



Mémoire de fin de cycle

*En vue de l'Obtention du Diplôme de Master en
Microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au
biomédical et à l'environnement*

THEME

Contribution à l'étude de la colonisation digestive
par les entérobactéries productrices de B-lactamases
à spectre élargi chez des nouveau-nés hospitalisés au
CHU d'Hussein Dey d'Alger

Devant le jury :

Présidente : M^{me}. BENDALI
Promotrice : M^{me}. GHAROUT
Co-promotrice : M^{me}. MAHRANE
Examineurs : M^{elle}. TAFUKT
M^{elle}. SAIDANI

Présenté par : OUFELLA Nacera

Remerciements

En premier lieu, je remercie Dieu le tout puissant pour son aide et pour nous avoir donné volonté, courage et patience.

Je tiens à vous exprimer M^{me} la présidente « M^{me} BENDALI », toute ma gratitude pour avoir accepté de nous consacrer votre précieux temps et présider cette séance, c'est un grand honneur.

J'exprime le même sentiment de reconnaissance aux autres membres du jury :

M^{me} Yahaoui et M^{lle} SAIDANI

J'adresse un vif remerciement à M^{me} MAHRANE. Ainsi M^{me} GHAROUT. Pour l'honneur qu'ils nous ont accordé en nous encadrant et pour nous avoir guidés de leur mieux pour l'accomplissement de ce travail

Je remercie Pr GUCHI chef de service de laboratoire centrale de biologie clinique au niveau de CHU de HUSSEIN DEY de m'avoir accepté au niveau de leur établissement. Ainsi Mr RADOUANE, Mr Karim et M^{me} ROSA

Je remercie Pr SABAOU et Dr BADJI de m'avoir accepté au niveau de leur laboratoire de recherche

Dédicaces

*J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail a mes très chers
parents qui mon soutenue.*

A mes très chers frères « Radouane et Rahim »

A mes soeurs « Salima, Nadhéra, Hamida, Houa et Assia »

Mes adorables neveux et nièces « Imene, Mohamed, Myria et Amina »

Mon oncle Karim et sa femme Karima ainsi leur fis Ilane

Ma tante Zohra et son mari Ikhlef ainsi leur fis Khaled

Mes tentes, mes oncles, cousin et cousine

Comme je le dédie à tous mes amis Celia, Lydia, Mohamed et Aziz

A toute la promotion MAABE 2011-2012

Liste des abréviations

BLSE : B-lactamase à spectre élargie

BMR : Bactérie multirésistantes.

C1G : Céphalosporine de 1^{ère} génération

C3G : Céphalosporine de 3^{ème} génération

C4G: Céphalosporine de 4^{ème} génération

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

EDTA: Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique

I: intermédiaire

R: résistante

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline

BGN : Bacille à Gram négatif

Liste des tableaux

Tableau I : liste des milieux de culture et les réactifs utilisés.....	15
Tableau II : liste des antibiotiques testés durant cette étude.....	18
Tableau III : liste des p values et des odds ratio des facteurs de risque d'acquisition des BLSE.....	26
Tableau IV : liste des P value et des odds ratio des facteurs de risque d'acquisition des BLSE par type d'espèce.....	36
Tableau V : Comparaison entre les diamètres en mm des zones d'inhibition sur gélose Mueller et Hinton et Mueller Hinton additionné de colxacilline.....	39

Liste des figures

Figure 01 : mécanisme d'hydrolyse d'une β - lactamine par une β - lactamases	7
Figure 02 : Répartition des souches des bacilles à Gram négatif isolées.....	25
Figure 03 : Répartition des souches des bacilles à Gram négatif par espèce.....	26
Figure 04 : aspect de quelques colonies sur un milieu chromID ^T	27
Figure 05 : Les taux de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries.....	27
Figure 06 : Disposition des disques d'antibiotiques dans le cas du DD-test	28
Figure 07 : DD-test sur gélose MH additionnée de la cloxacilline.....	29
Figure 08 : Production de céphalosporinases chez <i>K. pneumoniae</i>	30
Figure 09 : Taux de résistance aux β -lactamines chez <i>K. pneumoniae</i>	31
Figure 10 : Taux de résistance aux aminosides chez les <i>K. pneumoniae</i>	32
Figure 11 : CMI de la céfotaxime et céftazidime chez <i>K. pneumoniae</i>	35
Figure 12 : Répartition en fonction du portage par les BLSE	36
Figure 13 : Répartition de la population selon le sexe des nouveau-nés.....	36
Figure 14 : Répartition selon le mode d'accouchement des nouveau-nés	36
Figure 15 : Répartition selon l'antibiothérapie administrée	37
Figure 16 : Répartition de la population en fonction des salles	37
Figure 17 : Répartition selon le sondage	38
Figure 18 : Répartition selon le cathéter.....	38
Figure 19 : Répartition selon les prématurés.....	38
Figure 20 : Répartition selon le moment du prélèvement.....	39
Figure 21 : Répartition de colonisation en fonction du sexe des nouveau-nés	40
Figure 22 : Répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de mode d'accouchement	40
Figure 23 : répartition de la Colonisation par les E-BLSE en fonction de l'antibiothérapie.....	41
Figure 24 : Répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de salle	41
Figure 25 : Répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de sondage.....	41

Figure 26 : Répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de cathéter.....	42
Figure 27 : Répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction des prématurés.....	42
Figure 28 : Répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction du moment de prélèvement	43
Figure 29 : Répartition de la colonisation par la nature d'espèce en fonction en fonction des facteurs de risque.....	44

Sommaire

Introduction

Partie théorique

I. Flore intestinale	3
I.1. généralités	3
I.2. la flore intestinale du nouveau né	3
I.2.1. Facteurs endogènes intervenant dans l'établissement de la flore intestinale	4
I.2.2. Facteurs exogènes participant à la colonisation.....	4
II. Les B-lactamases	7
II.1. Généralités et mode d'action.....	7
II.2. La classification.....	7
II.3. Les B-lactamases à spectre élargi.....	12
II.3.1. Généralités.....	12
II.3.2. Les différents types de BLSE.....	13

Partie pratique

I.1. Milieux de cultures et réactifs utilisés	17
I.2. Prélèvements.....	18
I.3. Isolement	18
I.4. Purification et identification	18
II. Antibiogramme	19
II.2. Recherche de la production de B-lactamases à spectre étendu	21
II.2.1. DD-test	21
II.2.2. DD-test additionnée de cloxacilline	21
II.3. Recherche de la production de céphalosporinase plasmidiques.....	22
II.4. Détermination des CMI par E-test.....	23

III.	Transfert des gènes de résistance par conjugaison	21
------	---	----

Résultats et discussion

I.	Recueil de souches de bacilles à gram négatif	23
I.1.	Répartition par espèce.....	24
I.2.	Etude de la sensibilité aux antibiotiques chez les entérobactéries	25
I.2.1.	Confirmation de la production des BLSE.....	25
I.3.	Sensibilité des souches de <i>K. pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	28
I.3.1.	Sensibilité des souches de <i>K. pneumoniae</i> aux <i>B-lactamines</i>	28
I.3.2.	Sensibilité des souches de <i>K. pneumoniae</i> aux aminosides.....	29
I.3.3.	Sensibilité des souches de <i>K. pneumoniae</i> aux quinolones	30
I.3.4.	Sensibilité des souches de <i>K. pneumoniae</i> aux sulfamides.....	31
I.3.5.	Sensibilité des souches de <i>K. pneumoniae</i> aux autres antibiotiques	31
I.4.	Détermination des CMI.....	31
I.5.	Transfert génétiques par conjugaison	32
II.	Caractéristique de la population	32
III.	Analyse statistiques des facteurs de risque de colonisation digestive par E-BLSE	35
III.1.	l'acquisition des BMR et facteur de risque.....	36
III.2.	Nature des BMR isolés et facteurs de risque.....	39
	Conclusion	47

Références bibliographiques

Annexes

De la fin des années 1940 jusqu'aux années 1970, de nombreuses molécules d'antibiotiques d'origine naturelle ou synthétique ont été découvertes. Le succès des premiers traitements anti-infectieux a fait considérer le problème des maladies infectieuses comme définitivement réglé. Mais, rapidement, l'enthousiasme a décliné avec l'apparition des premières résistances aux antibiotiques. A chaque nouvelle molécule introduite, les bactéries se sont adaptées et résistées plus ou moins vite. Apparaissant aujourd'hui de véritables pathogènes résistants à tous les antibiotiques potentiellement actifs (Ploy et *al.*, 2005).

En Algérie comme partout dans le monde, la maîtrise de la diffusion des bactéries multi-résistantes est une priorité dans la lutte contre les infections nosocomiales. En effet, certaines souches sont devenues résistantes presque à tous les antibiotiques disponibles. Le cas le plus connu est celui du SARM qui résiste à la méthicilline. En plus du SARM, il y a eu l'émergence des bacilles Gram à négatif, tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, et les *Enterobacteriaceae* producteurs de BLSE. Les bactéries multirésistantes constituent un problème majeur de santé publique. Plusieurs mécanismes sont à la base de cette multirésistance aux antibiotiques. L'hydrolyse enzymatique reste cependant le mécanisme prépondérant et en particulier la production de β -lactamases. Les plus importantes de ces dernières sont les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* conférant la résistance aux céphalosporines de troisième génération et à l'aztréonam. L'association de multiples mécanismes de résistance crée à son tour des bactéries multirésistantes telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Hamouche et Sarkis, 2011).

Les E-BLSE sont responsables d'infection ou de colonisation en période néonatale et sont *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Enterobacter SP*. Chez les nouveaux nés comme chez l'adulte, les *E. coli* sont devenues progressivement l'espèce bactérienne la plus souvent impliquée, ces E-BLSE dans les infections néonatales, ont une responsabilité encore faible dans les infections primitives et sont surtout responsables d'infections et de colonisations nosocomiales.

Le but de cette étude est la détermination des facteurs de risque influençant l'acquisition des E-BLSE en néonatalogie avec caractérisation des souches isolées.

pour la maîtrise de la diffusion de ces BLSE. Pour ce faire, nous avons adopté le plan suivant :

- partie théorique : représentation de la flore intestinale et les différents facteurs influençant l'établissement de cette dernière ainsi les différents types de B-lactamases

- partie pratique :

Réalisation des prélèvements par écouvillonnage rectal à visé écologique chez les nouveaux nés ; Isolement des souches productrices des BLSE ; Etude de la sensibilité des souches vis-vis de différentes familles d'antibiotiques ; Détermination des CMI vis-vis certaines bêta-lactamines.

I. La flore intestinale

I.1. Généralités

La flore intestinale appelée aussi le microbiote intestinal. Le microbiote intestinal représente l'ensemble des bactéries peuplant notre tractus digestif. Il s'agit d'une biomasse considérable puisqu'il constitue un poids de 1 à 2 Kg et représente 50 % de la matière fécale. Chez l'Homme le microbiote intestinal est composé de 100 000 milliards de bactéries soit 10 à 100 fois le nombre de cellules de notre organisme. L'homme selon l'estimation la plus basse, est donc constitué à 90% de bactéries, autrement dit, il ya autant de bactéries dans un gramme de selles que dans notre cerveau (Leclerc, 2007). La composition de la flore varie tout au long de tube digestif avec un gradient croissant dans le sens oral-anal, mais aussi transversalement entre la lumière et la muqueuse intestinale (Seignalet, 2004).

La flore intestinale est constituée par une flore autochtone résidente et une flore de transit ou allochtone (Rambaud *et al.*, 2004). La flore autochtone est représentée de manière permanente dans l'écosystème intestinal, elle est capable de coloniser des sites spécifiques et de se multiplier, cette flore est caractéristique de l'individu, on parle de « carte d'identité bactérienne » (Riché, 2008). La flore allochtone possède un pouvoir d'implantation transitoire, elle transite tout au long du tube digestif, elle reflète les infections, les changements d'environnement. Cette flore est non pathogène car constamment contrôlée par la flore autochtone (anaérobie stricte et anaérobie facultative) (Seignalet, 2004).

I.2. La flore intestinale du nouveau-né

Au cours de la grossesse, le fœtus se trouve dans un environnement stérile et à la naissance, le tube digestif du nouveau-né est colonisé d'une façon massive et rapide par un microbiote peu diversifié dès les premiers moments de vie extra-utérine. En effet, le nouveau-né absorbe les bactéries, fécales, vaginales, cutanées de la mère lors de l'accouchement, ainsi que toutes les bactéries du milieu environnant. La colonisation suit néanmoins un schéma relativement organisé, sous la dépendance des facteurs exogènes et endogènes (Grondlund *et al.*, 1999).

