

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et  
de la Recherche Scientifique

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Université A. Mira de Bejaia

Département de Microbiologie

## **Mémoire de fin de cycle**

En vue de l'obtention de Diplôme d'ingénieur d'Etat en Biologie  
Option: Génie Biologique

# Thème

*Contribution à l'étude de la colonisation  
digestive par les Entérobactéries résistantes aux  
céphalosporines de la 3<sup>ème</sup> génération chez les  
nouveau-nés au niveau du CHU de Bejaia et  
chez les enfants au niveau de l'Hôpital  
d'Amizour*

*Membres de jury :*

*Président : M<sup>me</sup> YAHIAOUI H.*

*Présenté par :*

*Promotrice : M<sup>me</sup> GHAROUT A.*

*M<sup>lle</sup> BEN MEZIANE NOUR EL HOUDA*

*Examinatrice : M<sup>lle</sup> SAIDANI K.*

*M<sup>lle</sup> AROUN NADIA*

*Promotion 2012*

# Sommaire

Liste des abréviations.....	
Liste des tableaux.....	
Listes des figures.....	

## *Synthèse bibliographique*

Introduction .....	1
I. Portage digestif.....	3
I.1. Flore intestinale.....	3
I.2. Etablissement de la flore intestinale des nouveau-nés.....	3
I.3. Facteurs affectant l'établissement de la flore intestinale chez les nouveaux-nés .....	5
I.4. Colonisation par les bactéries multi résistantes (BMR) .....	6
I.5. Différentes bactéries multirésistantes du tube digestif .....	6
II. Résistance aux $\beta$ -lactamines .....	8
II.1. Définition de la résistance.....	8
II.2. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines .....	8
II.2.1. Mécanismes non enzymatiques.....	8
II.2.2. Mécanismes enzymatiques ( $\beta$ -lactamases).....	9

## *Partie expérimentale*

### *Matériels et méthodes*

I. Milieux utilisés .....	16
---------------------------	----

<b>II. Prélèvement.....</b>	<b>18</b>
<b>III. Isolement.....</b>	<b>18</b>
<b>IV. Purification et identification .....</b>	<b>18</b>
<b>IV.1. Galerie biochimique.....</b>	<b>18</b>
<b>V. Etude de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques .....</b>	<b>20</b>
<b>V.1. Antibiogramme.....</b>	<b>21</b>
<b>V.2. Recherche de la production de la <math>\beta</math>- lactamases (BLSE).....</b>	<b>22</b>
<b>V.2.1. DD-TEST (ou test de synergie).....</b>	<b>22</b>
<b>V.2.2. DD -Test sur gélose à la cloxacilline .....</b>	<b>23</b>
<b>V.3. Recherche de la production des céphalosporinases plasmidiques.....</b>	<b>23</b>

*Résultats et discussion*

<b>I. Caractéristiques de la population.....</b>	<b>24</b>
<b>I.1. Répartition des patients par service .....</b>	<b>24</b>
<b>I.2. Répartition des patients selon le sexe .....</b>	<b>24</b>
<b>I.3. Répartition des patients selon l'âge .....</b>	<b>25</b>
<b>II. Souches bactériennes .....</b>	<b>25</b>
<b>II.1. Répartition des souches par service.....</b>	<b>25</b>
<b>II.2. Répartition des souches par espèce.....</b>	<b>25</b>
<b>II.3. Répartition des souches en fonction de la résistance.....</b>	<b>26</b>
<b>II.3.1. Résistance des souches isolées aux antibiotiques.....</b>	<b>26</b>
<b>II.3.2. Résistance des souches aux <math>\beta</math>-lactamines.....</b>	<b>27</b>
<b>II.3.3. Résistance des souches aux aminosides.....</b>	<b>27</b>

<b>II.3. 4. Résistance des souches aux quinolones (NA) et fluoroquinolones(CIP).....</b>	<b>28</b>
<b>II.3.5. Résistance aux sulfamides.....</b>	<b>28</b>
<b>II.4. Analyse des phénotypes de resistance aux Blactamines.....</b>	<b>29</b>
<b>II.4.1. Recherche de <math>\beta</math>-lactamases à spectre élargi (BLSE).....</b>	<b>29</b>
<b>II.4.2. Recherche de céphalosporinases plasmidiques.....</b>	<b>29</b>
<b>II.4.3. Dédution des phénotypes de résistances aux B-lactamines.....</b>	<b>30</b>
<b>III . Portage intestinal des enterobacteries productrices de BLSE et l'Ampc.....</b>	<b>31</b>
<b>III.1. Répartition des EB-BLSE selon l'espèce.....</b>	<b>31</b>
<b>III.2. Répartition des EB-BLSE et EB-AmpC selon les services.....</b>	<b>32</b>
<b>III. 3. Répartition des EB-BLSE et AmpC selon le sexe.....</b>	<b>32</b>
<b>III. 4. Répartition des EB-BLSE et AmpC a l'admission et a la sortie.....</b>	<b>33</b>
<b>IV. Etude des facteurs de risques influençant la colonisation digestive.....</b>	<b>33</b>
<b>IV.1 Mode d'accouchement .....</b>	<b>33</b>
<b>IV.2. Antibiothérapie.....</b>	<b>34</b>
<b>IV.3. Allaitement.....</b>	<b>35</b>
<b>V. Discussion générale.....</b>	<b>36</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>39</b>
<b>Références bibliographiques</b>	

**Liste des figures**

**Figure 01** : Schéma représentatif des facteurs qui affectent l'établissement de la flore Intestinale chez le nouveau-né.

**Figure 02** : Répartition de la population selon les services.

**Figure 03** : Répartition des patients selon le sexe.

**Figure 04** : Répartition des patients selon l'âge.

**Figure 05** : Répartition des souches isolées selon les services.

**Figure 06** : Répartition des souches par espèce.

**Figure 07** : Résistance globale des souches isolées aux antibiotiques.

**Figure 08** : Taux de la résistance des souches isolées aux B-lactamines.

**Figure 09** : Résistance des souches isolées aux aminosides.

**Figure 10** : Résistances des souches isolées aux quinolones(NA) et fluoroquinolones(CIP).

**Figure 11** : Résistance des souches isolée aux Sulfamides(SXT).

**Figure 12** : Phénotypes de résistance probables pour les enterobacteries isolées.

**Figure 13** : Taux de la répartition des EB-BLSE selon l'espèce.

**Figure 14** : Répartition des EB-BLSE et EB-AmpC selon le service.

**Figure 15** : Répartition des EB-BLSE et EB-AmpC selon le sexe.

**Figure 16** : Répartition des EB-BLSE et EB-AmpC à l'admission et à la sortie.

**Liste des abréviations**

**°C** : Degré celsius.

**AC** : Acide clavulanique.

**ACT**: AmpC type

**AMC**: Amoxicilline-Acide clavulanique.

**AmpC**: Chromosomal located céphalosporinase

**AN**: Amikacine.

**Asn**: Asparagine.

**ATCC**: American Type Cultur Collection.

**ATM**: Aztréonam.

**BEL**: Belgium extended  $\beta$ -lactamase

**BES**: Brazil extended spectrum

**BLSE**: Béta-lactamase à spectre étendu.

**BMR**: Bactéries multirésistantes.

**C1G** : Céphalosporine de première génération.

**C2G** : Céphalosporine de deuxième génération.

**C3G** : Céphalosporine de deuxième génération.

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

**CAU-1** : From *Caulobacter crescentus*

**CAZ** : Ceftazidime.

**CcrA**: Cefotaxin and carbapenem resistant

**CHU**: Centre Hospitalo-universitaire

**CIP** : Ciprofloxacine.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**CMY**:Active on cephamycins

**CphA**: Carbapenem hydrolyzing and first (A)

**CPO** : Cefpirome.

**CTX**: Céfotaxime.

**CTX-M**: Cefotaximase, first isolated at Munich

**DD-test**: Double Disque test

***E. aerogenes***: *Enterobacter aerogenes*

***E.cloacae***: *Enterobacter cloacae*

**EB-BLSE**: Entérobactéries productrices du Béta-lactamase à spectre étendu.

**EB-AmpC**: Entérobactéries productrices d'une céphalosporinase plasmidique.

***E.coli***: *Escherichia coli*

***E.intermedius***: *Enterobacter intermedius*

**EDTA** : Ethylenediamine tetra acetic acid

**FEP**: Céfépime.

**FOX** : Céfoxitine.

**GES**: Guiana extended spectrum  $\beta$ -lactamase

**Gly** : Glycine.

**GN** : Gentamycine.

**GOB**: *Chryseobacterium meningosepticum* class B

**IMI**: Imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase

**IMP** : Imipénème.

**IMP-1**: Imipenemase.

***K.oxycota*** : *Klebsiella oxycota*

***K.pneumoniae*** : *Klebsiella pneumoniae*

**KIA** : Klinger's Iron Agar

**KPC**: *Klebsiella pneumoniae* carbapénèmases

**MDR**: Multidrug Resistance.

**MIR**: Miriam Hospital

**ml** : Millilitre.

**MOX** : Active on moxalactam

**NA** : Acide nalidixique.

**nm** : Nanometre.

**NR** : Nitrate réductase.

**ONPG** : Orthonitrophényl- $\beta$ Dgalactopyranoside

**OXA**: Oxacillinase

***P. aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*.

**PER** : *Pseudomonas* extended resistant

**pH** : Potentiel d'hydrogène.

**PLP**: Protéine de liaison aux pénicillines

**PSE-1** : *Pseudomonas*-specific enzyme

**RM**: Rouge de méthyle.

**Ser**: Serine.

**SFO**: *Serratia fonticola*

**SHV**:Sulfhydryl variable

**SME-1** : *Serratia marcescens* enzyme

**SXT** : Triméthoprime-sulfaméthoxazole.

**TEM**: Temoniera

**TLA**: Tlahuicas Indians

**TZB** : Tazobactam.

**UFC** : Unité formante une colonie.

**VEB** : Vietnamese extended spectrum  $\beta$ -lactamase

**VIM**: Verona integron-encoded metallo-  $\beta$ -lactamase

**VP** : Voges-Proskauer.



**Liste des tableaux**

**Tableau I :** Etapes de l'installation de la flore intestinal et l'origine des germes rencontrés chez les nouveaux-nés.

**Tableau II :** Relation entre la classification moléculaire d'Ambler et celle fonctionnelle.

**Tableau III :** Différentes classes des Carbapénèmases avec leurs profils d'hydrolyse et d'inhibition

**Tableau IV :** Milieux de culture et réactifs utilisés.

**Tableau V :** Critères de distinction entre les différents phénotypes probables produits.

**Tableau VI :** Pourcentage des souches résistantes selon le mode d'accouchement.

**Tableau VII :** Pourcentage des souches résistantes selon l'antibiothérapie.

**Tableau VIII :** Pourcentage des souches résistantes l'allaitement.

**Tableau IX :** Diamètres (mm) des zones d'inhibition du DD-test de quelques souches isolées.

**Tableau X :** Diamètres (mm) des zones d'inhibition du DD-test additionné à la cloxacilline.

**Tableau XI :** Résultats de Test de Hodge Résultats de Test de Hodge pour quelques souches isolées.

Les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines constituent l'un des groupes les plus importants en raison de la diversité des molécules qui la composent, de leur efficacité et de leur faible toxicité (**Cavallo et al., 2004**).

Cependant, l'utilisation massive et parfois abusive de ces antibiotiques, en ville comme à l'hôpital, a modifié considérablement l'écologie microbienne et a conduit à la sélection de souches résistantes tant dans l'environnement que chez l'animal et l'homme (**Faure, 2009**).

Les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération occupent une place importante dans les infections nosocomiales. Ces bactéries deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques et commencent à franchir les limites de l'hôpital pour émerger dans la communauté. Cette résistance est le plus souvent le résultat de l'action des  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent le noyau  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines (**Prère et al., 2004 ; Barbe et al., 2009**).

Les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont retrouvées chez les bacilles à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* et sont couramment identifiées comme des  $\beta$ -lactamases qui confèrent une résistance à l'oxyimino-céphalosporines et les monobactames mais pas aux cephameycines et carbapénèmes, et sont sensibles aux inhibiteurs des  $\beta$ -lactamase (**Oteo et al. 2010**). Après que les pénicillines à large spectre sont développées dans les années 60, la résistance a émergé rapidement à cause des  $\beta$ -lactamases (**Livermore, 2008**). Les BLSE de type TEM et SHV étaient présentes dans 30-50% d'*E.coli* et ont bien établi dans autres entérobactéries dans les années 70 (**Livermore, 2008**). Plus récemment, les enzymes de type CTX-M sont devenues les prédominantes dont la majorité appartient au CTX-M-15 (**Simner et al., 2011**).

La résistance aux antibiotiques est un problème croissant de santé publique car, dans plusieurs espèces pathogènes, certaines souches ne sont plus sensibles qu'à un très faible nombre d'antibiotiques. Chez le nouveau-né, dès la naissance son tractus intestinal est occupé par la flore saprophyte, en maintenant un certain équilibre écologique cette flore inhibent la croissance et le développement des bactéries pathogènes notamment les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (**Guediche, 1990**).

Plusieurs facteurs contribuent à perturber la flore "normale" favorisant ainsi la colonisation des nouveaux-nés par de micro-organismes pathogènes et l'augmentation de l'incidence des infections néonatales acquises principalement nosocomiales. La connaissance

de la flore bactérienne du nouveau-né notamment la flore intestinale et les facteurs pouvant la modifier présente un intérêt capital pour la compréhension des infections nosocomiales du nouveau-né (**Guediche, 1990**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a pour objectif l'évaluation de la colonisation digestive d'entérobactéries productrices de BLSE chez les nouveau-nés et les enfants hospitalisés et la détermination de certains facteurs de risque impliqués dans leur acquisition.

Pour cela, la méthodologie adoptée est la suivante :

- Isolement et identification des souches d'entérobactéries à partir de selles sur une gélose additionnée de céfotaxime ;
- Etude de la sensibilité de ces souches vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines et d'autres familles d'antibiotiques en utilisant l'antibiogramme standard sur gélose Mueller-Hinton ;
- Réalisation du test de synergie pour la recherche de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu avec et sans cloxacilline ;
- Réalisation du test de Hodge pour la recherche des céphalosporinases plasmidiques ;
- Déduction des phénotypes de résistance probables des souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ;
- Détermination de certains facteurs de risque d'acquisition des ces souches par une analyse statistique des données ;

### **I. Portage digestif**

#### **I.1. La flore intestinale**

La flore intestinale ou le microbiote intestinal, représente l'ensemble des bactéries peuplant notre tractus digestif. Sa subsistance est assurée par nos résidus alimentaires, ainsi par la desquamation de nos tissus (**Goulet, 2009**).

Son équilibre résulte d'interactions microbiennes au niveau de l'intestin pour les substrats nutritifs ou les sites d'adhérences et de la modification de l'environnement intestinal par des produits de métabolisme microbien : pH, bactériocines, acide organique, etc. La flore intestinal est indispensable à l'acquisition et au maintien des fonctions digestif (**Cortier, 2007**).

Avant la naissance, le tube digestif est stérile, Mais les substrats nécessaires pour la croissance des espèces humaines de *Bifidobacterium* sont présents dans le méconium à la naissance (**Yazourh et al., 2000**).

#### **I.2. L'établissement de la flore intestinale des nouveau-nés**

La muqueuse du tube digestif du nouveau-né immature quelle soit, subit une myriade de stimulation antigéniques de nature microbienne d'abord, de nature alimentaire (**Orrhage et al., 1999**). Cette succession chronologique permet au cours des premiers mois, non seulement d'initier le processus de défense immunitaire locale, mais aussi d'assurer la tolérance à l'antigène alimentaire. La maturation des mécanismes de tolérance alimentaire semble facilitée par un envahissement bactérien harmonieux (**Orrhage, 1999; Grönlund, 2000**). Les étapes de l'installation de la flore intestinale et l'origine des germes rencontrés chez les nouveaux-nés sont résumées dans le **tableau I**.

**Tableau I :** Etapes de l'installation de la flore intestinal et l'origine des germes rencontrés chez les nouveau-nés (**Langhendries, 2006**).

