 (80)	**0,043**
	Autres établissements	164(36)	159 (37,4)	5 (16,7)	
	Domicile	26(5,7)	25 (5,9)	1 (3,3)	
Provenance	**Maternité du CHU Fès**	236(51,8)	217 (51,1)	19 (63,3)	0,404
	Autres établissements	124(27,3)	119 (28)	5 (16,6)	
	Domicile	95(20,8)	89 (20,9)	6 (20)	
Mode d'accouchement	**Vaginal**	310(68,1)	291 (68,5)	19 (63,3)	0,345
	Césarienne	145(31,9)	134 (31,5)	11 (36,7)	

* les nouveau-nés peuvent avoir plus d'un motif d'hospitalisation ; AB MR : *A. baumannii* multi-résistant

V - Annexe 5

Tableau 27 : Association entre toutes les caractéristiques des patients et l'acquisition d'EMR en cours d'hospitalisation

Catégorie		Nombre (%) n=455	EMR- [N (%)]	EMR + [N (%)]	Valeur p
Genre	**Masculin**	124 (59,9)	36 (65,5)	88 (57,9)	0,207
	Féminin	83 (40,1)	19 (34,5)	64 (42,1)	
Age (jours)	**0-2**		39 (70,9)	112 (73,7)	**0,001**
	> 2		16 (29,1)	40 (26,3)	
Prématurité	**Oui**	113 (54,6)	29 (52,7)	84 (55,3)	0,433
	Non	94 (45,4)	26 (47,3)	68 (44,7)	
Poids à la naissance (g)	**< 2500**		31 (56,4)	81 (53,3)	0,408
	≥ 2500		24 (43,6)	71 (46,7)	
Pathologie*	**Détresse respiratoire**	123 (59,4)	32 (58,2)	91 (59,9)	0,475
	Ictère	14 (6,8)	2 (3,6)	12 (7,9)	0,229
	Pathologies chirurgicales	11 (5,3)	4 (7,3)	7 (4,6)	0,328
	Souffrances néonatale	16 (7,7)	4 (7,3)	12 (7,9)	0,573
	Infections néonatales	16 (7,7)	3 (5,5)	13 (8,6)	0,342
	Détresse neurologiques	22 (10,6)	3 (5,5)	19 (12,5)	0,112
	Malformations congénitales	6 (2,9)	2 (3,6)	4 (2,6)	0,505
	Autres	18 (8,7)	7 (12,7)	11 (7,2)	0,168
Lieu de naissance	**Maternité du CHU Fès**	125 (60,4)	33 (60)	92 (60,5)	0,703
	Autres établissements	66 (31,9)	19 (34,5)	47 (30,9)	
	Domicile	16 (7,7)	3 (5,5)	13 (8,6)	
Provenance	**Maternité du CHU Fès**	117 (56,5)	31 (56,4)	86 (56,6)	0,870
	Autres établissements	56 (27,1)	16 (29,1)	40 (26,3)	
	Domicile	34 (16,4)	8 (14,5)	26 (17,1)	
Mode d'accouchement	**Vaginal**	142 (68,6)	34 (61,8)	108 (71,1)	0,137
	Césarienne	65 (31,4)	21 (38,2)	44 (28,9)	
Allaitement	**Oui**	69 (33,3)	17 (30,9)	52 (34,2)	0,394
	Non	138 (66,7)	38 (69,1)	100 (65,8)	
Cathéter veineux	**Périphérique**	203 (98,1)	55 (100)	148 (97,4)	0,288
	Centrale	4 (1,9)	0 (0)	4 (2,6)	
Durée d'hospitalisation (j)	**< 3**		8 (14,5)	5 (3,3)	**0,007**
	≥ 3		47 (85,5)	147 (96,7)	
Antibiothérapie	**Triaxone + Gentamicine**	116 (56)	35 (63,6)	81 (53,3)	0,121
	Aximycine + Gentamicine	74 (35,7)	18 (32,7)	56 (36,8)	0,354

* les nouveau-nés peuvent avoir plus d'un motif d'hospitalisation ; EMR : *entérobactéries* multi-résistantes.

VI - Annexe 6

Tableau 28 : association entre toutes les caractéristiques des patients et l'acquisition d'*A. baumannii* MR en cours d'hospitalisation

Catégorie		Nombre (%) n=277	AB MR- [N (%)]	AB MR + [N (%)]	Valeur p
Genre	**Masculin**	162(58,5)	139(58,2)	23(60,5)	0,783
	Féminin	115(41,5)	100(41,8)	15(39,5)	
Age (jours)	**0-2**		155(64,9)	32(84,2)	**0,018**
	> 2		84(35,1)	6(15,8)	
Prématurité	**Oui**	142(51,3)	117(49)	25(65,8)	0,054
	Non	135(48,7)	122(51)	13(34,2)	
Poids à la naissance (g)	**< 2500**		116(48,5)	24(63,2)	0,094
	≥ 2500		123(51,5)	14(36,8)	
Pathologie*	**Détresse respiratoire**	160(57,8)	132(55,2)	28(73,7)	**0,032**
	Ictère	22(7,9)	21(8,8)	1(2,6)	0,192
	Pathologies chirurgicales	21(7,6)	19(7,9)	2(5,3)	0,561
	Souffrances néonatale	18(6,5)	16(6,7)	2(5,3)	0,740
	Infections néonatales	19(6,5)	16(6,7)	3(7,9)	0,786
	Détresse neurologiques	30(10,8)	26(10,9)	4(10,5)	0,948
	Malformations congénitales	6(2,2)	6(2,5)	0(0)	0,323
	Autres	24(8,7)	22(9,2)	2(5,3)	0,422
Lieu de naissance	**Maternité du CHU Fès**	152(54,9)	128(53,6)	24(63,2)	0,369
	Autres établissements	105(37,9)	92(38,5)	13(34,2)	
	Domicile	20(7,2)	19(7,9)	1(2,6)	
Provenance	**Maternité du CHU Fès**	137(49,5)	112(46,9)	25(65,8)	**0,010**
	Autres établissements	83(30)	71(29,7)	12(31,6)	
	Domicile	57(20,6)	56(23,4)	1(2,5)	
Mode d'accouchement	**Vaginal**	196(70,8)	174(72,8)	22(57,9)	0,061
	Césarienne	81(92,2)	65(27,2)	16(42,1)	
Allaitement	**Oui**	97(35)	88(36,8)	9(23,7)	0,115
	Non	180(65)	151(63,2)	29(76,3)	
Cathéter veineux	**Périphérique**	272(98,2)	234(97,9)	38(100)	0,368
	Centrale	5(1,8)	5(2,1)	0(0)	
Durée d'hospitalisation (jours)	**< 3**		17(7,1)	1(2,5)	0,298
	≥ 3		222(92,9)	37(94,4)	
Antibiothérapie	**Triaxone + Gentamicine**	166(59,9)	143(59,8)	23(60,5)	0,935
	Aximycine + Gentamicine	87(31,4)	73(30,5)	14(36,8)	0,437

* les nouveau-nés peuvent avoir plus d'un motif d'hospitalisation ; AB MR : *A. baumannii* multi-résistant