I.2.1. Facteurs endogènes intervenant dans l'établissement de la flore intestinale

Les premières bactéries qui s'implantent sont des staphylocoques, des entérobactéries et des entérocoques, il s'agit des bactéries aérobies-anaérobies facultatives, c'est à dire des

bactéries consommatrices de l'oxygène. Elles prolifèrent abondamment en quelques jours et lorsque la quantité des bactéries aéro-anaérobies facultatives atteint 10^{11} UFC/g de contenu colique, leur consommation d'oxygène entraîne une diminution du potentiel redox, ce qui permet l'implantation dès le troisième jour de vie, des genres anaérobies stricts tels que *Bifidobacterium*, *Bacteroides* et *Clostridium*. Inversement, les genres aérobie régressent (Goulet, 2009).

I.2.2. Facteurs exogènes participant à la colonisation

De nombreux éléments vont influencer la cinétique d'implantation et la composition de la flore intestinale du nouveau-né parmi les quels le mode d'accouchement, l'environnement, le type d'alimentation, l'âge gestationnel et l'antibiothérapie (Harmsen, 2000 ; Affsa, 2005 ; Goulet, 2009)

❖ Influence du mode d'accouchement

Les enfants nés par césarienne rencontrent majoritairement en premier lieu les bactéries de leur environnement. L'implantation de leur flore est donc différente de celle des nouveau-nés nés par voie basse. Les premières bactéries implantées sont toujours les anaérobies facultatifs (entérobactéries, entérocoques, staphylocoques), mais la flore anaérobie stricte s'implante beaucoup plus tardivement, ce retard portant principalement sur les genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides*. Le suivi sur 6 mois d'une cohorte a montré que ce retard de colonisation était toujours significatif à 1 mois pour le genre *Bifidobacterium* et à 6 mois pour le genre *Bacteroides*. Les auteurs remarquent également que l'établissement de *Clostridium perfringens* est favorisé lors de la naissance par césarienne. Ce retard d'implantation peut s'expliquer par le fait que ces enfants sont plus fréquemment nés par césarienne, puis sont mis dans un environnement très aseptisés et soumis à une antibiothérapie à large spectre et donc ne sont pas tout de suite en contact avec la flore entérique et vaginale de la mère et très peu de bactéries environnantes (Grondlund *et al.*, 1999).

❖ Influence du terme de naissance

Chez les enfants prématurés, la flore aérobie anaérobie colonise assez rapidement le prématuré, l'implantation de la flore anaérobie est retardée, mais aussi avec un nombre plus réduit d'espèces bactériennes. Les bifidobactéries apparaissent alors vers dix jours et ne sont dominantes qu'au bout de deux à trois semaines de vie. Dans l'étude de Sakata portant sur des

prématurés d'âge gestationnel moyen de 29,5 semaines, les bifidobactéries apparaissent à un âge moyen de $10,6 \pm 2,7$ jours et ne deviennent dominants qu'à $19,8 \pm 8,9$ jours de vie (Sakata *et al.* 1985).

❖ Influence de l'alimentation

Le mode d'alimentation du nouveau-né est l'un des facteurs les plus étudiés. La flore qui s'implante chez le nouveau-né allaité est moins diversifiée que celle du nouveau-né nourri au lait artificiel (Ducluzeau *et al.*, 1993 ; Orrhage et Nord, 1999). L'allaitement maternel favorise l'implantation du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Langhendries, 1998). L'analyse comparative de composition de la flore fécale des nouveau-nés allaités au sein ou avec une préparation pour nourrisson révèle des taux variables des bifidobactéries, *E coli* et *Bacteroides* jusqu'à trois jours après la naissance. Au 7^e jour chez les bébés recevant le lait maternel, les bactéries entériques et bifidobactéries représentent un grand pourcentage de la flore totale. Chez les bébés nourris avec une préparation pour nourrisson, ce sont les genres *Bactéroïdes*, *Clostridium* et *Eubacterium* qui deviennent dominants (Martin, 2000).

❖ Influence de l'antibiothérapie

Les conséquences d'une antibiothérapie ont été étudiées surtout sur la sélection de micro-organismes résistants. La plupart des études ont été effectuées dans des unités de soins intensifs, montrant qu'une antibiothérapie supérieure à 3 jours est un facteur de risque de colonisation par des entérobactéries résistants. Ce facteur de risque est d'autant plus élevé que l'antibiothérapie est à large spectre. La colonisation par des bactéries résistantes a également été corrélée à la durée de l'hospitalisation, au faible âge gestationnel et au faible poids de naissance, montrant l'importance du transfert horizontal des souches. L'influence de l'antibiothérapie sur l'implantation globale de la flore n'a été que très peu étudiée. Goldman dans son étude portant sur l'influence de l'antibiothérapie dans la colonisation du nouveau né, n'a pas observé de modification de l'implantation de la flore chez le nouveau-né même avec une antibiothérapie de plus de 3 jours, mais seule la flore aérobie a été étudiée (Bonnemaison, 2003). Dans l'étude de Bennet portant sur les conséquences de l'antibiothérapie dans la colonisation du nouveau né montre 60 à 80 % des enfants ayant reçu une antibiothérapie ont été colonisés par une flore anaérobie à un niveau n'excédant pas 10^6 bactéries/g fèces alors que 100 % des enfants non traités étaient colonisés à un niveau de 10^7 /g (Bonnet, 1986).

L'antibiothérapie administrée à la mère *per partum* peut aussi influencer l'implantation de la flore du nouveau-né. Le cas le plus fréquent concerne l'antibioprophylaxie *per partum* de l'infection néonatale à streptocoque du groupe B. Que ce soit une antibiothérapie *per partum* ou post-natale, elle va soit modifier la flore barrière, soit sélectionner des germes résistants à l'antibiotique. Tout ceci entraînant une diminution de la résistance à la colonisation par des bactéries pathogènes (Harmsen, 2000), notamment des entérobactéries résistants (Rambaud *et al.*, 2004).

❖ **Influence de l'environnement et des conditions d'hygiène**

L'environnement joue un rôle important dans la colonisation intestinale. Certaines études ont mis en évidence la colonisation à plus haut niveau et plus fréquente chez les enfants nés dans les pays en voie développement par les bifidobactéries. Ces différences de flore sont vraisemblablement liées aux conditions plus strictes d'hygiène entourant les accouchements dans les pays industrialisés, réduisant l'exposition de l'enfant aux flores fécale et vaginale de sa mère. On parle de « syndrome d'hyper-hygiène » Ceci réduit l'exposition de l'enfant à la flore microbienne maternelle et environnementale. Ce syndrome d'hyper-hygiène serait en partie responsable de l'augmentation des infections néonatales à germes résistants (Sepp, 2000).

II. Les β-lactamases

II.1. Généralités et mode d'action

Les β-lactamases sont des hydrolases capables d'ouvrir le cycle β-lactame en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable. Cette cassure provoque la perte d'un groupement carboxyle et entraîne l'inactivation de l'antibiotique (Figure 1). C'est le principal mécanisme de résistance des entérobactéries. Ces enzymes peuvent être chromosomiques ou plasmidiques et produites d'une manière inductible ou constitutive. Elles sont sécrétées dans l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif ou dans le milieu de culture chez les bactéries à Gram positif (Essack, 2001).

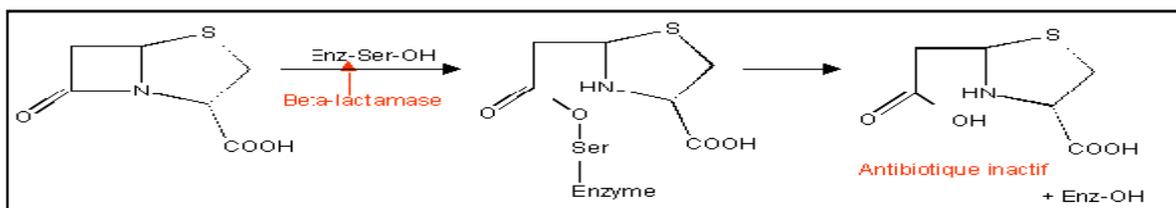


Figure 1 : mécanisme d'hydrolyse d'une β-lactamine par une β-lactamases (Ruppé, 2010)

II.2. Classification

Les β -lactamases sont nombreuses et hétérogènes, ce qui justifie dans une certaine mesure les problèmes souvent rencontrés dans leur identification. Plusieurs classifications des β -lactamases ont été proposées. Les deux classifications couramment utilisées sont celle d'Amblar (structurale) et celle de Bush, Jacoby et Medeiros (fonctionnelle).

II.2.1. Classification structurale d'Amblar

Elle est basée sur la séquence peptidique du site enzymatique et distingue quatre classes de β -lactamases:

- **Les β -lactamases de la classe A**

Elles correspondent aux « pénicillinases de type TEM, SHV, OXA, PSE et CTX » qui ont une grande importance clinique, elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les C3G. Les gènes codants pour les pénicillinases sont portés par les plasmides. Cependant, on retrouve chez *K. pneumoniae* une pénicillinase d'origine chromosomique de type SHV-1. Ces pénicillinases sont produites d'une manière constitutive sauf celle de *S. aureus*. Il existe une très grande variété de pénicillinases, elles peuvent être spécifiques à un genre (PC1 de *S. aureus* et PSE de *P. aeruginosa*) (Touati, 2010). L'association avec un inhibiteur de β -lactamases tel que l'acide clavulanique, sulbactam ou le tazobactam permet de récupérer au moins partiellement l'activité de la β -lactamine sauf en cas de surexpression de l'enzyme (Neu, 1998).

- **Les enzymes de la classe B**

Elles sont des métallo-enzyme qui requièrent un cation divalent Zn^{2+} qui interagit avec une cystéine et trois résidus d'histidine, probablement sur le site actif de l'enzyme. Heureusement qu'elles sont peu fréquentes car elles hydrolysent des agents stables aux β -lactamases comme l'imipénème, elles sont inhibées par l'EDTA. L'IMP-1 est la première métallo- β -lactamase décrite chez *P. aeruginosa*. Le gène codant semble être dispersé entre *P. aeruginosa* et les autres bactéries à Gram négatif au Japon (Kong *et al.*, 2010).

- **Les enzymes de la classe C**

Elles regroupent les « céphalosporinases de type AmpC » insensibles à l'acide clavulanique et au sulbactam ; toutes fois certaines sont faiblement inhibées par le tazobactam (Doi *et al.*, 2004), elles sont codées par un gène chromosomique et dont l'expression peut être inductible ou constitutive, de bas ou de haut niveau. Ces bêta-lactamases sont produites naturellement chez *Enterobacter spp*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* et *Pseudomonas aeruginosa*. Récemment, elles ont été identifiées comme β -

lactamases plasmidiques chez *E. coli* (Bou, 2000), *K.pneumoniae*, *P. mirabilis* et *Salmonella spp* (Coudron, 2000). La présence de cette β -lactamase (AmpC) au niveau de plasmide favorise la diffusion de la multirésistance entre les micro-organismes. Les céphalosporinases codées par l'AmpC hydrolysent préférentiellement les céphalosporines plutôt que les pénicillines (Jarlier, 2003).

- **Les enzymes de la classe D**

Elles sont appelées les oxacillinases, en effet, elles sont capables d'hydrolyser l'oxacilline ou encore la méthicilline (Kong et al., 2010).

II.2.2. Mise à jour de la classification fonctionnelle

La classification fonctionnelle mise à jour dans l'article de Bush et Jacoby (2010), est basée sur la proposition de Bush et al., en 1995. Le tableau N°I illustre une version élargie de la classification fonctionnelle proposée par Bush et Jacoby en 1995 Figure en **annexe I**.

❖ Groupe 1

Les enzymes du groupe 1 sont des céphalosporinases à sérine, non inhibées par l'acide clavulanique. Ce groupe englobe les céphalosporinases chromosomique appartenant à la classe C. Ces enzymes sont plus actives sur les céphalosporines, elle hydrolyse aussi les céphamycines, comme la céfoxitine. Elles sont inhibées par l'aztréonam. Dans ce groupe, on retrouve également les céphalosporinases plasmidiques telles que CMY, ACT, DHA, FOX et MIR.

▪ **Le nouveau sous-groupe 1e**: Les enzymes du nouveau sous groupe 1e sont des β -lactamases, avec une activité plus élevée vis-à-vis de la céftazidime et autres oxymino β -lactamines, elles sont des β -lactamases à spectre étendu de type AmpC.

❖ Groupe 2

Les enzymes du groupe 2 sont des β -lactamases à sérine, de classe A et D, la plupart sont inhibées par le clavulanate. Elles inactivent essentiellement les pénicillines et les céphalosporines (en fonction du sous-groupe). Les céphalosporines de troisième et quatrième génération, les monobactames et les carbapénèmes restent actifs.

▪ **Les enzymes du groupe 2a**: regroupent les pénicillinases avec un spectre d'activité relativement limité et sont principalement retrouvées chez les cocci à Gram+, incluant les staphylocoques et occasionnellement les entérocoques. Ces enzymes hydrolysent

préférentiellement la benzylpénicilline et de nombreux dérivés de la pénicilline, mais ont une hydrolyse limitée sur les céphalosporines, carbapénèmes et monobactame, souvent avec des taux inférieurs ou égal à 10 %.