<b>Phase</b>	<b>Origine des germes rencontrés</b>	<b>Germes rencontrée</b>
<b>La phase I</b>	La flore vaginale et fécale	Germe anaérobie facultatif (streptocoques, Entérobactéries, staphylocoques) Les anaérobies stricts sont très peu fréquents
<b>La phase II</b>	L'alimentation exclusive au sein	Germes anaérobies stricts (bifidobactéries et bactéries lactiques) $10^9$ UFC /ml. Augmentation du nombre d' <i>Escherichia coli</i> et <i>Bacteroides</i> spp
<b>La phase III</b>	Début de la diversification alimentaire	Augmentation parallèle d'entérocoques et de streptocoques et les clostridies. Flore anaérobie stricte plus diversifiée.
<b>La phase IV</b>	L'alimentation et l'hygiène.	Une très grande augmentation de la flore anaérobie stricte dans la partie distale du côlon

**Chez le nouveau-né**, la colonisation du tube digestif est relativement stéréotypée durant les premiers jours. Elle dépend en partie de la composition de la flore vaginale et fécale maternelle où prédominent des germes anaérobies facultatifs, *Escherichia coli* et Entérocoques. Pendant les premières 48 h, cette colonisation est indépendante du type d'alimentation. Elle est retardée chez les enfants nés par césarienne. Dès le 3<sup>ème</sup> jour de vie apparaissent des Bifidobactéries et des Lactobacilles, parallèlement à l'apparition dans une moindre mesure de Bactéroïdes et de Clostridia. L'implantation de cette flore est directement dépendante du type d'alimentation reçue, des conditions environnementales et de la prescription éventuelle d'antibiotiques (**Langhendries et al., 1989**).

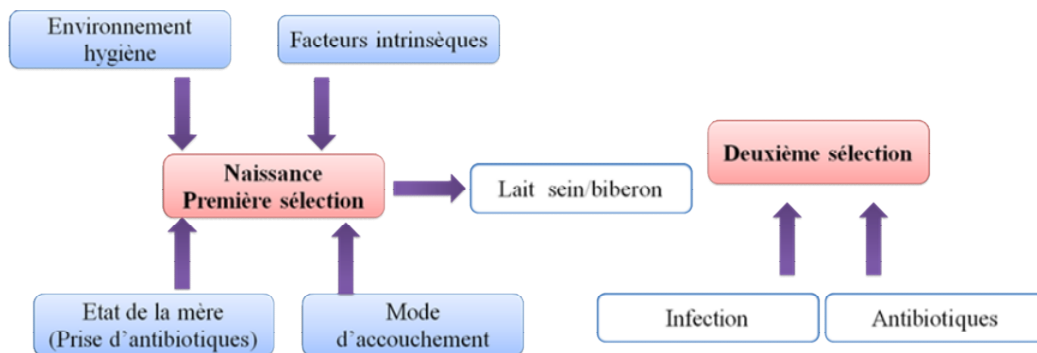
**A la fin du premier mois** des différences très nettes existent dans la composition de la flore intestinale selon le type d'alimentation reçue par le nouveau-né (**Benno et al., 1984 ; Langhendries et al., 1989**). Ainsi, la flore intestinale des enfants allaités est presque exclusivement composée de Bifidobactéries. Cette flore reste relativement constante tant que l'enfant est allaité. Par contre dès que l'alimentation commence à être diversifiée, la

différence entre la flore des enfants nourris au sein et celle des enfants nourris artificiellement s'estompe. Cette modification de flore est caractérisée par une augmentation de la concentration en *Escherichia coli*, *Entérococci* et *Clostridia*. Entre l'âge de 1 an et 2 ans, l'enfant acquiert une flore intestinale du même type que celle de l'adulte (**Campeotto et al., 2007**).

**Le tube digestif de l'adulte** est colonisé par une microflore très importante puisque l'on évalue le nombre de bactéries le colonisant à  $10^{14}$ , implantées essentiellement au niveau colique, avec une diversité extrêmement importante puisque estimées à plus de 400 espèces différentes. La composition taxonomique de cette microflore colique semble être extrêmement stable chez un individu sain, mais très variable d'un individu à l'autre en fonction notamment des habitudes alimentaires. Cette flore résidente est constituée d'une flore dominante, composée à plus de 90% de bactéries anaérobies strictes, au sein de laquelle prédominent les Gram négatif, et d'une flore sous-dominante. *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* font partie de la flore résidente normale, leur abondance est directement fonction de l'ingestion de laitages fermentés (**Cibik et al., 2004**).

### I.3. Les facteurs affectant l'établissement de la flore intestinale chez les nouveau-nés

Il existe en effet de nombreux facteurs qui favorisent l'installation et contribuent à l'équilibre de la flore intestinale (allaitement au lait maternel) (**Lepelletier et al., 2008**). De nombreux éléments (**figure 1**) vont influencer la cinétique d'implantation et la composition de la flore intestinale du nouveau-né parmi lesquels le mode d'accouchement, l'environnement, le type d'alimentation, l'âge gestationnel et l'antibiothérapie (**Campeotto et al., 2007**).



**Figure 1** : Schéma représentatif des facteurs qui affectent l'établissement de la flore intestinale chez le nouveau-né (**Moreau, 2004**).

#### **I.4. La colonisation par les bactéries multi résistantes (BMR)**

La colonisation est la présence de BMR sans signes cliniques ou biologiques d'infection (Ex : *Pseudomonas aeruginosa* et voies aériennes supérieures). Pour qu'une colonisation soit chronique, elle nécessite la présence de plus de  $10^5$  bactéries /ml de liquide intestinal dans le grêle proximale (**Toskes, 1993**). Cette densité fait que l'écosystème intestinal est bien en premier rang en terme de compartiment de sélection et d'amplification des bactéries résistantes aux antibiotiques et des gènes de résistance (**Faure, 2009**). Parmi les espèces potentiellement les plus pathogènes on trouve les entérobactéries et les entérocoques (**Andremont, 1995**).

#### **I.5. Les différentes bactéries multirésistantes du tube digestif**

##### ➤ **Les entérobactéries**

Les entérobactéries, bactéries à Gram négatif, constituent une très grande famille englobant plus de 100 espèces. Le tractus intestinal présente une niche préférentielle de ces germes et peuvent être ainsi d'importantes causes de maladies.

- ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* est un germe commensal du tractus intestinal humain, mais il peut devenir pathogène surtout chez les immunodéprimés (**Costa et al., 2009**). Il est facilement disséminé par l'eau et les aliments. C'est un des plus importants agents d'infections humaines nosocomiales ou communautaires (**Oteo et al., 2008**), notamment extra-intestinales, incriminé le plus souvent dans les infections urinaires (**Kurt Azap et al., 2007**).

- ***Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* appartient à la microflore intestinale humaine, mais aussi colonise le système respiratoire supérieur, comme elle peut subsister dans l'environnement extérieur. C'est un pathogène opportuniste impliqué principalement dans les infections urinaires, pneumonies, septicémies, notamment hospitalières. Le portage de *Klebsiella pneumoniae* est souvent asymptomatique favorisant sa virulence (**Minarini et al., 2008**).

- ***Klebsiella oxytoca***

*Klebsiella oxytoca* est une espèce ubiquiste et commensale de l'homme. Elle est responsable d'infections diverses : infections urinaires, infections respiratoires, infections rénales, bactériémies et des colites aiguës, notamment nosocomiales (**Green et al., 2009**).

- ***Enterobacter cloacae***

En plus d'être un commensal du tube digestif, il est aussi retrouvé dans la nature (eau, sol, les aliments) (**Krzyminska et al., 2010**). C'est un pathogène opportuniste impliqué dans les infections nosocomiales, parfois très sévères. Il cause des infections urinaires, septicémies, méningites, bronchites et des cholécystites (**Sakasaki, 1984**). Il est considéré comme le plus important agent causant l'infections nosocomiale au service néonatalogie (**Gaston, 1988 ; Sander, 1997**).

- ***Serratia marsescens, Citrobacter freundii, Morganella morganii***

Souches typiquement hospitalières, elles sont d'importantes causes d'infections nosocomiales. Ces bactéries sont principalement impliquées dans les infections urinaires, les problèmes respiratoires et contamination des cathéters (**Choi et al., 2007**).

- ***Pseudomonas aeruginosa***

C'est un bacille à Gram négatif, opportuniste car bien qu'il puisse être isolé dans des infections communautaires, il est le plus souvent responsable d'infections nosocomiales. Il est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques et peut acquérir de nombreux mécanismes de résistance grâce à une membrane externe peu perméable et grâce au développement de nombreux mécanismes de résistance (**Berthelot et al., 2005**).



## **II. Résistance aux $\beta$ -lactamines**

### **II.1. Définition de la résistance**

C'est la capacité pour une souche bactérienne de se multiplier dans une concentration d'antibiotique supérieure à celle qui inhibe la majorité des souches appartenant à la même espèce. La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise (**Kiouba, 2002**).

Les bactéries naturellement résistantes sont les bactéries dont tous les représentants au sein de l'espèce sont résistants dans la nature à tel ou tel antibiotique, indépendamment de la présence de celui-ci (**Skurnik et Andremont, 2006**).

Les bactéries possédant une résistance acquise à l'antibiothérapie utilisée sont les bactéries dont les représentants naturels sont sensibles à l'antibiotique mais ont acquis, à partir d'une autre espèce bactérienne, le plus souvent phylogénétiquement proche, un gène qui leur confère une particularité spécifique, celle de ne plus être sensible à l'action de l'antibiotique (**Skurnik et Andremont, 2006**).

### **II.2. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines**

La résistance des bactéries à Gram négatif aux  $\beta$ -lactamines fait intervenir quatre mécanismes différents : imperméabilité de la paroi, modification des protéines liant les pénicillines (PLP), excrétion par systèmes d'efflux et l'inactivation enzymatique par les  $\beta$ -lactamases (**Cattoir, 2008**).

#### **II.2.1. Mécanismes non enzymatiques**

- **Imperméabilité de la paroi**

La perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif dépend principalement des LPS (lipopolysaccharides) et des porines ancrées dans cette membrane. Les LPS sont très compactés en profondeur grâce à ses acides gras insaturés et leur possession pour des charges électriques de surface qui leur permettent d'avoir des structures hydrophiles. Cette organisation explique une résistance naturelle aux antibiotiques hydrophobes et de masse moléculaire élevée (**Barbut et Petit, 2007**). La pénétration des  $\beta$ -lactamines à travers la membrane externe s'effectue par les porines. L'altération des porines par mutation est à

l'origine de résistances acquises aux  $\beta$ -lactamines, soit par une modification structurale d'une porine, soit par une diminution quantitative des porines (**Livermore et Woodford, 2006**).

Chez *Escherichia coli*, deux porines principales sont présentes : OmpF et OmpC. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la diminution de perméabilité s'expliquerait par la perte de la porine OprD2 responsable du transport de l'imipénème (**Ochs et al., 1999**).

- **Modification des PLP (Protéine Liant la Pénicilline)**

Cette modification peut être due à des mutations au niveau de gènes chromosomiques codant pour des PLP normales ou à l'acquisition d'ADN étranger donnant des gènes mosaïques codant pour des PLP ayant une faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines (**Fisher et al., 2005**). Chez les bactéries à Gram négatif, l'altération des PLP n'a été que rarement observée ; elle a été mise en évidence chez *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Niesseria gonorrhoeae* et *Haemophilus influenzae* (**Barbut et Petit, 2007**).

- **Excrétion par systèmes d'efflux**

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par exportations actives grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux, ces pompes d'efflux peuvent être des transporteurs spécifiques et confèrent une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques (comme les pompes d'efflux des tétracyclines). Cependant la plupart de ces transporteurs peuvent prendre en charge des composés de structure très différente et contribuer ainsi de manière significative à la multirésistance (MDR pour *multidrug resistance*) (**Cattoir, 2004**). Les systèmes d'efflux ont été décrits pour la première fois chez les bactéries à Gram négatif comme *E. coli* et *P. aeruginosa* (**Hocquet et al., 2004**), ce système est généralement un complexe protéique avec une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe (**Faure, 2009**).

### **II.2.2. Mécanismes enzymatiques ( $\beta$ -lactamases)**

La production de  $\beta$ -lactamases constitue le principal mécanisme de résistance naturelle et acquise aux  $\beta$ -lactamines, en particulier chez les bactéries à Gram négatif (**Philippon et Arlet, 2006**).

### II.2.2.1. Classification des $\beta$ -lactamases

La classification des  $\beta$ -lactamases est basée sur deux schémas ; celui d'Ambler qui est fondé sur les propriétés moléculaires qui divise les  $\beta$ -lactamases en quatre groupes (de A à D). Les groupes A, C et D, et celui de Bush-Jacoby-Medeiros qui est fondé sur les propriétés fonctionnelles des enzymes (**Ruppé, 2010**).

- **Classification d'Ambler**

Elle a été établie selon la séquence protéique primaire, notamment au niveau du site actif. Elle définit quatre classes d'enzymes désignées A, B, C et D. Les protéines de classe A, C et D sont des enzymes à sérine et les enzymes de classe B correspondent aux métallo-enzymes à zinc.

Schématiquement, les  $\beta$ -lactamases de classe A sont sensibles à l'action de l'acide clavulanique, du sulbactam et du tazobactam. On y trouve la majorité des  $\beta$ -lactamases retrouvées chez *E. coli*, comme TEM, SHV, des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) comme les CTX-M, et des carbapénèmases comme KPC et certains variants de GES (mutation Gly170Ser ou Gly170Asn).

Les  $\beta$ -lactamases de classe B sont principalement des carbapénèmases comme IMP et VIM, elles sont inhibées par l'EDTA.

Les  $\beta$ -lactamases de classe C sont les céphalosporinases de type AmpC, inhibées par la cloxacilline.

Enfin les  $\beta$ -lactamases de classe D sont des oxacillinases, qui constituent une famille extrêmement composite en termes de spectre d'hydrolyse (**Ruppé, 2010**).

- **Mise à jour de la classification fonctionnelle**

La classification fonctionnelle mise à jour dans l'article de Bush et Jacoby, est basée sur la proposition de Bush *et al.*, en 1995. Cette classification inclut le groupe 1 (classe C) des céphalosporinases, le groupe 2 (classe A et D) des  $\beta$ -lactamases à large spectre, des BLSE et des carbapénèmases à sérine et le groupe 3 (classe B) des métallo- $\beta$ -lactamases. Plusieurs nouveaux sous-groupes de chacun des grands groupes sont décrits en fonction du substrat préférentiel de l'enzyme (**Tableau II**) (**Bush et Jacoby, 2010**).

**Tableau II** : Relation entre la classification moléculaire d'Ambler et celle fonctionnelle (**Bush et Jacoby, 2010**).