- **Les enzymes du groupe 2b** : les β -lactamases de ce groupe comprennent les TEM-1, TEM-2 et SHV-1, elles hydrolysent facilement les pénicillines et les C1G comme les céphaloridines et les céphalotines, et sont fortement inhibées par le clavulanate et le tazobactam.

- **Le sous-groupe 2be** : ce sous-groupe comprend les BLSE, des mutations survenues au niveau des β -lactamases à large spectre de type TEM et SHV ont été décrites. La première et principale division du sous-groupe 2be a été dérivée de substitutions d'acides aminés au niveau des enzymes TEM-1, TEM-2, et SHV-1, ce qui a élargi leur spectre d'activité. Ces enzymes hydrolysent une ou plusieurs oxyimino- β -lactamines, telles que le céfotaxime, la céftazidime, et l'aztréonam, à des taux généralement supérieurs à 10% de ceux de la benzylpénicilline. Les BLSE de type CTX-M hydrolysent, pour la plupart, le céfotaxime plus rapidement que la céftazidime. Plusieurs hydrolysent le céfépime. En outre, ce groupe renferme d'autres BLSE dites mineurs, comme les enzymes BES-1, OFS-1, TLA-1, PER et VEB (Bush et Jacoby, 2010).

- **Le sous-groupe 2br** : il s'agit de β -lactamases à large spectre qui ont acquis une résistance à l'acide clavulanique et aux inhibiteurs apparentés, ce sont les TEM résistants aux Inhibiteurs (TRI) (Bush et Jacoby, 2010). Actuellement (13/06/2012), 40 des 201 enzymes TEM fonctionnellement caractérisées, ont cette propriété et comprennent des enzymes telles que TEM-30 et TEM-31, de même que les 6 des 141 SHV caractérisées (SHV-10). (<http://www.lahey.org/Studies>).

- **Le nouveau sous-groupe 2ber** : ce sous-groupe comprend les enzymes TEM qui combinent l'extension du spectre avec une résistance relative à l'inhibition par l'acide clavulanique. Elles sont aussi appelées CMT (Complexe Mutant TEM) et comprennent 11 TEM dont la TEM-50 (CMT-1) (<http://www.lahey.org/Studies>).

- **Le sous-groupe 2c** : ce sont des pénicillinases caractérisées fonctionnellement par leur capacité à hydrolyser la carbénicilline ou la ticarcilline au moins 60% aussi rapidement que la benzylpénicilline avec des taux d'hydrolyse de l'oxacilline et cloxacilline 50% plus faible que la benzylpénicilline. Ces pénicillinases sont généralement facilement inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam (Bush et Jacoby, 2010).

- **Le sous-groupe 2ce** : il comprend la carbénicilline RTG-4 (CARB-10) à spectre étendu récemment décrite avec une activité étendue sur le céfépime et le céfpirome.

▪ **Le nouveau sous-groupe 2d** : il inclut les β -lactamases qui se distinguent par leur capacité à hydrolyser la cloxacilline ou l'oxacilline à un taux supérieur à 50% par rapport à celui de la benzylpénicilline, elles sont donc appelées enzymes OXA. La carbénicilline peut également être hydrolysée. La plupart de ces enzymes sont inhibées par le NaCl (Bush et Jacoby, 2010).

▪ **Le nouveau sous-groupe 2de** : il comprend les enzymes hydrolysant la cloxacilline ou l'oxacilline avec un spectre étendu incluant les oxyimino- β -lactamines, mais pas les carbapénèmes. La résistance à la céftazidime est généralement plus prononcée que la résistance au céfotaxime ou à l'aztréonam. Cependant, les micro-organismes produisant quelques oxacillinases, telles que OXA-1 ou OXA-31, peuvent être sensibles à la céftazidime, mais résistants au céfépime. La majorité des enzymes 2de dérivent de l'OXA-10 par une à neuf substitutions d'acides aminés et comprennent des enzymes telles que OXA-11 et OXA-15. Elles sont le plus souvent décrites en Turquie et en France chez les isolats de *P. aeruginosa*.

▪ **Le nouveau sous-groupe 2df** : ce sous-groupe renferme les oxacillinases ayant des activités carbapénémiques et qui sont insensibles à l'inhibition par l'acide clavulanique, c'est l'exemple de l'OXA-23 et OXA-48. Ces enzymes sont définies fonctionnellement sur la base de leur capacité à hydrolyser la cloxacilline ou l'oxacilline. Les carbapénémases OXA caractérisées, ont une faible activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, avec une hydrolyse plus rapide et plus efficace sur l'imipénème que sur le méropénème. Ces enzymes sont typiquement insensibles à l'inhibition par l'acide clavulanique (Bush et Jacoby, 2010).

▪ **Le sous-groupe 2e** : les caractéristiques des céphalosporinases de ce sous-groupe comprennent leur capacité à hydrolyser les céphalosporines à spectre étendu et d'être inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam. Les céphalosporinases chromosomiques inductibles chez les espèces de la tribu *Proteae*, appartiennent à ce sous-groupe. Elles peuvent être confondues avec l'une des enzymes de type AmpC ou BLSE. Toutefois, elles peuvent être différenciées par leur faible affinité pour l'aztréonam. Le nombre d'enzymes du sous groupe 2e est resté stable depuis 1995 et ne devrait pas inclure de nouveaux membres à l'avenir, probablement parce que beaucoup de ces enzymes sont maintenant identifiées comme BLSE (Bush et Jacoby, 2010).

▪ **Le sous groupe 2f** : il englobe les carbapénémases à serine de la classe moléculaire A. Ces dernières sont décrites pour la première fois au milieu des années 80, chez un nombre limité d'entérobactéries, mais sont désormais devenues endémiques à travers le monde. Les carbapénèmes sont les substrats préférentiels de ces enzymes qui sont mieux inhibées par le

tazobactam que par l'acide clavulanique. La famille SME, IMI-1 et NMC-1 sont représentatives des enzymes chromosomiques du sous groupe 2f. Les plus importantes sont les carbapénèmases de type KPC identifiées chez *Klebsiella pneumoniae*, sur des plasmides transférables et qui ont permis leur diffusion chez d'autres bactéries. Les deux enzymes KPC-2 et KPC-3 sont les plus répandues. La différence entre ces deux enzymes se situe au niveau d'un seul acide aminé (substitution de l'His272 par la Tyr) (Bush et Jacoby, 2010).

Groupe 3

Ce groupe inclut les Métallo- β -Lactamases (M β L). Fonctionnellement, ces enzymes ont été individualisées principalement par leur capacité à hydrolyser les carbapénèmes, mais actuellement, certaines β -lactamases à sérine ont également acquis cette capacité. Contrairement aux β -lactamases à serine, les M β L ont une faible activité hydrolytique pour les monobactames et ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam, mais sont inhibées par des chélateurs métalliques tels que l'EDTA ou l'acide dipicolinique. Ces métallo-enzymes sont subdivisées en fonction de leur structure (sous-classes B1, B2, et B3) ou de leur fonction (sous-groupes 3a, 3b et 3c). Initialement, les M β L ont été identifiées comme des enzymes chromosomiques chez les bactéries à Gram-positif ou certains bacilles à Gram-négatif, tels que *Bacteroides fragilis* ou *Stenotrophomonas maltophilia* et leur nombre est demeuré relativement constant pour de nombreuses années (Bush et Jacoby, 2010).

▪ **Le sous-groupe 3a** : ce sous groupe comprend les principales M β L plasmidiques, telles que les enzymes VIM et IMP (de la sous-classe moléculaire B1), qui sont fréquemment décrites chez les bactéries non fermentaires mais aussi chez les entérobactéries. En outre, la M β L-L1 de *S. maltophilia* ainsi que les M β L de la sous-classe B3, comme CAU-1 et GOB-1, sont aussi incluses dans ce sous-groupe 3a. Des taux d'hydrolyse élevés sont observés sur les pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes, mais pas sur les monobactames. Une exception est la carbapénémase FEZ-1, avec une hydrolyse préférentielle des céphalosporines par rapport aux carbapénèmes et des pénicillines (Bush et Jacoby, 2010).

▪ **Le sous-groupe 3b** : il contient un petit groupe de M β L qui hydrolyse préférentiellement les carbapénèmes contrairement aux pénicillines et aux céphalosporines. Ces enzymes ont été difficiles à détecter lorsque les céphalosporines chromogéniques, comme la nitrocéfine, ont été utilisées pour détecter la présence de l'activité β -lactamase sur les gels d'IEF ou durant les procédures de purification.

❖ Groupe 4

Ce groupe a été auparavant cité dans la classification fonctionnelle de 1995 mais n'a pas été inclus dans le nouveau schéma de classification. Ces enzymes seraient incluses dans l'un

des groupes d'enzymes actuels, si plus d'informations à leur sujet étaient disponibles (Bush et Jacoby, 2010).

II.3. Les β -lactamases à spectre élargi

II.3.1. Généralités

Les BLSE sont des β -lactamases capables de conférer à une bactérie une résistance vis-à-vis des pénicillines, des céphalosporines de première, seconde et troisième génération ainsi que de l'aztréonam. En revanche, elles ne confèrent pas de résistance vis-à-vis des céphamycines ou des carbapénèmes. Elles sont inhibées par les inhibiteurs des β -lactamases comme l'acide clavulanique (Paterson et Bonomo, 2005). Les BLSE sont des β -lactamases de classe A et selon la classification de Bush et Jacoby, elles font partie du groupe 2be. Plusieurs β -lactamases de type OXA sont également considérées comme des BLSE à cause de l'extension de leur spectre d'hydrolyse vers les céphalosporines à spectre élargi malgré qu'elles sont mal inhibées par le clavulanate. Bien que les BLSE soient rapportées le plus souvent chez les entérobactéries, elles sont également rapportées chez d'autres espèces bactériennes tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Naas *et al.*, 2008).

II.3.2. Les différents types de BLSE

II.3.2.1. Anciennes BLSE

- **BLSE de type TEM**

Les BLSE de type TEM dérivent de TEM-1 et TEM-2 par substitution d'un ou plusieurs acides aminés. TEM est la β -lactamase la plus rencontrée chez les BGN. À ce jour (13/06/2012), plus de 201 variantes de TEM ont été décrites avec un phénotype BLSE. Fréquemment retrouvées chez *E.coli* et *K.pneumoniae*, les BLSE de type TEM sont aussi présentes chez les autres membres de la famille des entérobactéries ainsi que chez *P.aeruginosa* notamment. En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *E.aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K.pneumoniae*, et TEM-52 chez *S.enterica* et *E.coli*. Les mutations responsables de l'élargissement de spectre ont généralement lieu au niveau de 4 «hot spots» de la protéine aux positions 104, 164, 238 et 240. Il ya environ 30 TEM que ne sont pas des BLSE mais qui présentent une diminution de sensibilité aux inhibiteurs de bêta-lactamase, ce sont les TRI (pour TEM Résistantes aux Inhibiteurs) (Bradford, 2001).

- **BLSE de type SHV**

La β -lactamase SHV-1 est l'enzyme à partir de laquelle les BLSE de type SHV dérivent par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés. Elle est très fréquente chez *K. pneumoniae*, cette enzyme hydrolyse les pénicillines, les céphalosporines mais pas l'aztréonam. La transformation du phénotype non BLSE au phénotype BLSE est toujours due au remplacement de la glycine en sérine à la position 238. La mutation à la position 240 qui remplace le glutamate en lysine ne fait qu'augmenter l'activité de l'enzyme. Les BLSE de type SHV ont été détectées parmi de nombreuses entérobactéries (notamment *K. pneumoniae*) mais aussi chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp (Bradford, 2001 ; Paterson et Bonomo, 2005) A ce jour (13/06/2012), environs 166 BLSE de type SHV ont été décrites (<http://www.lahey.org/Studies/>)

II.3.2.2. Nouvelles BLSE

- **BLSE de type CTX-M**

Ces enzymes «émérgentes» représentent les BLSE les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90 (Bradford, 2001 ; Bonnet, 2004 ; Paterson et Bonomo, 2005 ; Livermore, 2007). Au niveau de leur spectre d'activité, elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime, d'où leur nom de céfotaximases. Au niveau structural, les CTX-M ne font pas partie des β -lactamases de type TEM ou SHV (< 40 % d'identité). A ce jour (13/06/2012), plus de 145 variantes de CTX-M ont été décrits. Les enzymes Toho-1/2, décrites au Japon, sont très proches structuralement des CTX-M et sont donc classées parmi celles-ci (Bonnet, 2004). A noter que certains variants (ex. CTX-M-15, CTX-M-32) avec une activité ceftazidimase élevée (CMI > 256 $\mu\text{g/mL}$) ont été décrits (mutation ponctuelle en position 240) (Bonnet, 2004 ; Rossolini *et al.*, 2008). Des travaux ont montré que les gènes plasmidiques ont des progéniteurs des enzymes naturelles chromosomiques de la classe A de *Kluyvera ascorbata* (CTX-M-2), *Kluyvera georgiana* (CTX-M-8) et *Kluyvera creocresens* (CTX-M-1). Les souches productrices de CTX-M ont été initialement rapportées de façon sporadique à la fin des années 80 au Japon (FEC-1), en Europe (MEN-1, CTX-M-1) et en Argentine (CTX-M-2). Dans le début des années 90, une diffusion massive des souches productrices de CTX-M a été décrite en Argentine et dans les pays voisins (Bonnet, 2004 ; Rossolini *et al.*, 2008). En 15 ans, la

diffusion mondiale des BLSE de type CTX-M chez les entérobactéries a explosé de façon extrêmement rapide, d'où le terme de «pandémie CTX-M» (Canton, 2006).

II.3.2.3. BLSE mineures

- **L'enzyme SFO-1** (*Serratia fonticola*) n'a été détectée qu'une seule fois dans une souche de *E. cloacae* isolée au Japon en 1988. elle hydrolyse très efficacement le céfotaxime, faiblement la céftazidime, mais pas les céphamycines et les carbapénèmes. Son activité est inhibée par le clavulanate et l'imipénème (Naas *et al.*, 2008).

- **L'enzyme BES-1** (Brazilian extended-spectrum β -lactamase) n'a été isolée qu'une seule fois à partir d'une souche de *S. marcescens* au Brésil en 1996. Elle confère un haut niveau de résistance à l'aztréonam et un niveau plus élevé au céfotaxime que pour la céftazidime. Son activité sur le céfotaxime ressemble à celle CTX-M (Naas *et al.*, 2008).

- **L'enzyme BEL-1** (Belgium extended-spectrum β -lactamase) a été identifiée dans une souche de *P. aeruginosa* en Belgique en 2004. De récents travaux suggèrent que le gène codant pour BEL-1 pourrait disséminer dans les souches de *P. aeruginosa*. Elle hydrolyse nettement mieux les céphalosporines et l'aztréonam, et son activité est inhibée par le clavulanate.

- **L'enzyme TLA-1** (Tlahuicas - tribu indienne) a été décrite dans une souche de *E. coli* isolée au Mexique en 1993. Elle hydrolyse les céphalosporines à large spectre, y compris le céfotaxime, la céftazidime, l'aztréonam et le céfépime, mais pas l'imipénème et la céfoxitine. Elle est fortement inhibée par le sulbactam.

- **L'enzyme TLA-2** est porté par un plasmide de 47 kb (pRSB101) isolé à partir d'eaux usées de traitement de plantes en Allemagne en 2002. C'est une β -lactamase de la classe A. Elle à une bonne activité sur la plupart des céphalosporines mais pas sur les pénicillines.

II.3.2.4 Autres types de BLSE

- **Les BLSE de type GES** (*Guyana Extended Spectrum β -lactamases*) sont de plus en plus isolées chez les BGN incluant *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae* (Naas *et al.*, 2008). GES-1 a été rapportée pour la première fois en 1998 chez une souche de *K. pneumoniae* isolée d'un prélèvement rectal d'un nouveau-né hospitalisé au niveau de l'hôpital de Guyenne puis en Argentine, au Brésil, au Portugal et aux Pays bas. Les GES possède un profil d'hydrolyse similaire aux BLSE de classe A, y compris l'activité sur les pénicillines et les céphalosporines à large spectre, mais pas sur les céphamycines, l'aztréonam et les

carbapénèmes, et elle est inhibée par le clavulanate, tazobactam (Poirel *et al.*, 2000, Poirel *et al.*, 2008). A ce jour (13/06/2012), il ya plus de 20 variants de GES ont été décrits

- **BLSE de type VEB** (*Vietnam Extended-Spectrum β -lactamase*) a été retrouvée en 1996 dans une souche d'*E. coli* isolée chez un patient vietnamien puis chez *P. aeruginosa* en Thaïlande. Elle possède 38% d'homologie avec PER-1 et PER-2. Plusieurs études épidémiologiques en Thaïlande et au Vietnam ont montré que respectivement jusqu'à 40 à 80% des souches d'entérobactéries et de *P. aeruginosa* résistantes à la céftazidime produisaient VEB-1. Cette enzyme est également rapportée chez *P. aeruginosa* au Koweït, en Chine, en Inde, et en Bangladesh, chez *A. baumannii* en France, en Belgique et en Argentine, chez *P. stuartii* en Algérie, chez *Enterobacter cloacae* et *Achromobacter xylosoxiadans* en France, et chez *E. coli* au Canada (Paterson et Bonomo, 2005 ; Cattoir, 2008).

A ce jour, (13/06/2012), 7 enzymes de type VEB sont identifiées (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>).

- **BLSE de type PER** (*Pseudomonas extended resistance*)

L'enzyme PER-1, initialement découverte en 1993 chez *P. aeruginosa* en Turquie, est fréquente chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. Elle a aussi été détectée chez *S. enterica* et *Proteus mirabilis* (Weldhagen, 2003). Cette enzyme est faiblement liée à d'autres BLSE et confère une résistance aux pénicillines, céfotaxime, céftazidime, et à l'aztréonam mais variablement aux carbapénèmes et aux céphamycines. Son activité est bien inhibée par le clavulanate, sulbactam et le tazobactam (Naas *et al.*, 2008). Une enzyme PER-2 ayant 86% d'homologie en acides aminée avec PER-1, a été trouvée chez les souches de *S. enterica* en Argentine en 1996 et par la suite, chez d'autres bactéries à Gram négatif (Naas *et al.*, 2008). Actuellement (13/06/2012), 07 PER sont décrites (<http://www.lahey.org/Studies/>).

- **BLSE de type OXA** : Bien que les BLSE appartiennent souvent à la classe A, plusieurs oxacillines (Classe D ou 2d) ont des propriétés de BLSE. Les β -lactamases de type OXA confèrent la résistance à l'ampicilline et à la céphalotine. Elles sont caractérisées par une forte activité hydrolytique des pénicillines M (oxacilline et cloxacilline). De plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. La plupart des oxacillines n'hydrolyse pas efficacement les céphalosporines à spectre élargi mais l'évolution par mutations ponctuelles vers l'élargissement du spectre a dû avoir lieu (comme pour les dérivées TEM et SHV). Les β -lactamases de type OXA représentent une famille phylogénétiquement très hétérogènes et les BLSE de type OXA dérivent de OXA-10, OXA-

13, OXA-2 ou sont non reliées telles que OXA-18 et -45. Bien que la plupart des BLSE dérivées de OXA-10 confèrent une résistance plus élevée au céfotaxime, les activités enzymatiques des BLSE de type OXA sont très variables. Les BLSE de type OXA sont principalement retrouvées chez *P. aeruginosa*, mais ont été aussi détectées chez d'autres bacilles à Gram négatif dont les entérobactéries (Paterson et Bonomo, 2005 ; Cattoir, 2008, Naas *et al.*, 2008). A ce jour (13/03/2012), 247 variants de BLSE de type OXA ont été identifiés (<http://www.lahey.org/Studies/>).

Durant la période allant de 5 mars 2012 au 05 mai 2012, un travail portant sur l'isolement de souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (E-BLSE) a été réalisé sur des prélèvements de selles (ou écouvillonnage rectal) recueillis auprès de 108 nouveau-nés hospitalisés dans le service de néonatalogie du CHU Nefissa Hamoud d'Alger. cette étude est à visée écologique.

Un questionnaire (**annexe II**) est soigneusement rempli d'après le dossier du malade, les informations sont recueillies auprès du personnel soignant. Ces informations sont susceptibles d'être utiles pour l'identification des facteurs de risque de l'acquisition d'E-BLSE chez les nouveau-nés.

Les souches isolées sont analysées au niveau du laboratoire de microbiologie du CHU Nefissa Hamoud d'Alger.

I.1. Milieux de culture et réactifs utilisés

L'ensemble des milieux de culture et des réactifs utilisés durant notre étude sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau N°I : Les milieux de culture et réactifs utilisés.

Milieu de culture	Utilisation
Milieu chromID TM	Sélection des E- BLSE
Gélose nutritive	Conservation et purification des souches
Gélose Mueller Hinton	Réalisation de l'antibiogramme
Gélose Mac Conkey	Réalisation de l'hodge test
Trypticase soja	Réalisation de la conjugaison bactérienne
Réactifs	Utilisation
VP1, VP2	Révélation de la formation d'acétoïne
Rouge de Méthyle	Révélation de la formation d'acides mixtes
Réactif de Kovacs	Révélation de la production d'indole
TDA	Révélation du tryptophane désaminase

La composition des milieux de culture et celle des réactifs utilisés est donnée en **annexe III**

I.2. Prélèvements

Les prélèvements rectaux sont réalisées à l'aide des écouvillons stériles chez des nouveau-nés hospitalisés au maximum 48h après leur naissance. Les prélèvements sont ensuite transportés au laboratoire.

I.3. Isolement

L'isolement a été réalisé par mise en culture des prélèvements à visé écologique sur milieu Chromogène « **chromIDTM** ». Il est spécialement conçu pour le dépistage des Entérobactéries productrices des BLSE et autres bacilles gram négatif. L'isolement et la détection des E-BLSE grâce à une base nutritive additionnée à un mélange d'antibiotiques, dont le céfpodoxime. Cet antibiotique est reconnu comme le marqueur de choix de ce mécanisme de résistance. Les boîtes sont incubées à 37°C/24h.

I.4. Purification et identification

Après incubation, les colonies ayant poussées sur le milieu chromIDTM ont été examinées et lorsque les boîtes contiennent plusieurs types de colonies, on procède à la purification en réalisant des repiquages successifs.

L'identification des entérobactéries et les autres bacilles à Gram négatif est faite sur la base des caractères biochimiques à l'aide d'un système standardisé Api 20E et Api 20NE respectivement. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne ajustée à 0.5 Mac Farland. On procède comme suit :

- On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation et on met quelque gouttes d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide et on place la galerie dans la boîte d'incubation.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, la suspension bactérienne ajustée à 0,5 Mac Farland est introduite dans les tubes et les cupules de la galerie pour les tests : VP, CIT et GEL et uniquement dans les tubes pour les autres tests. Une anaérobiose est créée pour les tests suivants : ADH, LDC, ODC, H₂S et URE en remplissant la cupule avec l'huile de vaseline.
- Enfin, la boîte est refermée et incubée à 37 C° pendant 24 h.

Les réactions produites après incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs ; VP 1, VP2, et réactif de Kovacs. La lecture de ces réactions (figure 03) se fait à l'aide d'un système Api web, le code obtenu permet d'avoir une identification en se référant au logiciel d'identification.

L'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (*Pseudomonas* et *Acinetobacter*) se fait à l'aide d'une galerie API NE, combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation.

A l'aide d'une pipette Pasteur, la suspension bactérienne saline ajustée à 0,5 Mc Farland est introduite dans les tubes et les cupules de la galerie pour les tests : GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT, PAC et uniquement dans les tubes pour les autres tests. Une anaérobiose est créée pour les tests suivants : ADH, GLU et URE en remplissant la cupule avec l'huile de vaseline. La lecture de la galerie est effectuée après 24 heures d'incubation à 29°C (selon les recommandations exigées par le fournisseur). Le tableau de lecture de la galerie est donné en **annexe IV**.

II. Antibiogramme

La sensibilité des souches aux antibiotiques est déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller-Hinton selon les recommandations du CLSI (2011).

A partir d'une culture de 18-24h, nous avons préparé une suspension bactérienne dont l'opacité de l'inoculum doit être équivalente à 0,5 Mc Farland. Cette suspension est diluée à 10^{-1} ($\sim 10^7$ UFC/ml). A partir de cette dilution, nous avonsensemencé par écouvillonnage la surface Mueller-Hinton. Par la suite, les disques d'antibiotiques sont déposés à l'aide d'une pince stérile. On incube les boîtes pendant 24h à 37°C. La liste des antibiotiques utilisés durant cette étude sont résumés dans le tableau N°II.

On mesure à l'aide d'un pied à coulisse les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques. L'interprétation en Sensible (S), Intermédiaire (I), ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CLSI (**Annexe V**). Un contrôle de qualité est effectué une fois par semaine. Il consiste à vérifier les diamètres des antibiotiques en utilisant les souches de contrôle (multisensibles). Les souches utilisées dans le contrôle de qualité se l'antibiogramme sont : *E. coli* ATCC 25922. *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Tableau N°II: Liste des antibiotiques utilisés durant cette étude.