## Synthèse bibliographique

Groupe de Bush-Jacoby (2009)	Groupe de Bush-Jacoby (1995)	Classe moléculaire d'Ambler	Substrat préférentiel de l'enzyme	Inhibition par		Caractéristiques	Enzymes représentatives
				AC ou TZB	EDT A		
1	1	C	Céphalosporines	Non	Non	- Hydrolyse meilleure des céphalosporines que de la benzylpénicilline; - Hydrolyse des céphamycines	ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Céphalosporines	Non	Non	Hydrolyse accrue de la ceftazidime et souvent autres oxyimino- $\beta$ -lactamines	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Pénicillines	Oui	Non	Hydrolyse meilleure de la benzylpénicilline que des céphalosporines.	PC1
2b	2b	A	Pénicillines et C1G	Oui	Non	Hydrolyse similaire de la benzylpénicilline et des céphalosporines	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Céphalosporines à spectre étendu et monobactames	Oui	Non	Hydrolyse augmentée vis-à-vis des oxyimino- $\beta$ -lactamines	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Pénicillines	Non	Non	Résistance au clavulanate, sulbactam et tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Céphalosporines à spectre étendu et monobactames	Non	Non	- Hydrolyse augmentée vis-à-vis des oxyimino- $\beta$ -lactamines ; - Résistance aux inhibiteurs de $\beta$ -lactamases	TEM-50
2c	2c	A	Carbénicilline	Oui	Non	Hydrolyse meilleure pour la carbénicilline	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbénicilline, céfépime	Oui	Non	Hydrolyse de la carbénicilline, céfépime et ceftiprome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilline	Variable	Non	Hydrolyse de la cloxacilline ou l'oxacilline	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Céphalosporines à spectre étendu	Variable	Non	Hydrolyse de la cloxacilline ou l'oxacilline mais aussi des oxyimino- $\beta$ -lactamines	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapénèmes	Variable	Non	Hydrolyse de la cloxacilline ou l'oxacilline et des carbapénèmes	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Céphalosporines à spectre étendu	Oui	Non	- Hydrolyse des céphalosporines; - Inhibition par le clavulanate mais pas par l'aztréonam	CepA
2f	2f	A	Carbapénèmes	Variable	Non	Hydrolyse des carbapénèmes, oxyimino- $\beta$ -lactamines et céphamycines	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapénèmes	Non	Oui	Hydrolyse à large spectre incluant les carbapénèmes mais pas les monobactames	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapénèmes	Non	Oui	Hydrolyse préférentielle des carbapénèmes	CphA, Sfh-1
NI	4	Inconnu					

## II.2.2.2. Diversité des $\beta$ -lactamases des Entérobactéries

### II.2.2.2.1. $\beta$ -lactamases chromosomiques des entérobactéries

Les  $\beta$ -lactamases chromosomiques sont ubiquitaires chez les entérobactéries, excepté *Salmonella* et *Proteus mirabilis*, mais varient dans la quantité produite, le mode de production et par conséquent dans leur contribution à la résistance aux  $\beta$ -lactamines (**Livermore, 1997**).

- **Les pénicillinases**

Les pénicillinases comme leur nom l'indique, sont principalement actives sur les pénicillines, mais aussi à un degré moindre sur les céphalosporines de 1<sup>er</sup> génération. La plupart des céphalosporines de 3<sup>em</sup>e génération comme la céfotaxime, les céphamycines et les Carbapénèmes présentent peu ou pas d'interaction avec ces pénicillinases (**Acar et Moreillon, 1999**).

*Klebsiella pneumoniae* produit souvent une pénicillinase chromosomique constitutive de type SHV-1, avec un taux de biosynthèse souvent faible. Il en résulte que ces souches ont un bas niveau de résistance aux pénicillines usuelles (**Acar et Moreillon, 1999**).

- **Les céphalosporinases chromosomiques**

Elles sont décrites chez différentes espèces de bacilles à Gram négatif. On distingue les céphalosporinases chromosomiques constitutives et les céphalosporinases chromosomiques inductibles. Les céphalosporinases chromosomiques constitutives, qui s'expriment à très bas niveau chez *E.coli* et *Shigella spp.* (**Courdon et al., 2000**), ne sont pas inductibles et sont exprimées à tellement bas niveau qu'elles ne contribuent pas de façon significative à la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez ces espèces : les souches restent sensibles aux aminopénicillines et aux céphalosporines de première génération. Cependant, les céphalosporinases chromosomiques inductibles, décrites chez de nombreuses espèces d'entérobactéries (*Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Aromonas spp.*), le caractère inductible est défini par le fait que la synthèse des  $\beta$ -lactamases est augmentée temporairement en présence d'une  $\beta$ -lactamine et disparaît avec l'arrêt de l'exposition (**Cavallo et al., 2004**). Ces enzymes sont inhibées par la cloxacilline mais sont insensibles aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (clavulanate, tazobactam et sulbactam) (**Lavigne et al., 2002**).

#### II.2.2.2.2. $\beta$ -lactamases plasmidiques des entérobactéries

- **$\beta$ -lactamases de type BLSE**

Les BLSE ont été décrites pour la première fois en 1983, en Allemagne (**Knothe et al., 1983**). Il n'existe pas de définition consensuelle et précise des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu. Les BLSE sont définies comme des  $\beta$ -lactamases capables de conférer une résistance bactérienne vis-à-vis des pénicillines, des céphalosporines de première, deuxième et troisième génération ainsi que l'aztréonam par hydrolyse de ces antibiotiques. Les BLSE sont sensibles à la présence d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase comme l'acide clavulanique (**Paterson and Bonomo, 2005**). Ce sont des enzymes très épidémiques, ont des caractéristiques et spectres d'activité variés (TEM, SHV, CTX-M, et dérivés) (**Adjidé et al., 2006**).

- **TEM**

Les gènes qui codent pour les  $\beta$ -lactamases de type TEM, d'origine plasmidique, font partie des gènes de résistance les plus disséminés et ce, à travers un grand nombre d'espèces bactériennes (**Roy, 2000**). TEM-1 et TEM-2 sont capables d'hydrolyser les pénicillines et les céphalosporines de première génération, mais elles sont incapables d'attaquer les oxyimino-céphalosporines (**Bradford, 2001 ; Sturenburg et Mack, 2003**). Par la suite des BLSE de types TEM ont été décrites qui dérivent de TEM-1 et TEM-2 par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés (**Ruppé, 2010**).

- **SHV**

Le gène *bla<sub>SHV</sub>* a probablement évolué comme un gène chromosomique chez *Klebsiella* puis a été incorporé ultérieurement dans un plasmide qui s'est ensuite propagé vers d'autres espèces d'entérobactéries (**Livermore, 1998**). La  $\beta$ -lactamase SHV1 est rencontrée le plus souvent chez *K. pneumoniae* et elle est responsable d'environ 20% des résistances plasmidiques à l'ampicilline chez cette espèce (**Bradford, 2001**). Comme dans le cas des enzymes de type TEM, les enzymes de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1 (**Ruppé, 2010**).

- **CTX-M**

Ce sont des  $\beta$ -lactamases de classe A qui tiennent leur nom de par leur hydrolyse préférentielle du céfotaxime par rapport à la céftazidime (CTX) et «M» pour leur lieu

d'isolement (Munich). Elles n'hydrolysent ni les céphamycines ni les carbapénèmes. Certains variants de CTX-M ont une activité augmentée sur la céftazidime : les CTX-M-32, -15, -16 et -27 dérivent respectivement des CTX-M-1, -3, -9 et -14 suite à une mutation Asp240Gly (**Baraniak et al., 2002**). On compte aujourd'hui plus de 90 CTX-M ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)), réparties en cinq familles. 3, CTX-M-10 et CTX-M-15. Le groupe CTX-M-2 les CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7 et TOHO-1. Le groupe CTX-M-8 comporte CTX-M-8 et CTX-M-40. Le groupe CTX-M-9 comporte CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-17, CTXM-19, CTX-M-21, CTX-M-27 et TOHO-2. Enfin le groupe 25 comporte CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-41 et CTX-M-55. Il est accepté que l'origine des CTX-M dérive des  $\beta$ -lactamases chromosomiques des espèces de *Kluyvera*. Au niveau structural, les CTX-M ne font pas partie des  $\beta$ -lactamases de type TEM ou SHV (< 40 % d'identité) (**Ruppé, 2010**).

### ➤ OXA

L'enzyme OXA-1 est la première décrite et elle est de loin l'oxacillinase la plus répandue chez les entérobactéries, en particulier chez *E. coli* et parfois retrouvée chez *P. aeruginosa*. Elle confère de faibles niveaux de résistance aux pénicillines, sans rétablissement significatif par l'acide clavulanique (**Cavallo et al., 2004**). Bien que les BLSE appartiennent le plus souvent à la classe A, plusieurs oxacillinases (classe D) ont des propriétés de BLSE. Les  $\beta$ -lactamases de type OXA, hydrolysant particulièrement l'oxacilline, peu inhibées par l'acide clavulanique sont rencontrées essentiellement chez *Pseudomonas* mais aussi chez les entérobactéries (**Livermore, 1995**).

### • Autres types de BLSE

Au moment où tous les isolats cliniques sont producteurs de BLSE de types TEM, SHV ou CTX-M, plusieurs autres BLSE qui ne sont liées à aucune des enzymes précédentes ont été rapportées. Des exemples incluant les types SFO, BES, BEL, TLA, GES, PER et VEB. Ces enzymes ne sont pas des dérivées par simple mutation ponctuelle d'aucune des  $\beta$ -lactamases connues et leur origine est inconnue, excepté pour SFO-1. Elles sont nommées les BLSE mineures ou les BLSE rares (**Gniadkowski, 2008**).

### • Céphalosporinases

Les plasmides codants pour les céphalosporinases ont été connus depuis 1989. Les exemples d'AmpC plasmidiques incluent ACC-1, CMY-1, CFE-1, FOX-1, MIR-1, LAT-1 et MOX-1. La majorité des AmpC plasmidiques est constitutive et a des propriétés similaires aux  $\beta$ -lactamases chromosomiques de classe C. D'autres enzymes AmpC plasmidiques inductibles ont été rapportées chez des souches de *K. pneumoniae* de type ACT-1, DHA-1 et DHA-2 (Jacoby, 2009). Les souches produisant une AmpC plasmidique sont résistantes aux aminopénicillines, carboxypénicillines, ureidopénicillines, céphalosporines de troisième génération, céphamycines et aztréonam (Jacoby, 2009).

- **Carbapénèmases**

Les Carbapénèmases représentent la famille la plus versatile des  $\beta$ -lactamases, avec un spectre large supérieur à celui des autres enzymes hydrolysant les  $\beta$ -lactamines (Queenan et Buch, 2007). Ces enzymes sont une source de préoccupation considérable, car elles sont actives non seulement sur les oxymino-céphalosporines et les céphamycines mais aussi sur les carbapénèmes (Jacoby et Munoz-price, 2005 ; Bassetti *et al.*, 2008). Elles appartiennent à deux familles moléculaires qui se distinguent par leur mécanisme d'hydrolyse et leur site actif : les carbapénèmases à serine et les carbapénèmases à zinc (Queenan et Buch, 2007).

Les carbapénèmases responsables des CMI élevées aux carbapénèmes appartiennent aux trois classes des  $\beta$ -lactamases : la classe A, la classe B et la classe D (Moland *et al.*, 2008). Le tableau III résume les différentes classes des Carbapénèmases.

**Tableau III** : Différentes classes des Carbapénèmases avec leurs profils d'hydrolyse et d'inhibition (Queenan et Buch, 2007).

Classe moléculaire	Groupe fonctionnel	Enzymes	Profil d'hydrolyse					Profil d'inhibition	
			Pénicillines	C1G et C2G	C3G et C4G	Aztréonam	Carbapénèmes	EDTA	Acide clavulanique
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	.	+
		IMI	+	+	+	+	+	.	+
		SME	+	+	+	+	+	.	+
		KPC	+	+	+	+	+	.	+
		GES	+	+	+	.	#	.	+
B	3	IMP	+	+	+	.	+	+	.
		VIM	+	+	+	.	+	+	.
		GIM	+	+	+	.	+	+	.
		SPM	+	+	+	.	+	+	.
D	2d	OXA	+	+	#	.	#	.	#



Cette étude est réalisée au niveau de laboratoire de bactériologie médicale de l'hôpital d'Amizour et celui de la clinique de Targa ouzemour (wilaya de Bejaia), durant une période de 3 mois. Allant de premier Mars au premier juin, elle a concerné les nouveaux nés hospitalisés au niveau du service de néonatalogie de la clinique de Targa ouzamour ainsi que les enfants hospitalisés au niveau de service pédiatrie d'hôpital d'Amizour.

Un questionnaire (**Annexe I**) est soigneusement rempli d'après le dossier du malade, les informations sont recueillies auprès du personnel soignant ainsi qu'auprès du garde malade, afin de recueillir certaines informations susceptibles d'être utiles pour l'identification des facteurs de risque qui influencent l'apparition des souches résistances.

### **I. Milieux utilisés**

L'ensemble des milieux de culture et des réactifs utilisés durant cette étude sont donnés dans le **tableau IV**. La composition de ces milieux est donnée en **Annexe II**.

**Tableau IV** : Milieux de culture et reactifs utilisés.

<b>Milieux</b>	<b>Utilisation</b>
<b>Gélose nutritive</b>	Repiquage et conservation des souches isolées
<b>Bouillon nutritif additionné du Céfotaxime (4µg/ml), et du Vancomycine (16 µg/ml)</b>	Isolement de souches d'entérobactéries résistantes au Céfotaxime et inhibition des bactéries à Gram positif
<b>Citrate de Simmons</b>	Etude de l'utilisation du citrate comme seule source du carbone
<b>Gélose Mueller-Hinton</b>	Réalisation d'un antibiogramme standard

<b>Mannitol-mobilité</b>	Etude de l'utilisation du mannitol et de la mobilité
<b>KIA</b>	Etude de l'utilisation de glucose, lactose, production du gaz (CO <sub>2</sub> ou H <sub>2</sub> ) et d'H <sub>2</sub> S
<b>Eau physiologique</b>	Préparation des suspensions
<b>Gélose Hektoen</b>	Isolement des Entérobactéries
<b>Mac Conkey</b>	Repiquage des souches isolées et test de Hodge
<b>Urée-indole</b>	Etude de la production d'uréase et d'indole
<b>Clark et Lubs</b>	Etude du type fermentaire
<b>Bouillon nitraté</b>	Recherche de la nitrate réductase
<b>Réactifs</b>	<b>Utilisation</b>
<b>Réactif du Kovacs</b>	Révélant de la production d'indole
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Recherche de la catalase
<b>VP I et VP II</b>	Révélant de la formation d'acétoïne
<b>RM</b>	Révélant de la formation d'acides mixtes
<b>NR I et NR II</b>	Révélant de la nitrate réductase
<b>Poudre de zinc</b>	Confirmation du test de nitrate réductase
<b>Violet de Gentiane + Lugol + Fushine + alcool</b>	Coloration du Gram
<b>L'huile à immersion</b>	Observation microscopique à l'objectif ×100
<b>Disque d'ONPG</b>	Révélant de la fermentation du lactose

## **II. Prélèvement**

Nous avons effectués des écouvillonnages rectaux chez les nouveaux-nés à l'admission et à la sortie de l'établissement hospitalier. Dans le cas des enfants et des mamans (Témoin), nous avons distribués des écouvillons aux mamans en prenant soin d'expliquer les consignes et les précautions d'usage lors du prélèvement. Le prélèvement peut être conservé au maximum une nuit à 4°C afin d'éviter la dessiccation et la prolifération des bactéries et levures commensales (**Kurkdjian et Bingen, 2007**). Les prélèvements effectués dans cette étude sont à visé écologique.

## **III. Isolement**

Les écouvillons sont ensemencés dans du bouillon nutritif additionné de deux antibiotiques : Céfotaxime (**4µg/ml**), dans le but de sélectionner les souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ; et la Vancomycine (**16 µg/ml**), pour éliminer les bactéries à Gram positif. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h. Les cultures positives (trouble) sont isolées sur milieu Hektoen.

## **IV. Purification et identification**

Après 24h d'incubation, on examine l'aspect des colonies ayant poussées sur la gélose Hektoen ou Mc conkey. Si la culture est poly microbienne, des repiquages successifs sont effectués sur le même milieu afin de purifier les souches. Une fois la culture est pure, on procède à l'identification de la souche en réalisant la coloration de Gram, la recherche de la catalase, l'oxydase et l'utilisation d'une galerie biochimique.

### **IV.1. Galerie biochimique**

#### **➤ Utilisation du glucose, lactose et production de gaz et d'H<sub>2</sub>S**

On prépare une suspension bactérienne en dissociant quelques colonies dans 2 ml d'eau physiologique, puis on ensemence la pente du milieu KIA par stries et le culot par piqûre centrale. On incube à 37°C pendant 24 h, le bouchon ne doit pas être trop vissé (pour éviter l'accumulation du CO<sub>2</sub>). La lecture des résultats se fait comme suit :

- Fermentation du lactose positive : virage au jaune de la pente.

- Fermentation du glucose positive : virage au jaune au culot de tube.
- Production de gaz : apparition de bulles et craquement de la gélose.
- Production d'H<sub>2</sub>S : noircissement du milieu.

➤ **Recherche du nitrate réductase**

A partir de la suspension bactérienne, on ensemence un bouillon nitraté à l'aide d'une pipette pasteur. Après incubation à 37°C pendant 24 h, on ajoute quelques gouttes de réactifs NRI et NRII au bouillon nitraté.

Après 24heurs d'incubation, on ajoute quelques gouttes des réactifs NR1 et NR2, une nitrate réductase positive se traduit par l'apparition d'une coloration rouge. Si le test est négatif, on ajoute la poudre de zinc (réducteur des nitrates), une réaction négative se traduit par le virage du milieu au rouge (présence des nitrates).

➤ **Mannitol mobilité**

L'étude de la mobilité et de la fermentation du mannitol est effectuée sur le milieu Mannitol-mobilité. L'ensemencement du milieu est réalisé par piqûre centrale à partir de la suspension bactérienne.

- La fermentation du mannitol se traduit par un virage au jaune de la couleur du milieu.
- Si la souche est mobile, il apparaît une diffusion de part et d'autre de la piqûre centrale.

➤ **Utilisation de Citrate**

Ce test permet l'étude de l'utilisation du citrate comme seul source de carbone. Il est réalisé sur le milieu citrate de Simmons.

L'ensemencement est réalisé à partir d'une colonie par une strie longitudinale de la pente. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 h jusqu'à 7 jours au maximum.

L'utilisation du citrate se traduit par :

- Virage de couleur du milieu au bleu.
- Pousée de colonies sur la pente.

➤ **Etude de type fermentaire**

Chez les bactéries aérobies facultatives, la fermentation du glucose conduit à la production soit :

- De nombreux acides, par la voie des fermentations acides mixtes qui sont mis en évidence par le test RM (Rouge de méthyle).
- D'acétoïne produit par fermentation butane-diolique qui est mis en évidence par le test VP (Voges-Proskauer).

On ensemence quelques millilitres du milieu Clark et Lubs avec la suspension bactérienne. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 h.

Au terme de la période d'incubation, on divise le contenu du milieu en deux tubes :

➤ **Test VP (Voges-Proskauer)**

On ajoute 0,5 ml du réactif VPI et 0,5 ml du réactif VP II. En suite on chauffe avec précaution sur la flamme d'un bec Bunsen jusqu'à commencement de l'ébullition, puis on agite.

Une coloration rouge cerise indique une réaction de VP positive.

➤ **Test RM (rouge de méthyle)**

On ajoute 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle, la lecture est immédiate, un virage au rouge indique une réaction RM positive.

➤ **Recherche d'uréase, production d'indole.**

A partir de la suspension bactérienne, On ensemence un milieu urée-indole et on incube à 37°C pendant 24 h. La présence d'une uréase se traduit par le virage de la couleur du milieu au rose ou rouge.

La révélation de la production d'indole est réalisée en ajoutant quelques gouttes de réactif de Kovacs, l'apparition d'un anneau rouge indique la production d'indole.

**V. Etude de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques**

Nous avons testé la sensibilité des souches d'entérobactéries isolés vis-à-vis différents  $\beta$ -lactamines, ainsi qu'à d'autres antibiotiques par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Muller Hinton, selon les recommandations du comité Français de

l'antibiogramme de la société française de microbiologie (**communiqué du CA SFM, 2010**).

### **V.1. Antibiogramme**

#### ➤ **Milieu**

Nous avons utilisé la gélose Mueller Hinton préparée au laboratoire, L'épaisseur de la gélose est de 4 mm (20ml).

#### ➤ **Inoculum**

A partir d'une culture pure de 18-24h sur gélose nutritif, des colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile et bien homogénéisées. L'opacité de l'inoculum doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop dense (**Rahal et al, 2008 ; communiqué du CFA-SFM, 2010**).

#### ➤ **Ensemencement**

Un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne diluée au 1/10, puis essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de décharger le maximum.

Ensuite, l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrés. L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et passant sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de petri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (**Communiqué du CA-SFM, 2010**).

#### ➤ **Application des disques d'antibiotiques :**

Chaque disque d'antibiotique (Bioanalyse, BioRad) est déposé à l'aide d'une pince afin de s'assurer son application. Le disque, une fois déposé, ne doit pas être

déplacé. La liste des d'antibiotiques testés est donnée dans le **tableau V (Communiqué du CA-SFM, 2010)**.

**Tableau V** : Liste des antibiotiques testés.

<b>Famille</b>	<b>Antibiotique</b>	<b>Abréviation</b>	<b>Charge du disque</b>
<b>Bétalactamines</b>	Ceftazidime	CAZ	30 µg
	Céfotaxime	CTX	20/ 10 µg
	Amoxicilline-Acide clavulanique	AMC	30 µg
	Aztréonam	ATM	30 µg
	Cefpirome	CPO	30 µg
	Céfépime	FEP	30 µg
	Imipénème	IMP	10 µg
	Céfoxitine	FOX	30 µg
<b>Quinolones</b>	Acide nalidixique	NA	30 µg
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacine	CIP	5 µg
<b>Aminosides</b>	Amikacine	AN	30 µg
	Gentamycine	GN	15 µg
<b>Sulfamide</b>	Triméthoprime-sulfaméthoxazole	SXT	1.3 /24 µg

## **V.2. Recherche de la production de la $\beta$ - lactamases (BLSE)**

### **V.2.1. DD-TEST (ou test de synergie)**

La production d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) a été détectée par l'épreuve de la synergie qui consiste à placer des disques de Céfotaxime et de Ceftazidime (30 µg chacun) à une distance de 30 mm (centre à centre) d'un disque d'Augmentin (Amoxicilline–Acide clavulanique) (20 µg et 10µg, respectivement). L'augmentation de la

zone d'inhibition entre le disque d'Augmentin et le disque de Ceftazidime, Céfoxitine indique la production d'une BLSE (Jarlier *et al.*, 1988).

### **V.2.2. DD -Test sur gélose à la Cloxacilline**

Chez les souches naturellement productrices de céphalosporinase telle que *Enterobacter sp*, la présence d'une BLSE peut être masquée du fait de l'induction de la céphalosporinase par le clavulanate. Dans ce cas, nous avons refait le DD-test en utilisant la gélose Mueller Hinton additionnée de Cloxacilline (250 µg/ml) dans le but d'inhiber l'activité céphalosporinasique. La comparaison des diamètres d'inhibition entre les boites avec et sans Cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE. La souche est dite hyperproductrice de céphalosporinase lorsque les diamètres des zones d'inhibition autour des disques sont  $\geq 5\text{mm}$  (Drieux *et al.*, 2008).

### **V.3. Recherche de la production des céphalosporinases plasmidiques**

La production de céphalosporinases plasmidique est systématiquement recherchée chez les souches qui ne sont pas naturellement productrices, qui sont résistantes ou de sensibilité diminuée à la Céfoxitine. Dans cette étude, nous avons utilisé le test de Hodge (image en trèfle) pour la détection de ces enzymes.

Une boîte de Mac conkey a été inoculée avec la souche *E.coli ATCC 25922* (multisensible). Un disque de Céfoxitine est appliqué au centre de la gélose. Une nouvelle fois, cette même souche estensemencée en strie radiale sur cette même boîte du centre vers la périphérie. De la même manière, sontensemencées la souche témoin positif et la souche à tester, l'incubation est réalisée à 37°C/24h. La présence d'une déformation de la zone d'inhibition autour de la souche à tester indique la production d'une céphalosporinase.



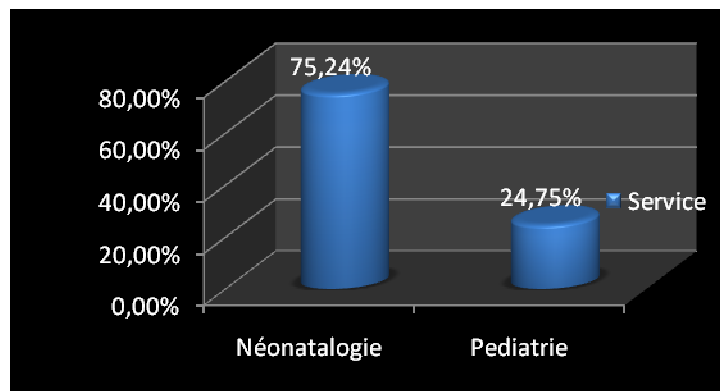
Cette étude s'est déroulée dans le laboratoire d'analyse médicale de l'hôpital d'Amizour et celui de la maternité de Targa ouzamour de Bejaia durant une période de 90 jours. Elle a été réalisée auprès de 202 patients dont 109 nouveaux-nés, 50 enfants et 43 mamans des nouveaux-nés.

Nous avons isolé 236 bacilles à Gram négatif dont 225 souches d'entérobactéries et 11 souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

### I. Caractéristiques de la population

#### I.1. Répartition des patients par service

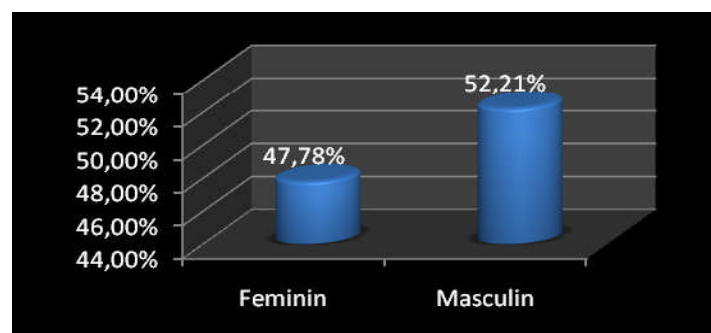
La répartition des patients enquêtés par service est donnée dans la **figure 02**. Le taux le plus élevé est enregistré dans le service de néonatalogie (**75,24 %**).



**Figure 02** : Répartition de la population selon les services.

#### I.2. Répartition des patients selon le sexe

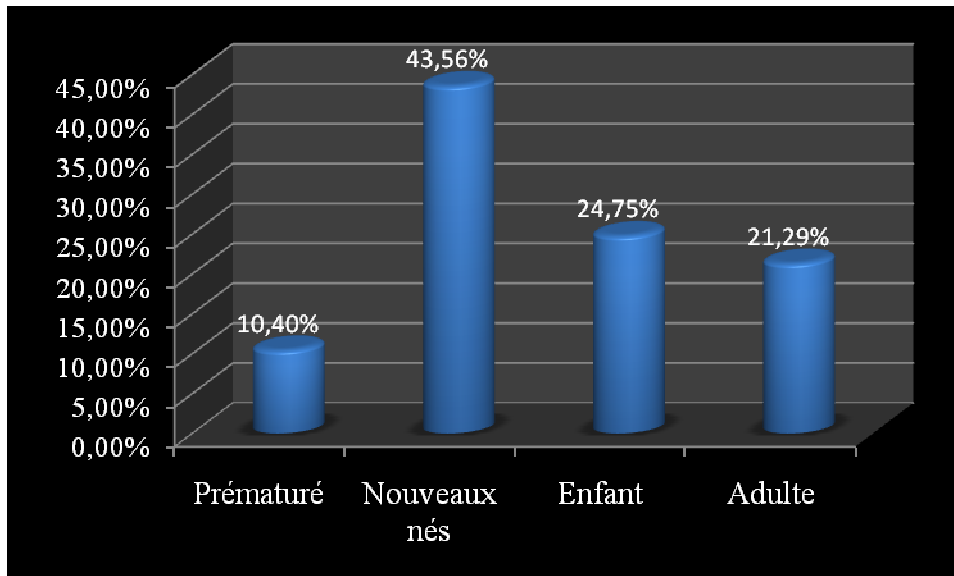
Le nombre des prélèvements effectués n'est pas homogène chez les deux sexes (masculin 52,21%, féminin 47,78%). Cette différence est due au taux élevé de patients de sexe masculin hospitalisé durant la période de l'étude. Les résultats obtenus sont résumés dans la **figure 03**.



**Figure 03** : Répartition des patients selon le sexe.

### I.3. Répartition des patients selon l'âge

La répartition des patients en fonction de l'âge est montrée dans la **figure 04**.

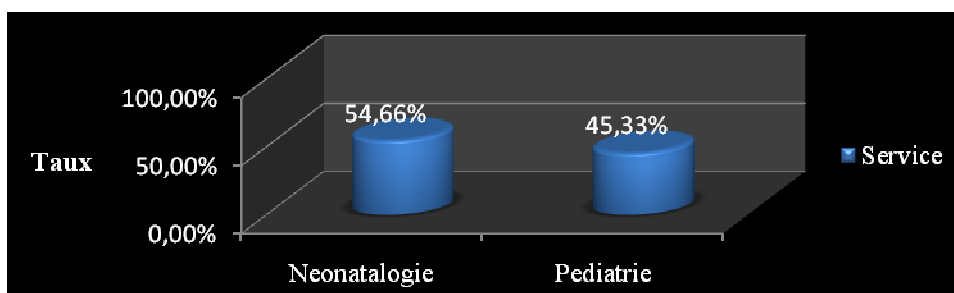


**Figure 04** : La répartition des patients selon l'âge.

## II. Souches bactériennes

### II.1. Répartition des souches par service

La répartition des souches d'entérobactéries isolées par service est donnée dans la **figure 05**. On note que les souches sont le plus souvent isolées dans le service de néonatalogie avec un taux de 54,66% (129/236) des souches isolées.



**Figure 05** : Répartition des souches isolées selon les services.

### II.2. Répartition des souches par espèce

L'espèce la plus fréquemment isolée est *E. coli* avec un taux de 24,57 % (58/ 236). La répartition des souches isolées par espèce est résumée dans la **figure 06**.

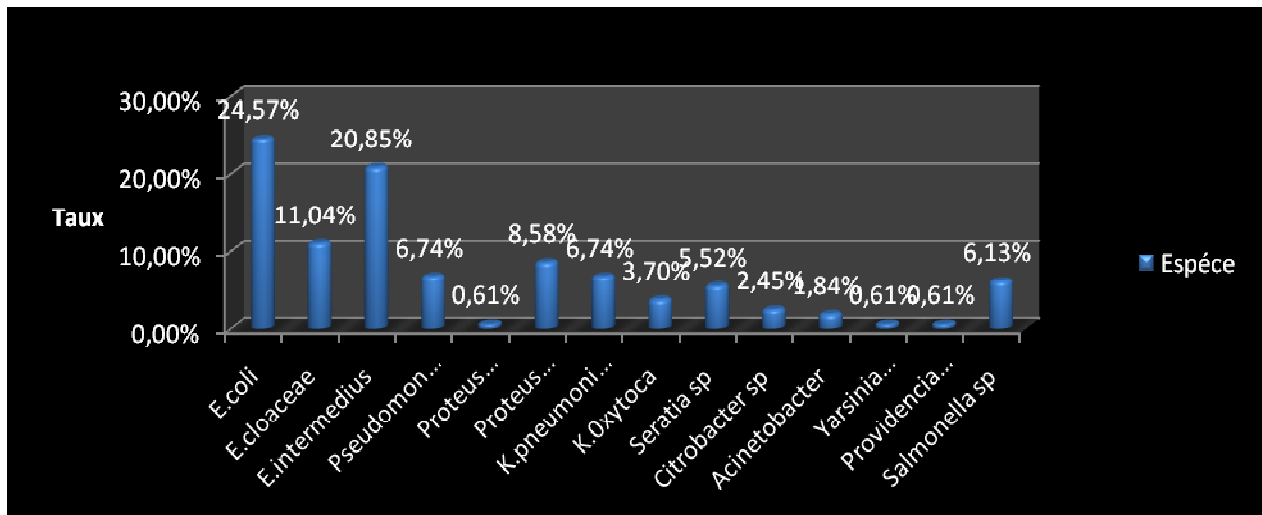
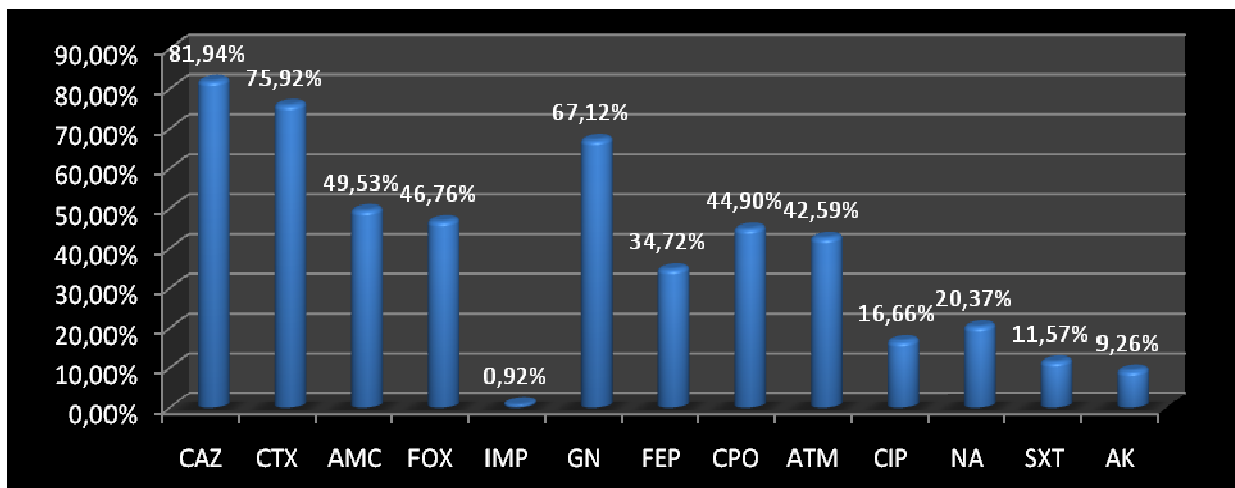


Figure 06 : Répartition des souches par espèce.