Antibiotique	Code	Charge
céftazidime	CAZ	30 ug
ampaïcilline	AM	10 ug
Amoxicilline+Ac. Clavulanique	AMC	10ug
Céfazoline	CZ	30 ug
Céfalotine	CF	30 ug
Cefoxitine	FOX	30 ug
Céfotaxime	CTX	30 ug
Ceftriaxone	CRO	30 ug
Imipénème	IPM	10 ug
Aztreonam	ATM	30 ug
Cefepime	FEP	30 ug
Cefpirome	CPO	30 ug
Furane	FT	300 ug
Tobramycine	TM	10 ug
Amikacine	AN	30 ug
Gentamicine	GM	10 ug
chloramphénicol	C	30 ug
Ttriméthoprimé+sulfaméthoxazole	SXT	1,25 /23,7 ug
Ciprofloxacine	Cip	10 ug
Teicolanin	TEC	30 ug
TIarciline + Ac. clavulanique	TCC	75/10 ug
Fosfomycine	FOS	50 ug

II.2. Recherche de la production de β -lactamases à spectre étendu

II.2.1. DD-test (ou test de synergie)

La production d'une β -lactamase à Spectre étendu (BLSE) a été détectée par l'épreuve de synergie qui consiste à placer des disques de céfotaxime, céftazidime et aztréonam (30 μ g chacun) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'augmentin (amoxicilline-clavulanate, de 20 μ g et 10 μ g, respectivement). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'augmentin et les disques de ceftazidime, céfotaxime indique la production d'une BLSE (Jarlier *et al.*, 1988).

La disposition des disques de β -lactamines sur la gélose Mueller Hinton ainsi que la présence d'image de synergie pour la souche 1 sont données dans la figure 04.

II.2.2. DD-test sur gélose additionnée de cloxacilline

La présence d'une BLSE peut être masquée par la production d'une céphalosporinase, induite par le clavulanate chez les souches naturellement productrices de cette enzyme tel qu'il est le cas pour *Enterobacter cloacae*. Afin d'inhiber l'activité céphalosporinase, le test de synergie est refait sur la gélose Mueller Hinton additionnée de la cloxacilline (250 ou 500 mg/ml selon le niveau de la résistance). La comparaison des diamètres d'inhibition entre les boîtes avec et sans cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE ou l'hyperproduction de céphalosporinase chromosomique (Giraud-morin et Fosse, 2008).

II.3. Recherche de la production de céphalosporinases plasmidiques

Nous avons utilisé le test de Hodge modifié pour la recherche de ces enzymes. Ce test concerne uniquement les souches qui ne produisent pas naturellement des céphalosporinases chromosomique présentant une résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique et à la céfoxitine.

Il consiste à déposer un disque de céfoxitine au centre d'une boîte de Mac-Conkey préalablement ensemencé avec la souche d'*E. coli* ATCC 25922 (multisensible). Une nouvelle fois, cette même souche est ensemencée en strie radiale sur cette même boîte du centre vers la périphérie. De la même manière, sont ensemencées la souche témoin positif (souche 3005 productrice de CMY- 2) et la souche à tester. La boîte est incubée pendant 18 heures à 37°C (Lee *et al.*, 2010). La déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*E. coli* ATCC 25922 indique la présence d'une céphalosporinase, autrement dit, on aura la formation d'un trèfle.

II.4. Détermination des CMI par E-test

E-test est une technique quantitative pour la détermination sur milieu gélosé de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'agent antibactérien vis-à-vis des bactéries et pour la détection des mécanismes de résistance. Il s'agit d'une mince bandelette de plastique inerte et non poreuse calibrée avec une échelle de CMI exprimés en µg/ml et un code pour identifier l'antibiotique. Un gradient prédéfini de concentration de l'antibiotique comprenant 15 dilutions correspondant aux méthodes de CMI conventionnelles.

Lorsque une bandelette E-test est appliquée sur la surface d'une gélose ensemencée, le gradient de concentration, continu et prédéfini, établi le long de la bandelette reste stable pendant une longue période. Après l'incubation, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le

long de la bandelette est formée. La CMI est lue directement à partir de l'échelle de graduation et exprimée en µg/ml au point où l'ellipse d'inhibition croise la bandelette.

III. Transfert des gènes de résistance par conjugaison

La conjugaison a été réalisée pour les souches 33A,61, 77C productrices de BLSE et/ou de céphalosporinases. *Escherichia coli* C600 résistante à la rifampicine et sensible à tous les autres antibiotiques, a été utilisée comme souche réceptrice. Le transfert des gènes de résistance a été réalisé en suivant le protocole préconisé par Touati (2006).

- On cultive les souches donatrices et la souche réceptrice dans 10 ml de bouillon trypticase-soja (TSB).
- On incube à 37°C au bain-marie agitateur pendant une nuit (18h).
- On prélève 200µl de la culture de la souche réceptrice et donatrice qu'on ajoute à 10ml de bouillon trypticase soja (dilution de 1/ 50^{ème}) puis on incube à 37°C pendant 3 heures sous agitation forte.
- Dans un erlen stérile, on mélange 2ml de la culture de la souche réceptrice avec 1ml de la culture de la souche donatrice et 1ml du bouillon trypticase soja (un rapport 2V/V/V).
- On incube le mélange pendant 2 heures.
- Le milieu de sélection des transconjugants est la gélose Mueller Hinton (MH) additionnée de deux antibiotiques ; l'un est le céfotaxime à une concentration finale de 2µg/ml, qui correspond au caractère suspecté plasmidique de la souche donatrice et l'autre, est la rifampicine à une concentration finale de 250 µg/ml, qui est un caractère de résistance chromosomique de la souche réceptrice.
- Des boîtes témoin contenant de la gélose MH additionnée de rifampicine (culture des souches donatrices) et une autre boîte contenant le milieu MH additionné de cefotaxime (culture de la souche réceptrice) sont préparées afin de vérifier la sélectivité du milieu.
- On étale 200µl du mélange avec un râteau étaleur sur la surface des boîtes de sélection et on ensemence la souche réceptrice et donatrice séparément sur les boîtes témoins.
- On incube les boîtes témoins et de sélection à 37°C pendant 18 heures.
- On note la présence des colonies des transconjugants sur la gélose de sélection.

L'étude de la résistance des transconjugants aux antibiotiques est réalisée par la méthode de l'antibiogramme standard en prélevant avec une cure dent stérile, une colonie (du

transconjugant) qu'on dissocie dans 1ml d'eau physiologique stérile. A partir de cette dernière, on réalise l'antibiogramme.

IV. Exploitation des résultats

Les résultats ont été saisis sur ordinateur, et l'analyse a été réalisée grâce à l'utilisation du logiciel statistique SPSS.08.

I. Recueil de souches de bacilles à Gram négatif isolées

Au cours de notre étude qui s'est déroulée pendant la période allant du 5 mars à 5 Mai 2012 (2 mois), nous avons effectué 108 prélèvements à visé écologique dans le service de néonatalogie au niveau du CHU de Nefissa Hamoud d'Alger. Le nombre des souches de bacille à Gram négatif collectées est de 169 souches dont 159 souches d'*Enterobacteriaceae*, 5 de *P. aeruginosa* et 5 d'*A. baumannii* (figure 2).

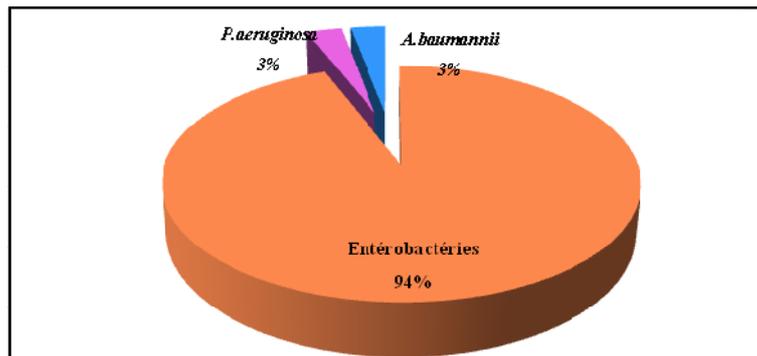


Figure 02: Répartition des souches des bacilles à Gram négatif isolées

L'acquisition des BLSE est un terme générique qui peut regrouper à la fois l'infection et la colonisation. En règle générale, les BLSE sont des β -lactamases plasmidiques conférant une résistance vis-à-vis les β -lactamines. Les souches productrices des BLSE sont considérées comme un problème majeur de santé publique car ces dernières représentent une résistance croisée à d'autres familles d'antibiotiques tels que les aminosides. 94 % des bacilles à Gram négatif isolés étaient des entérobactéries.

Les espèces de *P. aeruginosa* et d'*A. baumannii* sont des germes opportunistes incriminés dans les infections nosocomiales (Mansour et al., 2008). Il est à noter que les taux faibles d'isolement des *Pseudomonas aeruginosa* ne concordent pas avec les travaux de Gérardin et al. (2006), et qui montrent que tous les enfants atteints d'infections nosocomiales après colonisation digestive sévère à *Pseudomonas aeruginosa* étaient des grands prématurés et 86 % d'entre eux avaient un poids de naissance inférieur à 1500 g. Cela peut être expliqué au fait que la majorité des nos prélèvements ont été effectués chez les nouveau-nés séjournant deux à trois jours dans la salle d'observation ou la ventilation mécanique n'influence plus sur l'acquisition d'une *P. aeruginosa*.

I.1. Répartition des souches d'entérobactéries isolées par espèce

Dans notre étude, nous avons utilisé un milieu chromogène sélectif « chromIDTM ». Pour le criblage des bactéries à Gram négatif productrices de BLSE. La lecture sur ce milieu est basée sur l'aspect et la couleur des colonies (La couleur rose : signifie la présence d'*E. coli*, La couleur bleue : signifie la présence d'autres espèces a titre exemple *K. pneumoniae*).

La répartition des souches obtenues est présentée sur la figure 03.

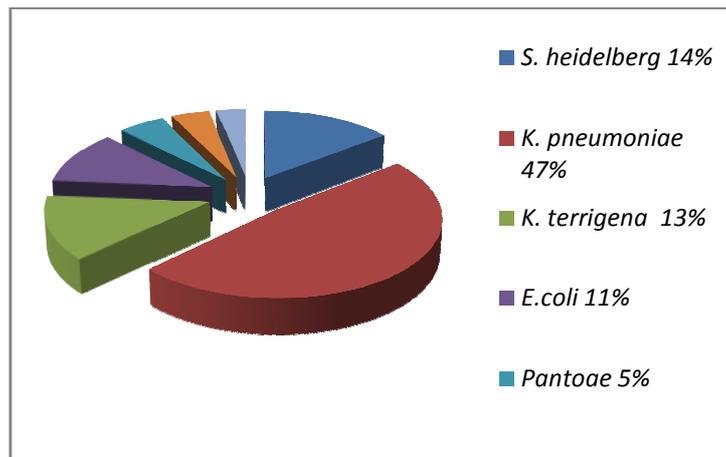


Figure 03: Répartition des souches des bacilles à Gram négatif par espèce.

On y note une prédominance des *Klebsiella pneumoniae* avec un taux avoisinant 50 %. On trouve néanmoins d'autres espèces, différentes à savoir : *Salmonella heidelberg* (14%), *Klebsiella terrigena* (13%), *E. coli* (11%), *Pantoae* sp (5%), *Klebsiella oxytoca* (4%), et les autres espèces à un taux de 3% (*S. marssesens*, *S. fonticola*, *enterobacter cloacae* et *Klyvera Spp*)

Les espèces isolées durant cette étude sont pratiquement les mêmes que celles citées dans l'étude de Cézario (2004). Les résultats obtenus durant notre étude sont différents de ceux obtenus dans les études citées par Andrianarivelo *et al.* (2010), qui ont observé la prédominance d'*E. coli* avec un taux de 50% suivi de *K. pneumoniae*. L'étude de Luciene *et al.* (2008) portant sur les infections nosocomiales causées par *K. pneumoniae* ont montré que *K. pneumoniae* est la plus isolée dans le service de néonatalogie en Brésil.

Le taux de colonisation digestive par *Enterbacter cloacae* enregistré durant cette étude n'excédant pas 1,49 %, alors qu'un taux de 41,7% pour la même espèce a été rapporté par Cézario (2004) dans son étude.

I.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques chez les entérobactéries isolées

94 % (159/169) des souches d'entérobactéries productrices de BLSE ont été isolées sur le milieu chromogène à partir de la flore fécale de nouveau-nés (figure 05). 146 souches ont présenté une image de synergie sur le milieu MH, tandis que d'autres ont été ensemencées sur le milieu Muller et Hinton additionné à la cloxacilline afin de récupérer l'image de synergie.

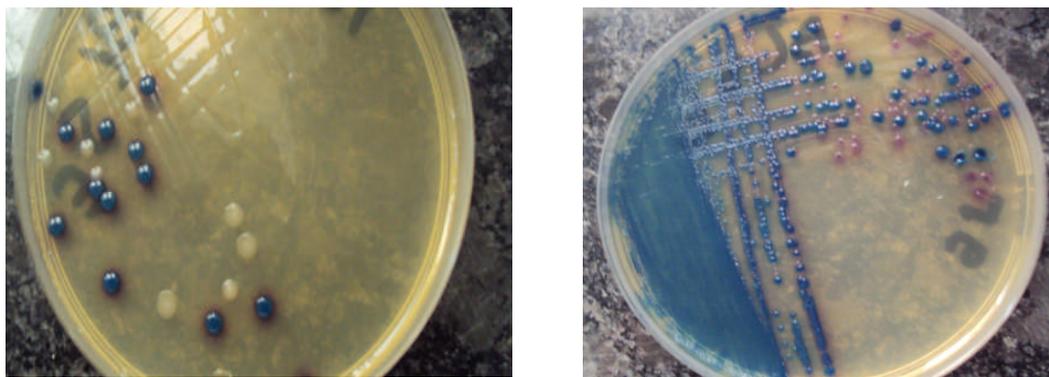


Figure 04 : aspect de quelques colonies sur un milieu chromID^T:

Des résultats similaires ont été obtenus par Tonkic et *al.* (2005) dans l'étude portant sur la prévalence des *K. pneumoniae* et *E. coli* productrices des BLSE au niveau de l'hôpital universitaire en Croatie (74%).