### II.3. Répartition des souches en fonction de la résistance

#### II.3.1. Résistance des souches isolées aux antibiotiques

La figure 07 montre le taux de résistance globale de l'ensemble des souches vis-à-vis des antibiotiques testés. On note que le taux de résistance le plus élevé est enregistré pour la CAZ avec un pourcentage de 81,94%, suivi par CXT avec un taux de 75,92%. Il est à noter que la plus faible résistance soit vis-à-vis l'IMP avec 0,92%.

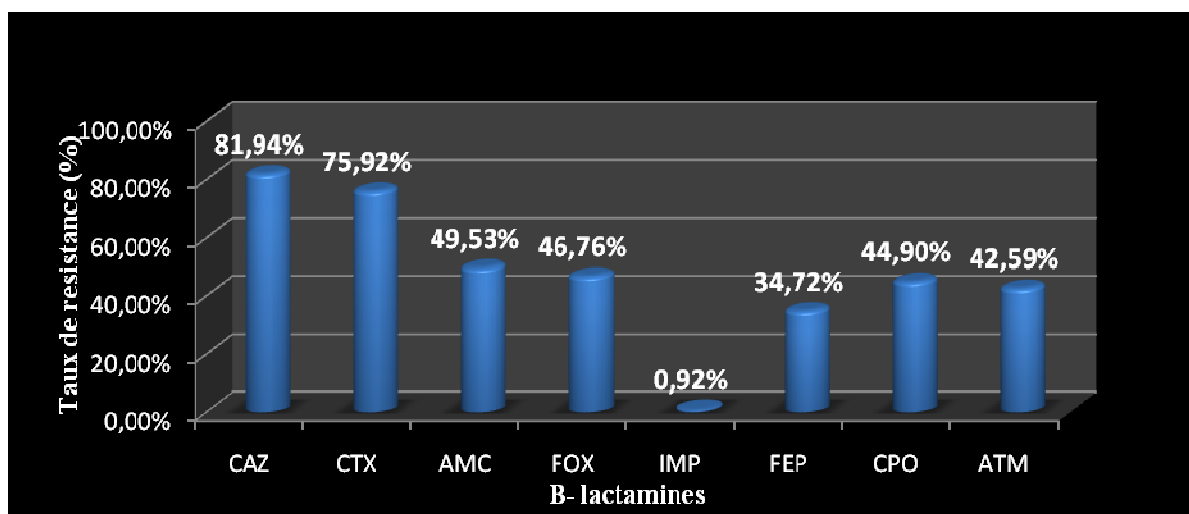


CAZ : céftazidime, CTX : Céfotaxime, AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique, FOX : Céfoxitine, IMP : Imipénème, GN : Gentamycine, FEP : Céfépime, CPO : Cefpirome, ATM : Aztréonam, CIP : Ciprofloxacine, NA : Acide nalidixique, SXT : Triméthoprime-sulfaméthoxazole, AK : Amikacine.

Figure 07 : Résistance globale des souches isolées aux antibiotiques.

### II.3.2. Résistance des souches aux $\beta$ -lactamines

Les résultats des antibiogrammes effectués sur les 236 souches isolées (**figure 08**), ont montré que ces dernières sont résistantes aux céphalosporines de troisième génération (céfotaxime et /ou céftazidime). Sur les 236 souches, 81,94% sont résistantes à la CAZ et 75,92% sont résistantes au CTX. Une résistance moyenne est obtenue avec de l'AMC et de la FOX avec des taux respectifs de 49,53% et de 46,76%. Il est à noter que 0,92% des souches sont résistantes à l'IMP.

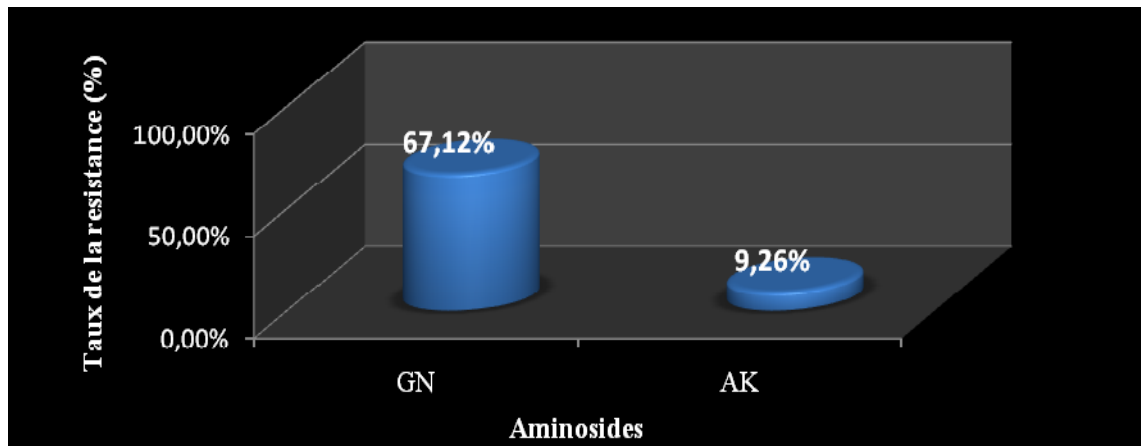


CAZ : céftazidime, CTX : Céfotaxime, AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique, FOX : Céfoxitine, IMP : Imipénème, FEP : Céfépime, CPO : Cefpirome, ATM : Aztréonam,

**Figure 08** : Taux de la résistance des souches isolées aux  $\beta$ -lactamines.

### II.3.3. Résistance des souches aux aminosides

Concernant les aminosides, deux antibiotiques sont testés, la gentamycine (GN) et l'amikacine (AK). Les taux de résistance obtenus pour ces deux antibiotiques sont respectivement 67,12% et 9,26% (**figure 09**).

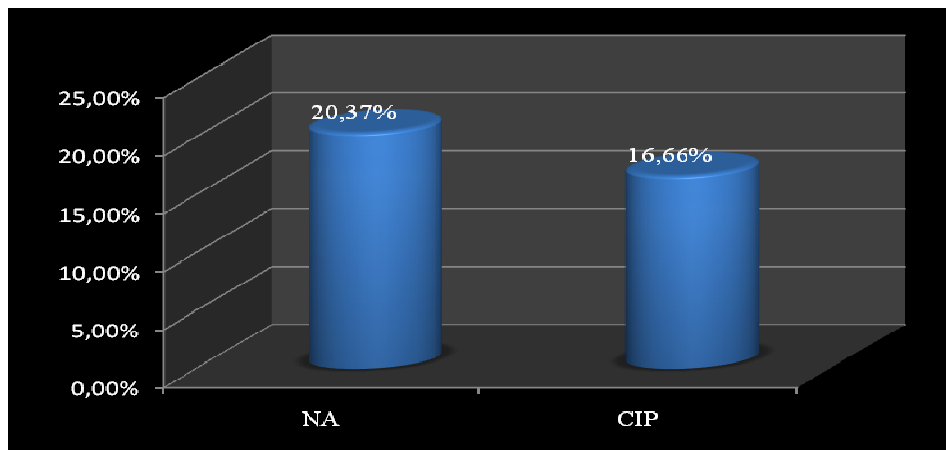


**Figure 09** : La résistance des souches isolées aux aminosides.

#### **II.3. 4. Résistance des souches aux quinolones (NA) et fluoroquinolones(CIP)**

Parmi les souches isolées, 16,66% de souches ont été retrouvées résistantes à l'acide nalidixique (NA) (**figure 10**).

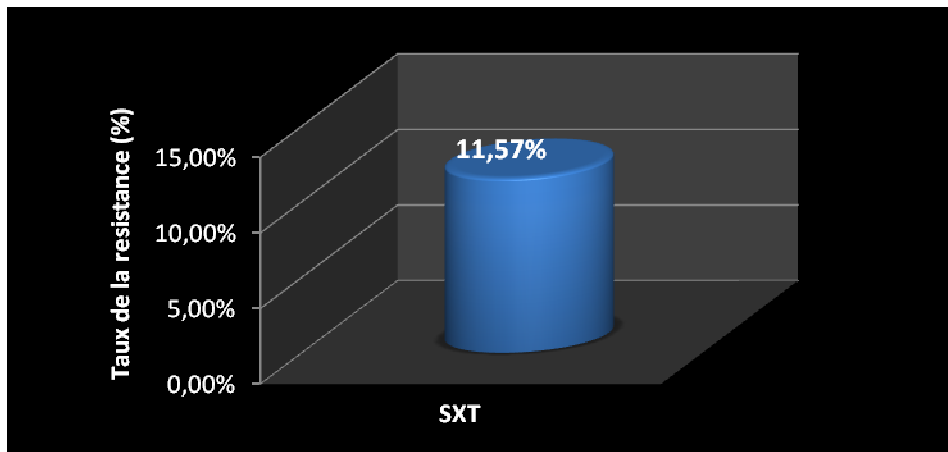
Les résultats obtenus montrent un taux de résistance de 20,37% vis-à-vis la Ciprofloxacine (CIP) (**figure 10**).



**Figure 10** : Résistance des souches isolée aux quinolones (NA) et fluoroquinolones(CIP).

#### **II.3.5. Résistance aux sulfamides**

Les résultats obtenus montrent que les souches d'entérobactéries testées sont résistantes au Sulfaméthoxazol-triméthoprime (SXT) avec un taux de 11,57% (**figure 11**).



**Figure 11** : Résistance des souches isolée aux Sulfamides (SXT).

## II.4. Analyse des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

### II.4.1. Recherche de $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE)

- **DD-test**

Toutes les souches ont été testées pour la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu. Le DD-test était positif avec 31,77% des souches. La valeur supérieure était observée pour *E.coli* (35%), et la valeur inférieure était marquée pour *Enterobactere cloaceae* (1,61%).

Les résultats de DD-test de quelques souches qui ne possèdent pas une céphalosporinase chromosomique sont résumés dans **Annexe IV Tableau IX**.

- **DD-Test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline**

Quelques souches qui ont montrée une résistance vis-à-vis la FOX, et ne présentent pas une image de synergie ont été sélectionnées pour le DD-test avec la cloxacilline. AN 70 AM18, BN<sub>1</sub>04, BN106, BN108, BM112, BN12, BN154, BN157, BN11, AN 66, ce test était négatif avec le reste des souches. Les résultats sont résumés dans le **Tableau X, Annexe IV**.

### II.4.2. Recherche de céphalosporinases plasmidiques

- **Test de Hodge**

Le test de Hodge effectué pour les souches qui présentent une résistance acquise à la céfoxitine. 09 souches productrices de céphalosporinases plasmidiques ont été isolées durant cette étude.les résultats sont consignés dans le **Tableau XI, Annexe IV**.

### II.4.3. Déduction des phénotypes de résistances aux $\beta$ -lactamines

Lors d'un antibiogramme, l'utilisation d'antibiotiques marqueurs de résistance permet de mettre en évidence un mécanisme biochimique de résistance. L'interprétation de l'antibiogramme, consiste sur la base de ces mécanismes, à déduire à quelles autres molécules la bactérie testée est résistante : c'est l'établissement du phénotype de résistance.

La déduction des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines testées a été basée sur les critères suivants :

- La résistance naturelle de la souche aux  $\beta$ -lactamines.
- Résistance au CTX et/ou CAZ (résistance aux deux molécules ou à une seule molécule seulement).
- Résistance aux C4G.
- Présence ou absence d'image de synergie.

A partir des critères cités au préalable, le **tableau V** déterminant les différents phénotypes de résistance probable a été établi.

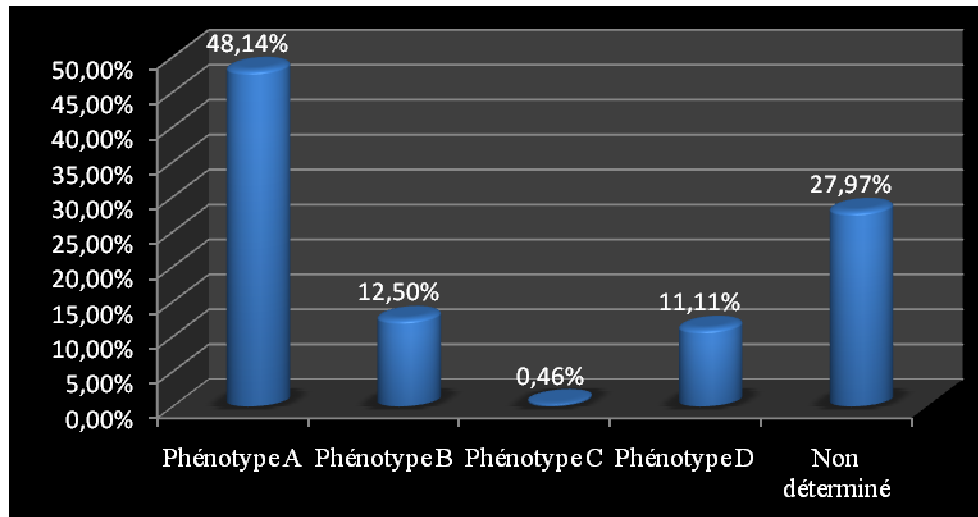
**Tableau V:** Critères de distinction entre les différents phénotypes probables produits (Bonnet et al., 2006 d'après Aissou, 2007).

	<b>CTX</b>	<b>CAZ</b>	<b>C4G</b>	<b>Synergie</b>	<b>Phénotype</b>
<b>CTX-M-15, -16, -27 ou -55</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	Présence ou Absence	<b>A</b>
<b>BLSE autres que les CTX-M (TEM – SHV- ...)</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	Présence	<b>B</b>
<b>BLSE de type ceftazidimase</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	Présence	<b>C</b>
<b>Hyperproduction de cephalosporinases</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	Absence	<b>D</b>

R : résistant . S : sensible .

D'après la **figure 12**, on note que le phénotype A qui correspond aux BLSE de type CTX-M15, -16, -27ou -55 est le plus fréquemment retrouvé avec un taux de 48,14 %, suivi par le phénotype B qui correspond aux BLSE autres que les CTX-M (TEM, SHV) avec un taux de 12,50%.

Le phénotype D qui correspond à l'hyperproduction de céphalosporinase est retrouvé avec un taux de 11,11%. Il est à noter que le phénotype C qui correspond à la production de BLSE de type céftazidimase est retrouvé avec un taux de 0,46%. 27,97% des souches résistantes au CTX et/ou CAZ ne correspondent à aucun de ces phénotypes.