La sensibilité des souches vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques est donnée dans la figure 06.

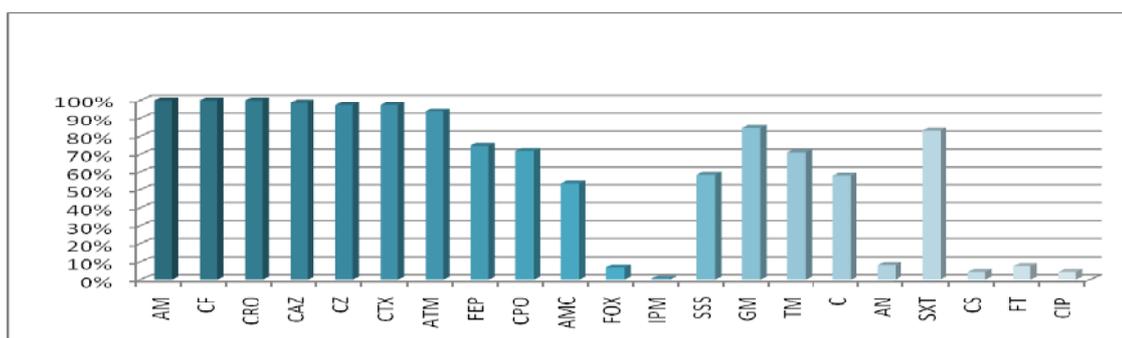


Figure 05: Les taux de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries

Les souches qui ont été isolées dans notre étude montrent des taux de résistance élevés vis-vis les β -lactamines. Aucune résistance n'a été enregistrée vis-à-vis de l'imipénème. Les taux de résistance des E-BLSE sont de 84,42% la gentamycine, 71,06 % à la tobramycine, 4% à la Ciprofloxacin, 83,01% à la Sulfaméthoxazol-triméthoprim, 58,4% aux sulfamides, 7,54% aux furanes et 4,40 % à la colistine. La figure suivante montre les taux de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries.

Cette résistance croisée est due au fait que les plasmides portant les gènes codant pour les BLSE, pourraient porter également des gènes de résistance aux autres antibiotiques (Gniadkowski, 2001 ; Stürenburg et Dietrich, 2003).

I.2.1. Confirmation de la production des BLSE

Le profil de résistance aux antibiotiques des souches isolées est donné en **annexe VI**. Dans le but d'évaluer l'efficacité de ce milieu, un autre test phénotypique de détection de BLSE est utilisé durant cette étude, il s'agit du test de synergie.

I.2.1. DD-test

Le DD-test, effectué pour les souches d'entérobactéries isolées sur MH a révélé la présence d'une image de synergie chez 92,3% des souches d'entérobactéries ce qui confirme la présence d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE), et que 7,69 % sont négatives pour ce test. La disposition des disques de β -lactamines sur la gélose Mueller Hinton ainsi que la présence d'image de synergie pour la souche 1 sont données dans la figure 06.

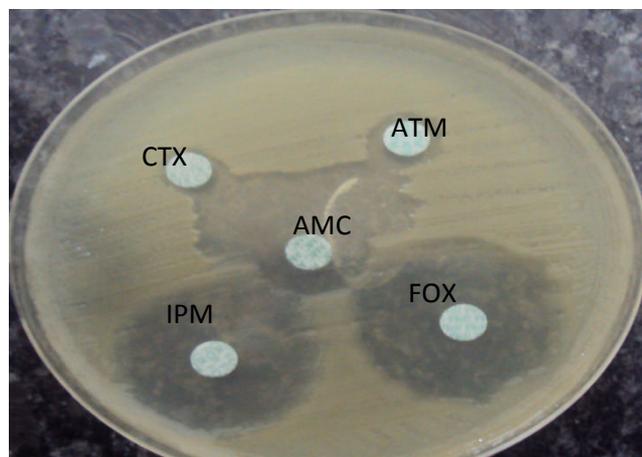


Figure N°06 : Disposition des disques d'antibiotiques dans le cas du DD-test

I.2.2. DD-test sur gélose Mueller-Hinton additionnée de cloxacilline

Les souches testées sur géloses Mueller Hinton additionnée de cloxacilline à 250 µg/ml sont celles qui ont été poussées sur le milieu chromogène et qui n'ont pas présenté l'image de synergie lors du DD-test, ces souches ont développé une résistance acquise vis- vis la céfoxitine. L'inhibition des céphalosporinases par la cloxacilline peut révéler la présence de BLSE.

L'antibiogramme standard de la souche *E.cloacae* 107, sur gélose MH à gauche et sur gélose MH à la cloxacilline 200µg/ml à droite, démontre l'hyperproduction d'une céphalosporinase chromosomique (figure 07).

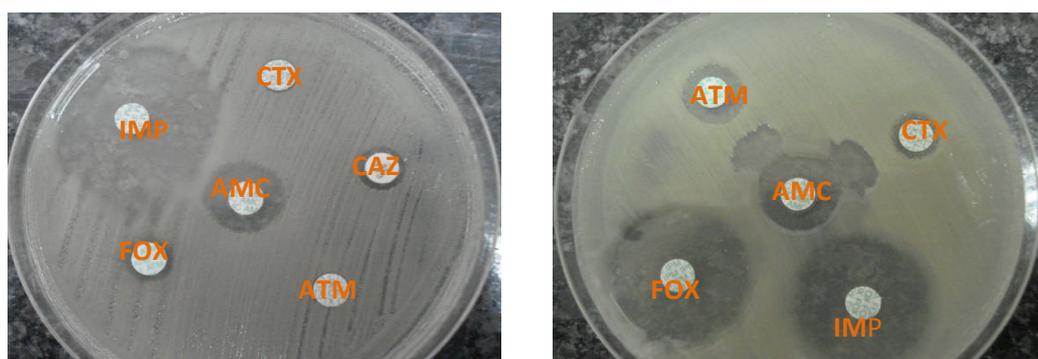


Figure 07: DD-test sur gélose MH additionnée de la cloxacilline.

Tableau N°III : Comparaison entre les diamètres en mm des zones d'inhibition sur gélose Mueller-Hinton et Mueller-Hinton additionné de cloxacilline.

Code	Mueller-Hinton					Mueller-Hinton + cloxacilline				
	CTX	ATM	AMC	FOX	IPM	CTX	ATM	AMC	FOX	IPM
18 <i>K. pneumoniae</i>	12	16	14	16	31	13	16	16	16	30
23A <i>K. pneumoniae</i>	16	23	10	13	28	17	22	23	15	29
30A <i>E. coli</i>	14	18	10	12	29	16	19	16	23	30
33B <i>K. pneumoniae</i>	8	8	14	8	32	12	12	16	8	31
34A <i>S. heidelberg</i>	8	19	16	8	32	8	18	15	15	32
55B <i>K. pneumoniae</i>	8	8	12	14	28	8	10	14	15	28
55C <i>K. pneumoniae</i>	8	8	11	14	25	10	9	11	26	29
57C <i>K. pneumoniae</i>	8	8	12	14	28	9	14	15	25	28
61 <i>Serratia fonticola</i>	23	18	15	13	34	23	18	13	20	33
73A <i>K. pneumoniae</i>	31	33	11	11	28	32	33	13	25	28

Huit souches ont été retrouvées sensibles à la céfoxitine (18, 23A, 30A, 34A, 55C, 57C, 61 et 73A), et elles ont présenté une image de synergie, la résistance des souches à la céfoxitine est due dans la majorité des cas à la production d'une céphalosporinase qui peut être le résultat soit d'une hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique, soit de l'acquisition d'une céphalosporinase plasmidique (Touati, 2006). Les souches 33B et 55B n'ont pas donné une image de synergie, ceci nous laisse penser que, probablement, la concentration en cloxacilline utilisée n'a pas été suffisante pour inhiber les céphalosporinases et laisser s'exprimer les BLSE, l'absence d'une synergie peut être également due à l'imperméabilité membranaire de la cloxacilline.

Donc, nous avons isolés 159 d'E-BLSE. Le DD-test a été réalisé afin de confirmer la présence des BLSE, 146 ont présenté une image de synergie contre 13. Le test de synergie additionné à la cloxacilline a été réalisé dont le but de récupérer l'image de synergie qui a été masquée par la production d'une céphalosporinase hyperproduite, ce dernier a récupéré l'image de synergie pour 08 souches. D'après la combinaison de ces trois tests, nous remarquons que 154/159 des E-BLSE ont présenté l'image de synergie, 5 alors souches d'entérobactéries n'ont pas présenté cette image, cela est du soit à l'imperméabilité membranaire soit à la faible concentration en cloxacilline.

I.2.3. Production de céphalosporinases plasmidiques

L'image de trèfle a été bien visible avec les souches d'entérobactéries testées sur le DD-test additionné à la cloxacilline, ce qui indique que toutes les souches produisent une céphalosporinase plasmidique.

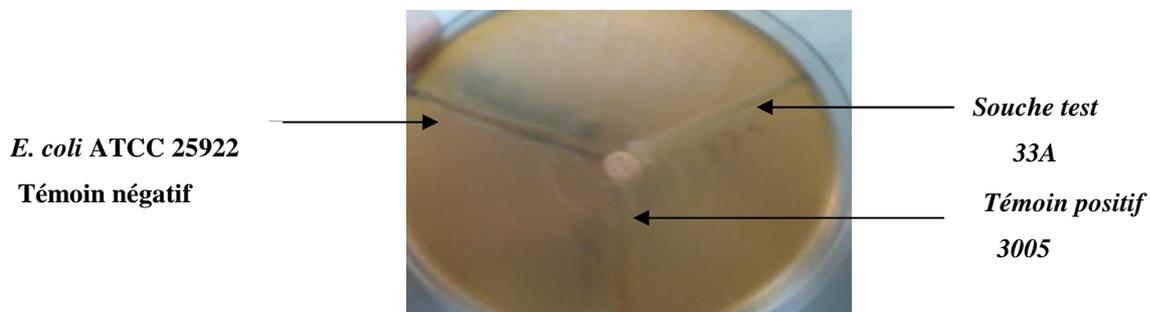


Figure N°08: Production de céphalosporinases chez *K. pneumoniae*.

I.3. Sensibilité des souches de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques

I.3.1. Sensibilité des souches de *Klebsiella pneumoniae* aux β -lactamines

Au cours de cette étude, nous avons isolé 76 souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE, la figure suivante donne les taux de résistance des souches de *K. pneumoniae* vis-à-vis les bêta-lactamines testées.

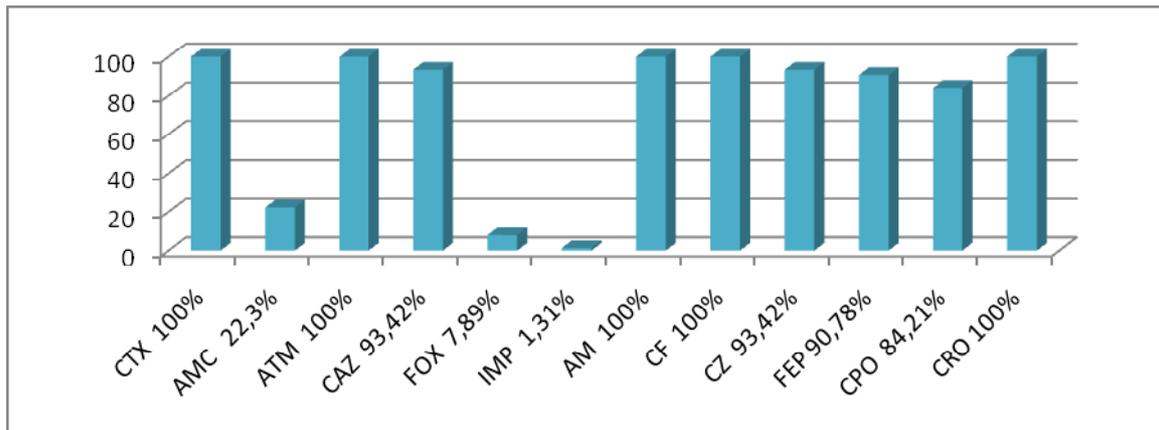


Figure 09 : Taux de résistance aux β -lactamines chez *K. pneumoniae*.