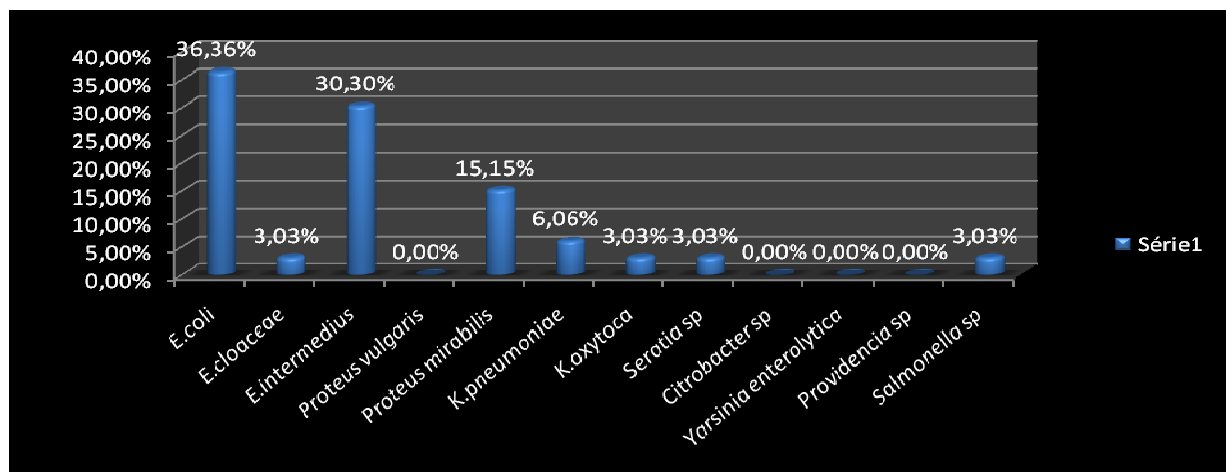


**Figure 12 :** Phénotypes de resistance probables pour les enterobacteries isolées.

### III. Portage fécal des enterobacteries productrices de BLSE et de l'AmpC

#### III.1. Répartition des EB-BLSE et EB-AmpC selon l'espèce

*E. coli* productrice de BLSE est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un pourcentage de 36,36%. Les autres EB-BLSE se présentent avec les pourcentages suivants : 15,15% *Proteus mirabilis*, 6,06% *K. pneumoniae* et 3,03% pour *Salmonella sp*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* et *Serratia sp* (**Figure 13**).

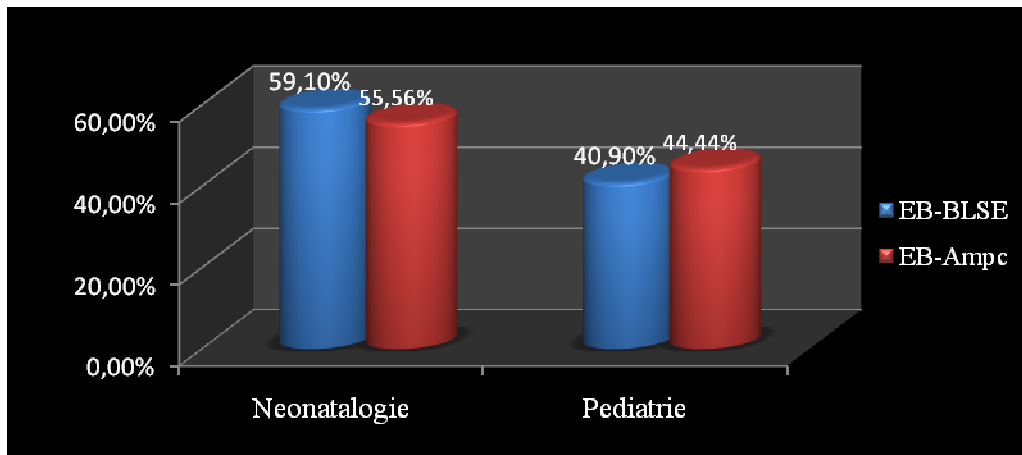


**Figure 13 :** Répartition des EB-BLSE selon l'espèce.



### III.2. Répartition des EB-BLSE et EB-AmpC selon les services

La répartition des souches d'EB-BLSE isolées par service est donnée dans la **figure 14**. On note que EB-BLSE sont le plus souvent isolées dans le service de néonatalogie avec un taux de 59,10 %. Parmi les souches productrices d'AmpC : 5 (55,56%) sont isolées dans le service de néonatalogie, et 4 (44,44%) dans le service de pédiatrie.

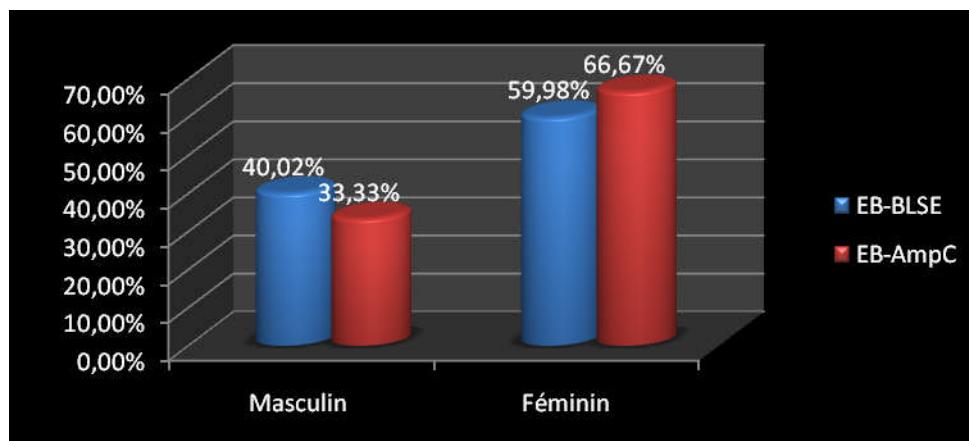


**Figure 14** : Répartition des EB-BLSE et EB-AmpC selon le service.

### III. 3. Répartition des EB-BLSE et AmpC selon le sexe

Le portage des EB-BLSE est plus élevé chez le sexe féminin avec un taux de 59,98% que chez le sexe masculin avec un taux de 40,02% (**figure 15**).

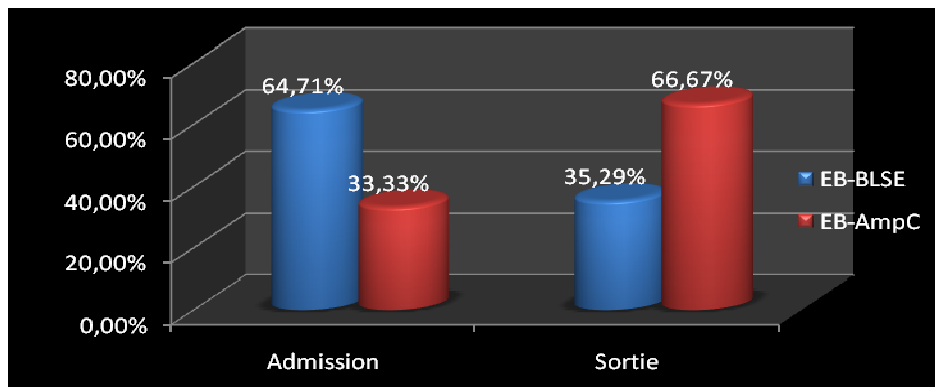
Concernant le portage d'EB-BLSE, le taux le plus élevé est noté chez le sexe féminin (66,67%), contre 33,33% chez le sexe masculin (**figure 15**).



**Figure N° 15** : Répartition des EB-BLSE et EB-AmpC selon le sexe.

### III. 4. La répartition des EB-BLSE et EB-AmpC à l'admission et à la sortie

La **figure 16** donne la répartition des EB-BLSE et EB-AmpC à l'admission et à la sortie du centre hospitalier. On remarque que le taux de EB-BLSE à l'admission est le plus élevé avec un pourcentage de 64,71%, par contre le taux de EB-AmpC est plus élevé à la sortie (66,67%).



**Figure 16** : Répartition des EB-BLSE et EB-AmpC à l'admission et à la sortie.

### IV. Etude des facteurs de risques influençant sur la colonisation digestive

Les tests statistiques étaient effectués à l'aide du logiciel XLSTAT (Annexe III). L'influence des facteurs de risques sur l'acquisition des souches résistantes a été analysée par le test Khi-deux et Fisher. Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative.

#### IV.1 Mode d'accouchement

Il a été observé que le mode d'accouchement a un effet hautement significatif sur l'acquisition de souches résistantes avec  $P < 0,01$ . Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau VI**.

**Tableau VI** : Répartition des souches résistantes selon le mode d'accouchement.

Résistance	Mode d'accouchement		Signification
	Voie basse	Césarienne	
Présence	55,14%	19,63%	OUI
Absence	11,21%	14,02%	

#### IV.2. Antibiothérapie

Test khi-deux et le test de Fisher ont été réalisés afin d'étudier l'influence de l'antibiothérapie sur la présence des souches résistantes, et qui montre que l'antibiothérapie n'est pas retenu comme un facteur de risque avec  $P > 0,05$ , les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau VII**.

**Tableau VII** : Pourcentage des souches résistantes selon l'antibiothérapie.

Résistance	L'antibiothérapie		Signification
	Avec	Sans	
Présence	22,28%	46,74%	Non
Absence	8,70%	22,28%	

#### IV.3. Allaitement

Selon le test Khi-deux, l'allaitement n'est pas un facteur de risque de l'acquisition des souches résistantes ( $P > 0,05$ ). Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau VIII**.

**Tableau VIII** : Répartition des souches résistantes l'allaitement.

Résistance	Allaitement		Signification
	Maternel	Artificiel	
Présence	40,70%	26,29%	Non
Absence	24,29%	15,70%	

## **V. Discussion générale**

La colonisation postnatale par des BMR peut être suivie d'infection en particulier chez les patients immunodéprimés (prématurés) et les nouveau-nés. Chez les prématurés, la survie est largement associée à de longues périodes d'hospitalisation, l'utilisation de cathéters, et à l'utilisation large d'antibiotiques. Tous ces paramètres constituent des facteurs de risque de développement des infections nosocomiales (IN) en particulier dans les services de soins intensifs. Les infections nosocomiales du nouveau-né présentent certaines particularités. En effet, ce sont les bacilles à Gram négatif qui sont le plus souvent responsables des infections nosocomiales dans la population générale. Une des façons de prévenir la survenue d'infections nosocomiales est la surveillance de la colonisation des nouveaux-nés et la mise en route de mesures d'hygiène permettant d'éviter la dissémination des BMR à l'intérieur d'une même unité.

Dans cette étude la plupart des prélèvements sont réalisés au service de néonatalogie 75,24%, la population étudiée n'est pas homogène, elle contient un très faibles effectif des prématurés 8,47% par rapport aux nouveaux-nés à terme, qui présentent un taux de 32,20% par rapport à la population totale. Les enfants représentent environ 24,75 % de la population totale, dont 52,21 % sont du sexe masculin. Il est à noter que les adultes (mamans des nouveaux-nés) occupent un faible taux (13,98%), ce qui peut être expliqué par l'hospitalisation des mamans qui ont accouché par césarienne dans un autre service. Le taux de souches isolées dans le service de néonatalogie (54,66%) est plus important en comparaison à celui enregistré dans le service de pédiatrie (45,33%), cela peut attribuer au nombre de prélèvements qui est différent dans les deux services.

Les bacilles à Gram négatif, dont les entérobactéries restent les bactéries les plus isolées en clinique, particulièrement dans les pays en voie de développement. Dans cette étude les souches les plus isolées sont *E. coli* avec un taux de 24,53% suivi par *E. intermedium* avec un taux de 20,85 % et *E. cloacae* avec un taux de 11,04%. Concernant le genre *Enterobacter*, les résultats trouvés sont différent de ceux obtenus par **Ho et al., 2005**, où *E. cloacae* était la prédominante avec un taux de 71,22%. Selon **Mirabaud (1996)**, *Enterobacter cloacae* est un germe qui colonise souvent les patients hospitalisés et plus particulièrement ceux traités par antibiotiques, et peut être à l'origine d'infections urinaires et de pneumonies, ainsi que des infections cutanées. Il peut également être responsable de bactériémies, et c'est un pathogène dont l'incidence en milieu hospitalier a considérablement augmenté ces dernières années.

Selon **Quinet et coll., 2010**, en néonatalogie, les principales épidémies hospitalières dues à des entérobactéries ont concerné principalement *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae*. Depuis une décennie, on assiste à une augmentation de fréquence d'*E. coli* producteur de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) aussi bien en communautaire qu'en intra-hospitalier. La source de l'épidémie était le lait de mère. Le lait est recueilli le plus souvent par extraction électrique. D'autres dysfonctionnements ont pu participer à la propagation croisée de la souche d'*E. coli* BLSE : le partage du petit matériel entre nouveau-nés (balance, toise, loupe pour fond d'oeil). L'utilisation du matériel patient dédié ou en monodose est à privilégier mais n'est pas toujours possible.

Le taux de souches d'*E. coli* était de 26% à l'admission et 24% à la sortie, suivi de celui de *K.pneumoniae*, 23% à l'admission et 20% à la sortie. Les autres espèces sont faiblement représentées. Nos résultats concordent avec les observations de l'équipe **Lepelletier et coll., (2008)** qui a constaté qu'à la sortie de l'hôpital, les fréquences du portage des différentes espèces étaient pratiquement identiques ou inférieures à celles observées à l'admission en réanimation, sauf pour *Pseudomonas*. **Filius et al., (2005)**, n'ont pas enregistré d'augmentation de *Pseudomonas* entre l'admission et la sortie et avait même tendance à diminuer et disparaître après la sortie du patient.

Toutes les souches ont été testées pour la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu. Le DD-test était positif chez 31,77% de souches, (35 % *E. coli*, 32,25% *E. intermedium*, 17,74 % *Proteus mirabilis*, 16,12% *Salmonella sp.*, 11,29% *Klebsiella pneumoniae*, des taux plus faibles ont été notés pour les autres espèces). Plusieurs autres types de  $\beta$ -lactamases telle l'AmpC continu à poser de sérieux problèmes pour leurs détections ainsi que pour leur interprétation. En plus de faux résultats négatifs peuvent survenir lorsque l'inoculum n'est pas bien contrôlé d'où la nécessité de réaliser des test complémentaire (**Adjidé et al., 2006**). Au cours de cette étude 09 souches ont été retrouvées productrices d'AmpC plasmidiques.

La détermination des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines a montré que nous souches appartiennent majoritairement au phénotype A (CTX-M) avec un pourcentage de 48,14 % qui correspond à la production de BLSE de type CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27 ou CTX-M-55. Cette classe de BLSE est connue comme un mécanisme important de la résistance aux C3G et aux C4G utilisé par les pathogènes à Gram négatif. Les BLSE de types CTX-M sont les enzymes les plus répandues, distribuées à la fois sur de vastes régions géographiques et entre une large gamme de bactéries cliniques, en particulier, les membres de la famille des entérobactéries. Des études à l'échelle nationale ont montré que les CTX-M-15 et CTX-M-3

sont les plus isolées en Algérie (**Ramdani-Bougessa et al., 2006 ; Touati et al., 2006 ; Iabadene et al., 2008 ; Messai et al., 2008**). Lors de cette étude, la répartition de ces enzymes est la suivante : 59,10% dans le service de néonatalogie et 40,90 % dans le service de pédiatrie. La même répartition est obtenue concernant les enzymes de type AmpC plasmidique. *E. coli* productrice de BLSE est retrouvée comme l'espèce majoritaire. Comme d'autres études l'ont montré, ces *E. coli*-BLSE produisant CTX-M sont le plus souvent importées dans les établissements de soins ou simplement de patients porteurs de la bactérie au niveau digestif au moment de leur entrée dans l'établissement, le portage digestif communautaire étant très fréquent y compris pour des personnes non soumises à des traitements antibiotiques comme cela a pu être décrit en Espagne. Il a été montré récemment en France que les animaux d'élevage pouvaient être porteurs et la consommation de viande contaminée pourrait être un des facteurs de dissémination de ce type de résistance au niveau communautaire (**Giraud-Morin et Fosse, 2008**).

Durant cette étude, nous avons noté un taux de portage élevé important chez les patients du sexe féminin (59,98%). Cette étude a montré également que le taux de portage des EB-BLSE est plus élevé à l'entrée (64,71%) qu'à la sortie, cela pourrait être expliquée par la prise d'antibiotique des patients durant l'hospitalisation. Selon une précédente étude de **Van der Zwet et coll., (2002)**, le risque d'acquisition d'une BMR débute dès le premier jour d'hospitalisation et en moyenne de huit jours. Pour prévenir la survenue d'infections nosocomiales, notamment éviter la dissémination des BMR à l'intérieur d'une même unité. Les nouveau-nés colonisés doivent être suivis et les mesures d'hygiène doivent être soigneusement respectées (**Campeotto et al., 2004**).

L'étude statistique des facteurs de risque qui influencent la colonisation de tube digestif, a montré que le type d'allaitement et l'antibiothérapie n'ont pas une influence significative sur la colonisation digestive ( $P > 0,05$ ), par contre le mode d'accouchement a montré un effet hautement significatif ( $P < 0,01$ ). Selon **Langhendries (1997)**, l'accouchement par césarienne retarde nettement la colonisation initiale par les microorganismes anaérobies chose qui est différente lors d'accouchement par voie basse. Par ailleurs, la flore rectovaginale maternelle étant le déterminant essentiel de la qualité de la flore bactérienne colonisatrice du nouveau-né, il est important de préserver sa diversité en évitant de donner à la mère dans la période périnatale des antibiotiques à large spectre qui la modifient significativement (**Langhendries, 1997**). L'étude statistique, durant cette étude, n'a

révélée des facteurs de risque comme c'est déjà signalé dans plusieurs études. Cela pourrait être dû à la taille de l'échantillon qui n'est pas représentative.

Les facteurs de risque de développer une infection à *E. coli* BLSE chez un patient hospitalisé et colonisé ont été étudiés chez l'adulte mais sont extrapolables à l'enfant et au nouveau-né et sont identiques à ceux observés avec les germes sensibles. Ce sont : hospitalisation, cathéter veineux central, susceptibilité aux infections nosocomiales – très élevée chez le nouveau-né en particulier prématuré– et l'utilisation antérieure d'antibiotiques tels que les céphalosporines de 3e génération et les aminosides qui sont les plus utilisées. Le risque de translocation digestive pour une EBMR, qu'elle soit d'origine pré ou postnatale ne semble pas différent de la colonisation par des germes sensibles, tant pour les Klebsielles que les *E. coli* ou *Enterobacter cloacae*. Dans certains pays, sont apparues des souches résistantes à l'ensemble des C3G et aux carbapénèmes par production de carbapénémase. Les septicémies nosocomiales sont secondaires à une translocation digestive directement, ou associée à une colonisation d'un cathéter central, comme pour les infections à entérobactéries sensibles. La colonisation digestive est physiologique transformant un tube digestif stérile – axénique – à la naissance, en une flore digestive contenant plus de  $10^7$  germes / gramme de selles en 15 jours de vie. Cette colonisation provient de l'environnement immédiat du nouveau-né et donc du personnel soignant mais aussi des parents, en particulier lors du « peau à peau » pour les prématurés. La surveillance de cette colonisation digestive microbienne est nécessaire chez les nouveau-nés dont le séjour est prolongé dans les services de néonatalogie. Elle concerne surtout les prématurés dont l'âge gestationnel est inférieur à 32 semaines **(Biran et al., 2010)**.

## **Conclusion**

Au terme de cette étude effectuée au niveau de deux laboratoires d'analyses médicales celui d'hôpital d'Amizour et celui de la clinique Targa ouzemour (wilaya de BEJAIA), durant une période de 90 jours, 236 souches de bacilles à Gram négatif (225 souches d'entérobactéries, et 11 de *Pseudomonas*) ont été isolées chez 202 patients.

La résistance la plus marquée était vis à vis les  $\beta$ -lactamines, plus précisément aux céphalosporines de troisièmes générations à savoir le CTX avec un taux de 75,92%, et la CAZ avec 81, 94%. Parmi les souches isolées, *E. coli* était la plus isolée avec un taux de 24.53 %. Ces souches montrent une résistance importante vis-à-vis des C3G testées.

Le test de synergie a montré que 31,77% souches sont productrices de BLSE dont 64,71% à l'admission et 35,29% à la sortie.

Le test de Hodge a confirmée la production de céphalosporinases plasmidiques chez 09 souches.

L'analyse des phénotypes de résistance a montré que le phénotype A qui correspond à la production de BLSE de type CTX-M est le plus prévalent pour nos souches avec un taux de 48,14 %.

L'étude de la sensibilité de ces souches à l'égard d'autres familles d'antibiotiques a montré leur caractère multirésistant. Ainsi, le taux le plus élevé est enregistré pour les aminosides (gentamycine) avec un taux de 67,12%. Un taux de 20,37% est obtenu vis-à-vis de la Ciprofloxacine.

Les résultats obtenus ont montré que le taux d'EB-BLSE à l'admission est plus important qu'à la sortie, les taux sont respectivement 64, 71% et 35, 29%.

L'analyse statistique des données a permis de dégager un seul facteur de risque impliqué dans l'acquisition de souches résistantes, qui est le mode d'accouchement.

Afin de réduire l'émergence de ces souches dans le service de néonatalogie, la prévention de la colonisation digestive est indispensable. Elle commence par la prévention de la prématurité, une prise en charge de la grossesse et de l'accouchement qui tienne compte du risque nosocomial, avec maîtrise de la prescription antibiotique chez la mère. Une hygiène



stricte tout au long de la prise en charge des nouveau-nés est indispensable, il faut favoriser l'alimentation au lait de femme qui réduirait de 60 % le risque de sepsis. Les procédures invasives doivent être limitées en fréquence et durée.

Cette étude reste préliminaire car elle est limitée dans le temps et l'espace. Elle pourrait être complétée en :

- Etudiant un plus grand nombre de souches pour rendre l'étude statistique plus fiable.
- Caractérisant les gènes de résistance par PCR et séquençage
- Recherchant un lien clonal entre les souches par les techniques de typages moléculaire.

Références bibliographiques

**Acar J, Glauser M et Moreillon P. (1999).** Résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines par production des  $\beta$ -lactamases. *In: Les Antibiotiques: Agents Antibactériens et Antifongique.* Edition : Ellips. Paris, 436-445.

**Adjidé CC, Biendo M, Rousseau F, Hamdad-Daoudi F, Thomas D, Laurans G, Canarelli B, Obin O, Hénicque M, Schmit JL et Eb F. (2006).** *Escherichia coli* producteurs de bêtalactamases à spectre étendu : de nouvelles menaces nosocomiales ? *Pathologie Biologie.* **54**, 510-517.

**Aissou K. (2007).** Etude de la résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches de *S.aureus* et d'entérobactéries isolées en milieu hospitalier. Mémoire de fin de cycle en microbiologie, université A/Mira de Béjaia. 56p.

**Andermont A. (1995).** Ecosystème bactérienne du tube digestif .rapports avec le traitement des péritonites *Médecine maladie infectieuse.* **5**,1123-1126.

**Baraniak A., Fiett J., Hryniewicz W., Nordmann P., Gniadkowski M. 2002.** Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. *Jornal of Antimicrob Chemother.* **50**, 393-396.

**Barbe C, Fusellier A, Bureau Chalot F, Brasme L, Vernet G V, De Champs C et Bajolet O. (2010).** Étude des facteurs prédictifs d'acquisition d'une souche épidémique d'*Escherichia coli* productrice de bêta-lactamase à spectre étendu. *Pathologie Biologie.* **58**, 25-28.

**Barbut F. et Petit J.C. (2007).** Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques. *Dans :* Collignon A, Beljean-Leymarie M, Farinotti R et Doutremepuich C. Infectiologie. Edition : Le Moniteur-Internat. Paris. pp. 345-362.

**Bassetti M, Rghi E et Viscoli C. (2008).** Novel  $\beta$ -lactam antibiotics and inhibitor combination. *Expert Opin. Investing. Drugs.* **17**, 285-296.

**Bonnet R. (2006).**  $\beta$ -lactamines et entérobactéries. *In.* Antibiogramme. Edition: ESKA. Paris, pp.141-162.

**Bennet R, Eriksson M, Nord C E, Zetterstrom R. (1986).** Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens. *Pediatr Infect Dis J.* **5**, 533-9.

**Benno Y, Sawada K et Mitsuoka T. (1984).** The intestinal microflora of infants : composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol. Immunol.* **28**, 975-86.

**Berthelot P, Grattard F, Mallaval O, Ros A, Lucht F et Pozzetto B. (2005).** Epidemiology of nosocomial infections due to *P.aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathol Biol.* **53**, 341-348.

**Bradford PA. (2001).** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* **14**, 933–951.

**Buch K et Jakoby GA. (2010).** Updated functional classification  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob agents chemother, Rev.* **54**, 969-976.

**Bush K, Jacoby G A et Medeiros A A. (1995).** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**, 1211-1233.

**Campeotto F, Garnier F, Kalach N, Soulaines P, Dupont C et Raymond J. (2004).** Acquisition nosocomiale de bactéries multirésistantes dans un service de néonatalogie : étude prospective et analyse des facteurs de risque. *Archives de pédiatrie.* **11**, 1314–1318.

**Campeotto F , Waligora-Dupriet A-J , Doucet-Populaire F, Kalach N , Dupont C, Butel M-J (2007).** Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né Gastroenterol. *Clin Biol.* **31**, 533-542.

**Cattoir V. (2004).** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathol Biol.* **52**, 607-616.

**Cattoir V. (2008).** Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Pathologie infectieuse en réanimation. *MAPAR*. 203-209.

**Cavallo J D, Fabre R, Jehi F, Rapp C et Garrabé E. (2004).** Beta-lactam antibiotics. *EMC-Maladies Infectieuses*. **1**, 129–202.

**Choi S H, Lee J E, Park S J, Kim M N, Choo E J, Kwak Y G, Jeong J Y, Woo J H, Kim N J et Kim Y S. (2007).** Prevalence, microbiology, and clinical characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, and *Morganella morganii* in Korea. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **26**, 557-56.

**Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CFA-SFM).** Communiqué 2010.

**Corthier G. (2007).** Flore intestinale et santé : quels enjeux ?. *Nutrition clinique et métabolisme*. **21**,76-80.

**Costa D Vinué L, Poeta P, Coelho A, Matos M, Saenz Y, Somalo S, Zarazaga M, Rodrigues J et Torres C. (2009).** Prevalence of extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*. **138**, 339-344.

**Courdon PE, Moland ES et Thomson KS. (2000).** Occurrence and detection of AmpC  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**, 1791-1796.

**Drasar B, Barrow P. (1985).** Intestinal microbiology. *American Society for Microbiology* Washington, DC.

**Drieu L, Brossier F, Sougakoff W, et Jarlier V.(2008).**Phenotypic detection of extended – spectrum  $\beta$ -lactamase-producing in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin.Microbiol Infect*. **14**, 90-103.

**Faure S. (2009).** Transfert d'un gène de résistance aux  $\beta$ -lactamines *bla*CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. Thèse de doctorat en Biologie et Santé. Université de Rennes 1. 190p.

**Fisher J. F, Meroueh S. O. et Mobashery S. (2005).** Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical Reviews*. **105**, 395-424.

**Gangoue-Pieboji A. (2007).** Caractérisation des  $\beta$ -lactamases et leur inhibiteur par les extraits de plantes médicinales. Thèse de Doctorat, Université de Liège. 127p.

**Gaston. M. (1988).** Enterobacter: an emerging nosocomial pathogen. *J Hosp Infect.* **11**, 197-208.

**Giraud-Morin C. et Fosse T. (2008).** Évolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005–2007). *Pathologie Biologie*. **56**, 417-423.

**Gniadkowski M. (2008).** Evolution of extended-spectrum- $\beta$ -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*. **14** (1), 11-32.

**Goulet O. (2009).** La flore intestinale : un monde vivant à préserver. *Archive pédiatrie*. **83**, 149–152.

**Green N, Tran R, Janda J. (2009).** *Klebsiella* and Gastrointestinal Syndromes with Particular Emphasis on *Klebsiella oxytoca* Antibiotic-Associated Colitis. *Clinical Microbiology Newsletter*. **31** Suppl. 15 : 111-116.

**Grönlund M, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen O P et Isolauri E. (2000).** Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow-up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. **83**, 186–92.

**Guediche M.N. (1990).** Colonisation bactérienne du nouveau-né et infection. *Médecine du Maghreb*. **22**, 25-27.

- Hagiage M. (1994).** La flore intestinale. De l'équilibre au déséquilibre. Vigot, 120 p.
- Ho PL, Shek RHL, Chow KH, Duan RS, Mak CG, Lai EL, Yam WC, Tsang KW et Lai W M. (2005).** Detection and characterization of extended-spectrum b-lactamases among bloodstream isolates of *Enterobacter* spp. in Hong Kong, 2000–2002. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **55**, 326–332.
- Hoquet D, Liane I, Patry F, Garch E et Plesiat P. (2004).** Two efflux systems expressed simultaneously in clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathology Biology*. **52**, 455-461.
- Iabadene, H., Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, Lounes S, Bakour R. et Arlet G. (2008).** Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *Antimicrob Chemother*. **62**, 133–136.
- Jacoby A G et Munoz price LS. (2005).** The new  $\beta$ -lactamases. *The New England journal of medicine* . **352**, 380-391.
- Jacoby G.A. (2009).** AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. **22** (1), 161-182.
- Jarlier V, Nicolas M H, Fournier G et Philippon A. (1988).** Extended-broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Infect Dis*. **10**, 867-878.
- Kiouba J C. (2002).** L'usage des antibiotiques en milieu hospitalier. Thèse de Doctorat, Université de Bamako .75p.
- Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M et Mitsuhashi S. (1983).** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. **11**, 315-317.
- Krzyminska S, Koczura R, Mokracka J, Puton T, Kaznowski A. (2010).** Isolates of the *Enterobacter cloacae* complex induce apoptosis of human intestinal epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*. **1**, 1-7.

**Kurt Azap O, Arslan H, Karaman S, Togan T. (2007).** Risk Factors for Fecal Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in the Community. *Turkish Journal Medical Science.* **37** Suppl. 1: 31-38.

**Langhendries J P, Paquay T, Hannon M, Darimont J. (1998).** Acquisition de la flore intestinale neonatale : role sur la morbidite et perspectives therapeutiques. *Arch Pediatr.* **5**, 644-53.

**Langhendries J P. (2001).** Colonisation bactérienne de l'intestin dans le jeune âge et modulation du système immunitaire. *Archives de pédiatries.* **16**, 244-246.

**Langhendries J P. (2006).** Colonisation bactérienne de l'intestin dans l'enfance : pourquoi y accorder autant d'importance ? *Archives de pédiatries.* **13** (12), 1526-1534.

**Langhendries JP, Paquay T, Hannon M, Darimont J. (1998).** Acquisition de la flore intestinale néonatale : rôle sur la morbidité et perspectives thérapeutiques. *Arch Pediatr.* **5**, 644-53.

**Lavigne J-P, Sotto A, Merle C, Jourdan J, Soussy C-J et Sirot D. (2002).** Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux bêtalactamines et prévalence en clinique. *Pathol Biol.* **50**, 388-93.

**Lee K, Kim C K, Yong D, Jeong S H., Yum J H, Seo Y H, Docquier J D et Chong Y. (2010).** Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemases producing Gram-negative bacilli. *Journal of Microbiological*

**Lepelletier D, Corvec S, Caroff N, Reynaud A et Potel G. (2008).** Impact de l'antibiothérapie et des facteurs liés à l'hôte et à l'hospitalisation sur le risque de colonisation digestive par des bactéries multirésistantes. *Antibiotiques.* **10**, 88-95.

**Livermore D M. (1997).** Acquired carbapenemases. *Jornal of Antimicrob Chemother.* **39**, 673-676.

**Livermore D.M. (1995).**  $\beta$ -lactamine in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 577-584.

**Livermore et Woodford N. (2006).** The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*. **14** Suppl. 9 : 412-419.

**Minarini L.A.R, Climaco E.C, Guimaraes D.B, Ferreira J.C, Palazzo I.C.V, Martinez R. et Darini A.L.C. (2008).** Clonal Transmission of ESBL-Producing *Klebsiella spp.* at a University Hospital in Brazil. *Current Microbiology*. **56**, 587-591.

**Mariani-Kurkdjian P et Bingen E. (2007).** Analyse bactériologique des selles. *In* : **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R.** Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson . Paris. P : 145-154.