Les souches sont toutes résistantes à la céfotaxime, l'Aztréonam, l'ampicilline, la céfalotine et le céftriaxone. Des taux de résistance élevés sont obtenus pour les antibiotiques suivants : la céftazidime (93,42), la céfazoline (93,42%). L'activité de la céfoxitine vis-à-vis les souches reste appréciable (7,89%). Une seule souche est retrouvée résistante à l'imipénème (1,31%).

La détection de phénotypes de résistance des isolats de *K. pneumoniae* vis-à-vis des bêta-lactamines est réalisée selon le type de BLSE impliquées dans l'hydrolyse des bêta-lactamines. Les BLSE de type CTX-M se définissent par leur capacité d'hydrolyser les C4G et détenant une activité accrue vis-à-vis du céfotaxime, tandis que les céhalosporinases de type AmpC sont responsables de l'hydrolyse de la céfoxitine (Giraud-Morin et Fosse, 2003).

La majorité des *K. pneumoniae* isolées produisent probablement des BLSE de type CTX-M. Des études à l'échelle nationale ont montré que les CTX-M du groupe 1 (CTX-M-15 et CTX-M-3) sont les plus isolées en Algérie (Touati et al., 2006). De nombreuses études révèlent la progression continue à l'échelle mondiale de ce type de résistance et dénoncent actuellement plus particulièrement, les BLSE de type CTX-M. Des cas de *Klebsiella*

pneumoniae productrices de BLSE de type CTX-M-15 sont aussi rapportés dans beaucoup de pays comme l'Italie, l'Angleterre, le Portugal, la Suède et la Russie.

Des études épidémiologiques suggèrent que l'utilisation des céphalosporines de troisième génération a contribué à l'émergence des *K. pneumoniae* productrices des BLSE. De nombreuses études rapportent que *Klebsiella pneumoniae* semble être le producteur numéro 1 de BLSE, suivie d'*E. coli* (Gniadkowski, 2001, Ang *et al.*, 2004, Moustououi *et al.*, 2004 ; Demir, 2008 ; Andriatahina *et al.*, 2010). Dans notre étude, *K. pneumoniae* ne fait pas exception à la règle représentant 47% des souches isolées.

L'étude réalisée par Chong *et al.*, 2011 dans un hôpital japonais a montré que *K. pneumoniae* est la plus fréquemment isolée avec un phénotype de CTX-M-2 et CTX-M-9. Des groupes spécifiques du génotype CTX-M sont présents dans chaque région et pays. Les groupes CTX-M-1 et CTX-M-9 se trouvent principalement dans les pays européens et asiatiques. Le principal groupe observé au Japon est le groupe CTX-M-2 (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008 ; Oteo *et al.*, 2009).

I.3.2. Sensibilité des souches de *K. pneumoniae* aux aminosides

Sur 76 souches de *K. pneumoniae*, 72 souches sont résistantes à la gentamycine (94,73), 65 souches sont résistantes à la tobramycine (85,52) et 7 sont résistantes à l'amikacine (9,21%).

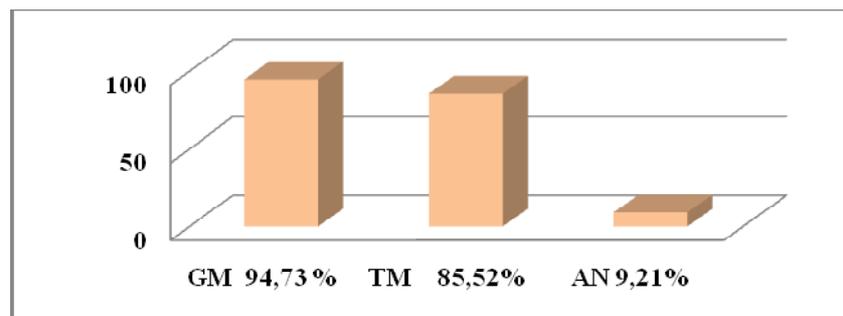


Figure10 : Taux de résistance aux aminosides chez les *K. pneumoniae*.

Le taux de résistance à la gentamycine noté chez les souches de *K. pneumoniae* est significativement supérieur à ceux rapportés par Tonkic *et al.* (2005), Kaftandzhieva *et al.* (2009), Andriatahina *et al.* (2010), Ruiz de Alegria *et al.* (2011). Ces études portant sur la colonisation digestive de *K. pneumoniae* et *E. coli* dans le service de néonatalogie et le service pédiatrie. D'après Andriatahina *et al.*, 76,1%, des *K. pneumoniae* ont été

retrouvées résistantes à la gentamicine, l'étude de Tonikic a donné un taux de résistance qui est égale à 78.4%.

Il est à noter que les souches de *K. pneumoniae* isolées présentent une faible résistance vis-à-vis l'amikacine. Des résultats similaires sont rapportés par Ruiz de Alegría *et al.* (2011), Andriatahina *et al.* (2010). D'autres études qui ont été réalisées par Krawczyk *et al.* (2005), Kaftandzhieva *et al.* (2009) donnent des taux de résistance trop élevés vis-à-vis l'amikacine.

La résistance aux aminosides est due à plusieurs mécanismes dont le plus fréquent est la production d'enzymes modificatrices telles que l'aminoside acétyl transférase (AAC) et l'aminoside nucléotidyltransférase (ANT), d'autres mécanismes peuvent être en cause, tels que l'altération de la cible, l'imperméabilité membranaire ou l'efflux de l'antibiotique (Courvalin *et al.*, 2006).

La détermination phénotypique des mécanismes de résistance aux aminosides est faite, selon Neonakis *et al.* (2003), selon la résistance à la gentamicine, la tobramycine et l'amikacine.

- ❖ L'enzyme AAC (3') qui confère la résistance uniquement à la gentamicine, est probablement présente chez les souches : 70B, 73B, 77A, 78B, 83B, 90 et 92.
- ❖ l'enzyme AAC (3)-II qui confère la résistance à la gentamicine et la tobramycine, est probablement présente chez les souches : A1, 2, 3, 6, 7, 9, A12, 14, A15, A16, B16, A17, B17, 18, 19, 20, B23, 24, A26, B26, 28, B30, A31, A33, A36, B36, A40, C40, B41, D41, F43, B44, C46, F48, B51, A54, A55, B55, C55, C56, C57, 68, 69, B71, 75, A78, C84, 93, A95, A96, A97, B97, 98, 99, 100, A105 et B107.

I.3.3. Sensibilité des souches de *K. pneumoniae* aux quinolones

La consommation des quinolones de deuxième génération a été prouvée comme un facteur de risque d'acquisition de souches productrices de BLSE, notamment celles qui produisent des CTX-M. La résistance acquise aux quinolones est le plus souvent le résultat d'une mutation chromosomique au niveau de l'ADN topo-isomérase IV et la gyrase (Courvalin *et al.*, 2006).

Dans notre étude, nous avons remarqué que toutes les souches de *K. pneumoniae* sont sensibles à la ciprofloxacine, à l'exception des souches B33 et 75. Les études réalisées par Krawczyk *et al.* (2005) Kaftandzhieva *et al.*, (2009) portant sur le dépistage des *K.*

pneumoniae et *E. coli*, ont montré que les taux de résistance à la ciprofloxacine ne dépassent pas 10%. Nos résultats ne concordent pas avec ceux obtenus par Andriatahina *et al.*, (2010) dont la moitié des souches isolées ont été retrouvées résistantes.

I.3.4. Sensibilité des souches de *K. pneumoniae* aux sulfamides

Les sulfamides sont des antibiotiques à large spectre, souvent utilisés en association avec le triméthoprime. Il est à noter que le taux de résistance des souches de *K. pneumoniae* isolées dans cette étude est de 88,15% vis-vis SSS, Ce résultat est très proche de celui obtenu par Andriatahina *et al.* (91,3%), l'étude réalisée par Kaftandzhieva *et al.* (2009) a rapporté un taux de résistance qui est égale 50%.

I.3.5. Sensibilité des souches de *K. pneumoniae* aux autres antibiotiques

La plupart des souches productrices de BLSE de type CTX-M, sont non seulement résistantes à la majorité des β -lactamines mais également à de nombreux antibiotiques d'autres familles tels que les fluoroquinolones, les aminosides, le cotrimoxazole, les tétracyclines ou encore le chloramphénicol (Ruppé, 2010). L'association de la résistance de ces molécules a été signalée par de nombreux auteurs. Dans notre étude, 82,89% des *K. pneumoniae* ont été retrouvées résistantes vis-à-vis triméthoprime sulfamidoxazole

La colistine, le furane et le chloramphénicol révèlent des taux de résistance de 0%, 10,52% et 69,73% respectivement.

I.4. Détermination des CMI

La CMI à été déterminée uniquement pour les souches de *K. pneumoniae*. Une seule souche qui a été testée lorsque plusieurs souches présentent le même profil de résistance. Les résultats obtenus sont donnés en **annexe VII**. La figure 11 donne les CMI des *K. pneumoniae*.



Figure N°11 : CMI de la céfotaxime et céftazidime chez *K. pneumoniae*

Les résultats de la détermination des CMI montrent une variabilité entre les souches et leurs réponses aux différents antibiotiques testés. Les valeurs de CMI sont comprises entre 8 et 256 ug/ml.

-Les CMI de la céftazidime varie de 16 à 32 $\mu\text{g/ml}$.

-Toutes les souches semblent être plus résistante vis-à-vis la céfotaxime avec une CMI supérieur à 256 $\mu\text{g/ml}$. La CMI du céfotaxime est largement supérieur à celle de la céfoxitine, l'augmentin et l'aztreonam. Ce constat est une caractéristique des souches productrices de BLSE de type CTX-M.

1.5. Transfert génétique par conjugaison

La conjugaison à été réalisée pour trois souches résistantes à la céfotaxime et sensibles à la rifampicine. Le transfert par conjugaison du phénotype de résistance des souches donatrices n'a été observé sur la gélose de sélection (MH+RA+CTX) donc aucune croissance n'a été remarquée sur cette dernière car toutes les souches ont été sensibles à la céfotaxime et à la rifampicine, donc le transfert de la résistance n'a pas lieu.

II. Caractéristiques de la population

L'analyse statistique par le logiciel SPSS 8.0 a permis de séparer la population en deux groupes : celui des enfants colonisés et non colonisés par les E-BLSE. La majorité des nouveau-nés sont colonisés avec un taux de 73% (79/108) contre 27% (29/108). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Mammina *et al.* (2007) dans leur étude portant sur la prévalence des entérobactéries productrices de BLSE au niveau de service de néonatalogie et qui donne un taux de 72,4 %.

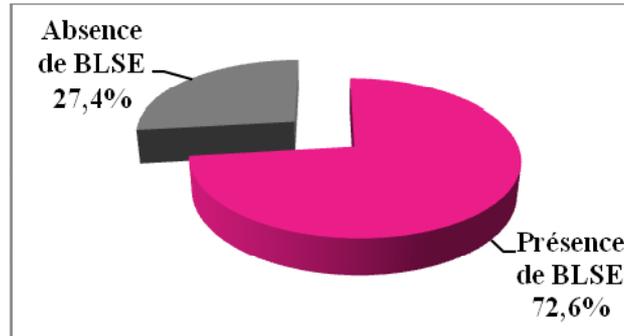


Figure12 : Répartition en fonction du portage par les BLSE.

❖ Sexe

La population étudiée est caractérisée par un sex-ratio (homme/femme) de 1,25 (60/48) ; 55,6 % des prélèvements sont issus de patients du sexe masculin contre 44,4 % chez le sexe féminin. Cette répartition est illustrée par la figure suivante.

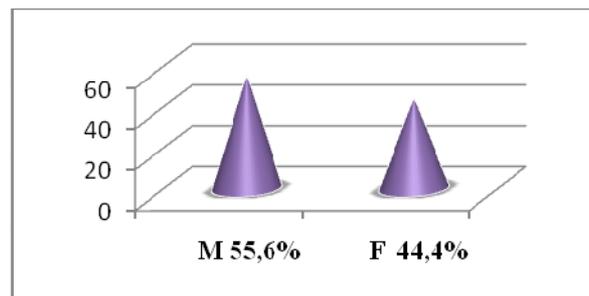


Figure 13: Répartition de la population selon le sexe des nouveau-nés .

❖ Mode d'accouchement

Selon le mode d'accouchement, la population est répartie en deux catégories : 46 % (50/108) des prélèvements sont issus de nouveau-nés venus au monde par voie haute contre 54 % (58/108) des prélèvements issus de nouveau-nés par voie basse.

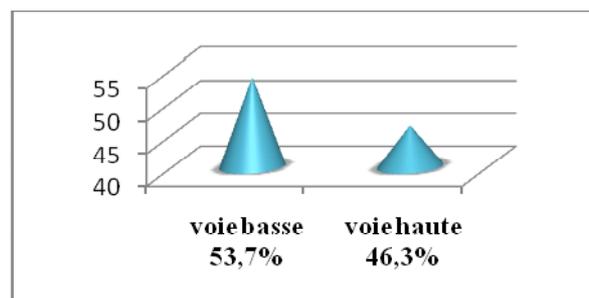


Figure 14: Répartition selon le mode d'accouchement des nouveau-nés.