**Mirabaud MI, (1996).** Enterobactéries à beta-lactamases à spectre élargi en pédiatrie en 1996. Thèse de doctorat en médecine . Université de Genève (suisse), Faculté de Médecine, 103p.

**Mirabaud MI. (2003).** Entérobactéries à beta-lactamases à spectre élargi en pédiatrie en 1996. Thèse de doctotat en médecine .Université de Genève (suisse) , Faculté de Médecine, 52p.

**Moland Ellen Smith, Kim Soo-Young, Hong Seong Geun, and Thomson Kenneth S .(2008).** Newer  $\beta$ -lactamases: Clinical and Laboratory Implications, Part II. *Clinical Microbiology Newsletter*.**30** (11), 79-85.

**Moreau. (2004)** .Flore microbienne intestinale : physiopathologie et pathologie digestive. John Libbey Eurotext .Paris.132p

**Nauciel C. et Vildé J L. (2005).** Bactériologie médicale. Ed. *Masson*, Paris. 255p.

**Ochs MM, McCusker MP, Bains M et Hancock RE. (1999).** Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrobial agents and chemotherapy* .**43**, 1085-1090.



**Orrhage K et Nord C E. (1999).** Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breast-fed infants. *Acta Paediatr.* **43** Suppl 4:47-57.

**Orrhage k, Nord C.(1999).** Controlling the bacterial colonization of the intestine in breast-fed infants.*Acta paeditr* .**30** Suppl 4 :47-57.

**Oteo J, Delgado-Iribarren A , Vega D, Bautista V, Rodriguez M, Velasco M, Saavedra J , Pérez-Vazquez M, Garcia-Cobos S, Martinez-Martinez L, Campos J. (2008).** Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents.* **32**, 534-537.

**Patel J, Rasheed B, Kamile J et Brandon K. (2009).** Carbapenemases in Enterobacteriaceae Activity Epidemiology and Laboratory Detection. *Ed. Newsletter*, pp. 31-61.

**Paterson D et Bonomo R A. (2005).** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* **18**, 657-689.

**Philippon A. et Arlet G. (2003).** Résistance aux antibiotiques : aspect technique. Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue Française des Laboraraires.* p.41-55.

**Philippon A. et Arlet G. (2006).**  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : Le mouvement perpétuel. *Ann Biol Clin.* **64** , 37-51.

**Prère M F, Licznar P, Decramer S et Fayet O. (2004).** *Escherichia coli* des infections urinaires et pyélonéphrites aiguës en pédiatrie : 1 % des souches sont résistantes à certaines céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, *Pathologie Biologie* . **52**, 497–500.

**Queenan A M , et Bush K. (2007).** Carbapenemase: the verstatile  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Rev.* **20** (3), 440-458.

**Ramdani-Bouguessa N, Mendocça N, Leitao J, Ferreira E, Tazir M. et Caniça M. (2006).** CTX-M-3 and CTX-M-15 extended spectrum  $\beta$ -lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J Clin Microbiol.* **44** (12), 4584-4586.

**Roy D. (2000).** Identification et caractérisation de la région variable des intégrons de classe 1 identifiés chez différents isolats cliniques à gram négatif et caractérisation du mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez un isolat de *salmonella* spp. isolé au Québec. Thèse du grade de maître des sciences. Département de biochimie et de microbiologie, Faculté des sciences et de génie, Université Laval. 179 p.

**Rupp ME et Fey PD. (2003).** Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae Considerations for Diagnosis, Prevention and Drug Treatment. *Drugs*. **63** (4), 353-365.

**Ruppé E. (2010).** Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques*. **12**, 3-16.

**Sakasaki R. (1984).** Serology of *Enterobacter* and *Hafnia*. In : Bergan T. (Ed.), Methods in microbiology. Edition : Academic Press INC. London. pp. 165-186.

**Sanders J et Sanders C. (1997).** Enterobacter spp: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev*. **10**, 220-241.

**Skurnik D. et Andreumont A. (2006).** Antibiothérapie sélectionnante. de la théorie à la pratique. Ed. *Réanimation*. **15**, 198-204.

**Sturenburg E and Mack D. (2003).** Extended-spectrum b-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of Infection*. **47** , 273–295.

**Thomson KS and Moland ES. (2001).** Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **45**, 3548-3554.

**Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L. et De Champs C. (2006).** First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents*. **27**, 397-402.

**Van Der Zwet WC, Timmers GJ et Simoons-Smit IM. (2002).** Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a haematology unit: risk factor assessment and successful control of the epidemic. *Br J Haematol.* **116**, 826-33.

**Yazourh A, Mullik C, Leroux B, Romond C, Romond M B. (2000).** Reproduction par effet prébiotique de la flore intestinale du nourrisson. *Archive Pédiatrie* .7 (2), 244-246.

**Site web:**

<http://www.lahey.org/Studies/>. (Consulté le 17/06/2009.)

# Annexe I

## Questionnaire

### Partie 1 : nouveaux nés

Code :	Hôpital :	Service :	Salle :
Date d'admission :		Motif d'admission :	
Age :	Sexe :	Cathéter : Oui/Non	
Grossesse à terme: oui/non Nbre de semaines :		Prématuré : oui/non Nbre de semaines :	
Type d'accouchement : Voie vaginale Césarienne	Allaitement maternel : oui / non	Poids à la naissance:	
Jumeaux : oui/non	Malformation oui/non		
Prélèvement admission 1 :	Date de prélèvement 1 :		
Prélèvement 2 une semaine après :	Date de prélèvement 2 :		
Prélèvement 3 Sortie :	Date de prélèvement 3 :		
La durée d'hospitalisation :	Intubation : oui/ non		
Nouveau-né transféré d'un autre hôpital Oui/Non	Date :	Hôpital :	
Antibiothérapie :Oui/Non	Date :	ATB administrés :	

### Partie 2 : Mamans

Code :	Hôpital :	Service :	Salle :
Date d'admission :		Motif d'admission :	
Age :	Sexe :	Sondage : Oui/Non	Cathéter : Oui/Non
Voyage à l'étranger : : Oui/Non	Date :	Pays :	
Maladie sous-jacente :	Antécédents chirurgicaux :	Date :	
Prélèvement admission 1 :	Date de prélèvement 1 :		
Prélèvement sortie 2 :	Date de prélèvement 2 :		
Hospitalisation antérieure : Oui/Non	Date :	Hôpital :	
Patient transféré d'un autre hôpital Oui/Non	Date :	Hôpital :	
Antibiothérapie :Oui/Non	Date :	ATB administrés :	

## Partie 3 : Enfants

Code :	Hôpital :	Service :	Salle :
Date d'admission :		Motif d'admission :	
Age :	Sexe :	Sondage : Oui/Non	Cathéter : Oui/Non
Voyage à l'étranger : : Oui/Non		Date :	Pays :
Maladie sous-jacente :		Antécédents chirurgicaux :	Date :
Prélèvement admission 1 :		Date de prélèvement 1 :	
Prélèvement sortie 2 :		Date de prélèvement 2 :	
Hospitalisation antérieure : Oui/Non		Date :	Hôpital :
Patient transféré d'un autre hôpital Oui/Non		Date :	Hôpital :
Antibiothérapie : Oui/Non	Date :	ATB administrés :	



## Composition des milieux de cultures et réactifs en g/l

### Gélose nutritive :

Extrait de viande .....	1
Extrait de levure .....	2
Peptone .....	5
Chlorure de sodium .....	5
Agar.....	15

pH 7,4

### Bouillon nitraté :

Infusion de coeur cervelle .....	25
Nitrate de sodium .....	10

pH 7,2

### Bouillon nutritif (g /l d'eau distillée

Macération de viande.....	01
Peptone trypsine.....	15
NaCl.....	05

pH=7,7

### Gelose Mac conkay:

Peptone de casiene.....	17
Peptone de viande.....	3
Lactose.....	10
Mélange de sels biliaires.....	1,5
Rouge neutre.....	0,03
Chlorure de sodium.....	05
Cristal violet.....	0,001
Agar.....	10

pH 7,4

**Gélose KIA :**

Extrait de viande de bœuf.....	3
Extrait de levure.....	3
Peptone (riche en lysine) .....	20
NaCl.....	05
Citrate ferrique.....	0,3
Tiosulfate de sodium .....	0,3
Lactose.....	10
Glucose.....	1
Rouge de phénol (solution de1%) .....	5
Agar .....	<b>12</b>

pH 7,4

**Citrate de Simmons :**

Phosphate d'ammunium .....	1
Phosphate bipotassique .....	1
Chlorure de sodium .....	5
Citrate de sodium .....	5
Sulficite de magnésium .....	0,20
Agar .....	18
Bleu de bromothymol .....	0,08

pH 6,9

**Mannitol mobilité :**

Peptone tryptique de viande .....	20
Agar .....	4
Mannitol .....	2
KNO <sub>3</sub> .....	1
Rouge de phénol à 1% .....	4 ml

pH 7,6 -7,8

**Milieu urée-indole :**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1



NaCl .....	5
Alcool à 95° .....	10ml
L tryptophane .....	3
Urée [CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ] .....	20
Rouge de phénol à 1% .....	25ml
Eau distillée .....	11

**Clark et Lubs :**

Peptone .....	5
Glucose .....	5
Hydrogénophosphate de potassium .....	5
Eau distillée .....	11

pH 7,5

**Milieu Mueller Hinton :**

Infusion de viande de bœuf .....	300
Hydrolysate de caséine .....	17,5
Amidon .....	1,5
Agar .....	17

pH 7,4

**Réactif de Griess (NRI et NRII) :****NRI :**

Acide sulfanilique .....	0,8
Acide acétique 5N .....	100ml

**NRII :**

Diméthylamine .....	0,6ml
Acide acétique 5N .....	100ml

**Réactif de Kovacs :**

p-diméthylaminebenzaldéhyde .....	10
HCL .....	50ml

Alcool amylique ..... 150ml

**Rouge de méthyle (RM)**

Rouge de méthyle .....0,5 g

Alcool éthylique à 60% ..... 100 ml

**Réactif de VPI**

$\alpha$ -naphтол.....6g

Alcool à 90° ..... 100 ml

**Réactif VP II**

NaOH 4N

## Résultats des tests statistiques

### 1. Mode d'accouchement

➤ Test du Khi<sup>2</sup>

Khi <sup>2</sup> (valeur observée)	7,766
Khi <sup>2</sup> (valeur critique)	3,841
ddl	1
p-value unilatérale	0,005
Alpha	0,05

### 2. Antibiothérapie

➤ Test du Khi<sup>2</sup>

Khi <sup>2</sup> (valeur observée)	0,327
Khi <sup>2</sup> (valeur critique)	3,841
ddl	1
p-value unilatérale	0,568
Alpha	0,05

➤ Test de Fisher :

p-value unilatérale	0,559
Alpha	0,05

### 3. Type d'allaitement

➤ Test du Khi<sup>2</sup>

Khi <sup>2</sup> (valeur observée)	0,241
Khi <sup>2</sup> (valeur critique)	3,841
ddl	1
p-value unilatérale	0,623
Alpha	0,05

➤ Test de Fisher :

p-value unilatérale	0,313
Alpha	0,05

#### Annexe IV

**Tableau IX :** Diamètres (mm) des zones d'inhibition du DD-test.

	<b>CTX</b>	<b>CAZ</b>	<b>Synergie</b>	<b>FEP</b>	<b>CPO</b>
AN 70	6R	6R	Présence	12R	6R
AN 46	9R	10R	Absence	15R	17I
AN 53	40S	34S	Absence	28S	30S
AN 71	18R	11R	Absence	28S	26S
AN 69	15R	20I	Absence	23I	20R
AN 31	6R	6R	Absence	-	6R
AN 68	28S	13R	Absence	30S	30S
AN 57	13R	6R	Absence	21I	24S
AN <sub>1</sub> 68	26S	12R	absence	32S	30S
AN 66	12R	13R	Présence	25S	20I
AN 59	13R	9R	Absence	20I	22I
AM18	30S	12R	Absence	22I	32S
BN104	6R	6R	Présence	6R	6R
BM05	14R	18I	Absence	S	6R
BN106	6R	6R	Présence	S	S
BN108	6R	6R	Présence	I	I
BM112	6R	6R	Présence	-	-
BN120♀	6R	6R	Présence	S	I
BN154	6R	6R	Présence	S	I
BN157	6R	6R	présence	I	I

**Tableau X :** Diamètres (mm) des zones d'inhibition du DD-test additionné à la cloxacilline.

	CTX	CAZ	AMC	Synergie
AN 70	RR	RR	6R	Présence
AN 46	38 S	26 S	6R	Absence
AN 53	32 S	30 S	6R	Absence
AN 71	16 R	10 R	12 R	Absence
AN 69	6R	6R	6R	Absence
AN 31	6R	6R	6R	Absence
AN 68	28 S	25 S	6R	Absence
AN 57	25 S	18R	20	ND
AN 68	24 S	24S	6R	Absence
AN 66	6R	6R	6R	Présence
AN 59	R12	6R	6R	Absence
AM18	36 S	34 S	24S	Présence
BN <sub>1</sub> 04	32	16	10	Présence
BM05	25	10	6 R	Absence
BN <sub>1</sub> 06	25	12	6	Présence
BN <sub>1</sub> 08	29	17	20	Présence
BM <sub>1</sub> 12	29	15	10	Présence
BN <sub>1</sub> 20♀	28	15	6	Présence
BN <sub>1</sub> 54	26	16	18	Présence
BN <sub>1</sub> 57	R	R	R	Présence
BN <sub>11</sub> ♀	6R	6R	12R	Présence

**CTX :** céfotaxime (C3G);

**FEP :** céfépime (C4G)

**CAZ :** céftazidime (C3G);

**CPO :** céfpirome (C4G)

**Tableau XI : Résultats de Test de Hodge**

<b>Souches</b>	<b>Résultats</b>
AM18	Positif
N <sub>2</sub> 59	Négatif
N53	Négatif
N68	Positif
N <sub>2</sub> 70	Positif
N69	Négatif
N27	Négatif
N57	Positif
N <sub>2</sub> 66	Négatif
N <sub>2</sub> 46	Positif
N 71	Positif
N <sub>2</sub> 41	Positif
BN06	Positif
BN08	Positif
BM12	Positif
BN20	Positif
BM05	Positif

## Résumé

Au cours de cette étude qui s'est déroulée dans le laboratoire de bactériologie médicale de l'hôpital d'Amizour et celui de la clinique de Targa ouzemour de Bejaia, durant une période allant de mars à juin 2012, nous avons isolé 236 souches résistance aux C3G (225 souches d'entérobactéries et 11 souches de *Pseudomonas aeruginosa*) chez 202 patients.

Les tests de sensibilité vis-à-vis les  $\beta$ -lactamines ont montré que 81,94% de souches sont résistantes à la CAZ et 75,92% au CXT. Le test de synergie a révélé la production de BLSE chez 71 souches. 48,14 %, des entérobactéries sont productrices des BLSE de type CTX-M. Le test de Hodge était positif chez 09 souches indiquant la production d'AmpC plasmidiques

L'étude statistique des facteurs de risque de colonisation de tube digestif, a montré que le mode d'accouchement a un effet hautement significatif, par contre le type d'allaitement et l'antibiothérapie n'ont pas une influence significatif ( $P>0,05$ ).

**Mots clés :** colonisation digestive, nouveau-nés,  $\beta$ -lactamines, entérobactéries, BLSE.

## Abstract

During this study which was conducted in medical bacteriology laboratory of Amizour and Targa ouzemour Hospitals in Bejaia. In a period going from March to June 2012, we have isolated 236 strains (which 225 were enterobacteria and 11 strains of *Pseudomonas aeruginosa*) from 202 patients.

Sensitivity tests to  $\beta$ -lactamins showed that 81.94% of stains are resistance to CAZ and 75.92% to CXT. Synergy test revealed the production of ESBL enzymes among 71 strains. 48.14 % of enterobacteria are CTX-M genotype ESBL.

Statistic study of risk factors that influence digestive tract colonization, showed that birth mode have a highly significant effect. In contrast, the antibiotherapy and feeding have no significant effect ( $P>0.05$ ).

**Key words:** digestive colonization, newborns,  $\beta$ -lactams, Enterobacteria, ESBL.