❖ **Antibiothérapie**

63,9 % (69/108) des prélèvements sont issus des nouveau-nés qui ne sont pas sous une antibiothérapie.

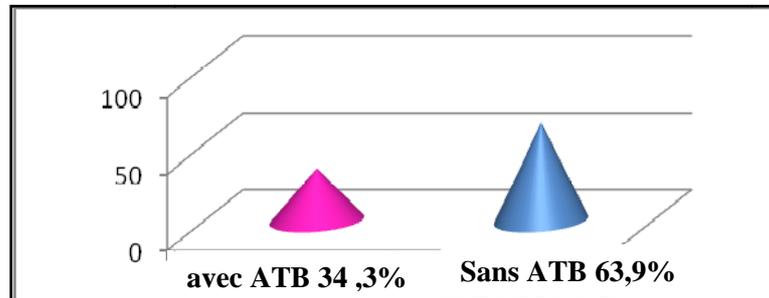


Figure 15 : Répartition selon l'antibiothérapie administrée .

❖ **Salle**

Notre étude a été réalisée dans un service de néonatalogie, et qui est composé de deux salles qui sont :

- La salle post-accouchement qui représente la salle d'observation ou la durée d'hospitalisation des nouveau-nés est courte 4 jours au maximum.
- salle de réanimation qui est composée de quartes niveaux, et qui sont : le niveau A, niveau 2A, niveau B et le niveau de photothérapie. Les prélèvements ont été effectués dans tous le service, la figure suivante montre la répartition des prélèvements en fonction des salles.

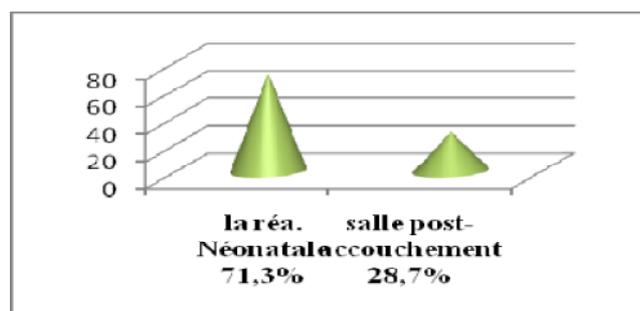


Figure 16: Répartition de la population en fonction des salles

71,3 % (77/108) des prélèvements sont issus des nouveau-nés hospitalisés dans la salle d'observation (ou post-accouchement).

❖ **Actes invasifs**

La figure suivante montre la répartition des nouveau-nés selon qu'ils soient sous cathéter ou sondage.

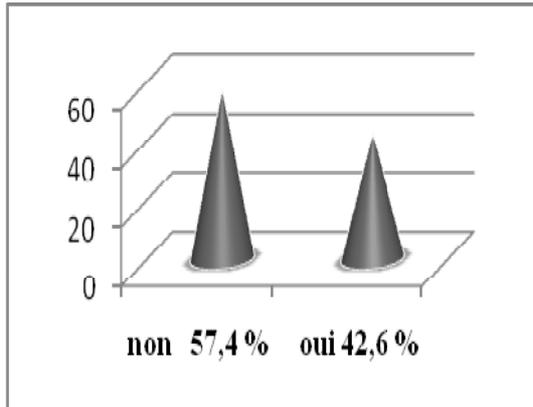


Figure 17 : Répartition selon le sondage

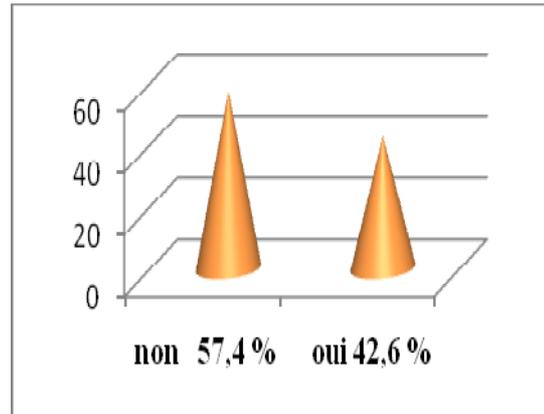


Figure 18: Répartition selon le cathéter

❖ Les prématurés

Selon le terme de naissance, la population est partagée en deux catégories (nouveau-nés à terme et les prématurés). Les prélèvements sont effectués majoritairement chez les nouveau-nés à terme. La figure suivante représente la répartition de ces prélèvements.

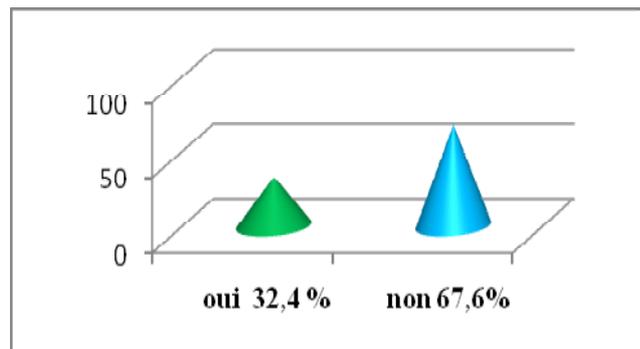


Figure 19: Répartition selon les prématurés

❖ Le poids et la taille

La taille et le poids moyens des nouveaux nés sont respectivement égaux à 48,45 cm, 3238,89g.

❖ Le moment du prélèvement

D'après la figure, nous remarquons que 82,1% (88/108) des prélèvements sont effectués après 24 heures d'hospitalisation, tandis que 17,9% (20/108) des prélèvements sont prélevés au bout de quelques heures justes après l'accouchement.

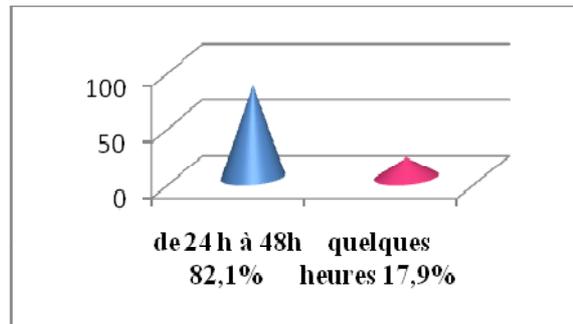


Figure 20 : Répartition selon le moment du prélèvement

III. Analyse statistique des facteurs de risque de colonisation digestive par E-BLSE

Plusieurs facteurs ont été étudiés afin d'évaluer le risques d'acquisition des E-BLSE. Pour ce faire, nous avons effectué une analyse statistique en utilisant le logiciel SPSS 8.0.

III.1. l'acquisition des BMR et facteurs de risques

Les tests statistiques étaient effectués à l'aide du programme SPSS 8.0. Les différences entre les variables qualitatives et quantitatives sont analysées par le test Khi-deux et le tableau croisé. Les facteurs de risque relatifs sont calculés (Odds ratio). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative. Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau suivant.

Tableau N°IV : Les P value et l'odds ratio pour chaque facteur de risque.

Facteurs	Test du Khi-deux				Estimation du risque		
	Effectif théorique minimum	valeur	ddl	Signification	Odds ratio	IC à 95%	
						Inférieure	Supérieure
Sexe	12,86	0,664	1	0,415	1,437	0,6	3,442
Accouchement	13,68	1,026	1	0,311	1,557	0,659	3,675
Antibiothérapie	10,32	0,591	1	0,442	0,708	0,293	1,71
Salle	8,48	1,456	1	0,228	0,574	0,232	1,422
Sondage	8,21	1,824	1	0,177	0,536	0,215	1,334
Cathéter	12,58	1,127	1	0,288	0,629	0,266	1,485
Prématuré	9,58	4,202	1	0,04	0,402	0,166	0,973
Moment du prélèvement	5,2	0,013	1	0,91	0,938	0,305	2,885

❖ **Le sexe**

D'après la figure suivante, nous remarquons que les taux de colonisation par les E-BLSE sont presque égaux, d'où la nécessité du test khi-deux qui nous permet d'exclure ce facteur parmi ceux qui sont considérés comme des facteurs de risque d'acquisition (la P value est largement supérieur à 0,05 et OR. appartient à l'intervalle de confiance à 95%).

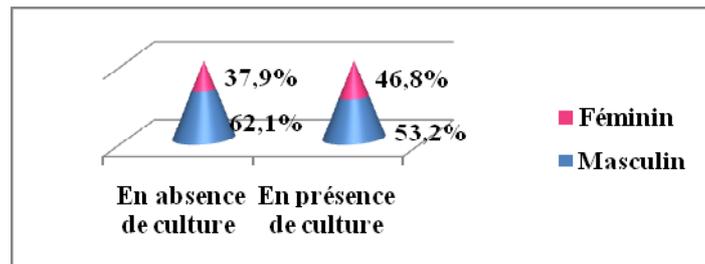


Figure 21 : Répartition de la colonisation en fonction du sexe.

❖ **Le mode d'accouchement**

Les prélèvements sont effectués chez les nouveau-nés venus au monde par voie basse et par césarienne. D'après le test statistique Khi-deux et le tableau croisé, on note que le mode d'accouchement n'est pas un facteur d'acquisition des E-BLSE (la P value >alpha et OR. appartient à l'intervalle de confiance à 95 %). La figure suivante donne la colonisation par les E-BLSE en fonction de mode d'accouchement.

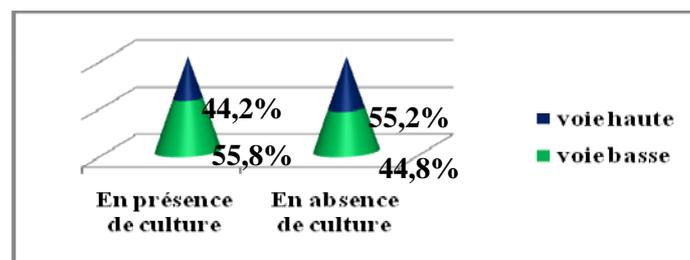


Figure 22: Répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de mode d'accouchement

❖ **L'antibiothérapie**

Le test Khi-deux a montré que la consommation d'antibiotiques à large spectre n'influence plus sur l'acquisition des E-BLSE (P value >alpha). La figure suivante donne répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de l'antibiothérapie

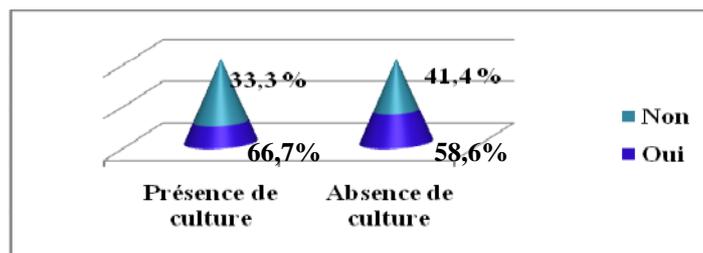


Figure 23 : Colonisation par les E-BLSE en fonction de l'antibiothérapie

❖ La salle

Durant cette étude, la majorité des prélèvements sont effectués dans la salle post-accouchement. Le test khi-deux a montré que la salle n'est pas un facteur de risque d'acquisition des E-BLSE (P value > 0,05 et OR est inclut dans l'intervalle de confiance à 95%). La figure suivante donne la répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de salle.

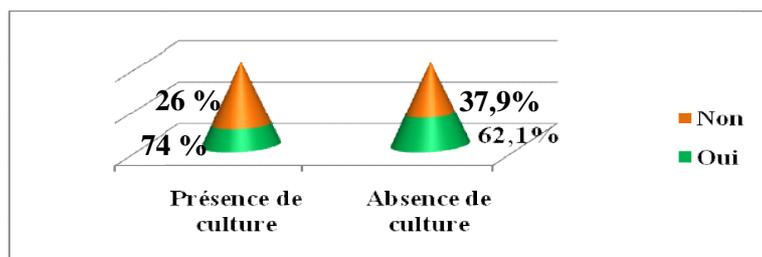


Figure 24 : Répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de la salle

❖ Le sondage

La plupart des prélèvements (72%) ont été réalisés chez les nouveau-nés non sondés. Selon le test Khi-deux, le sondage n'est pas un facteur de risque d'acquisition des E-BLSE (P value > 0,05 et OR fait partir de l'intervalle de confiance à 95%). La figure suivante illustre la répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de sondage.

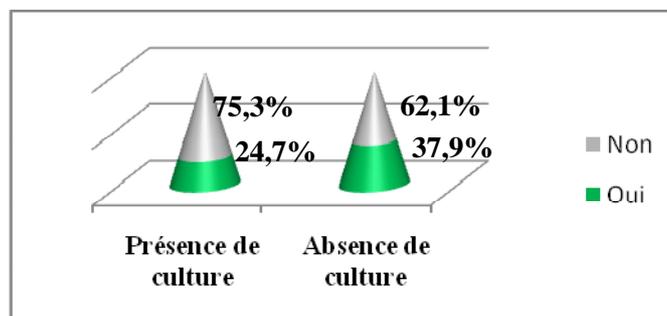


Figure 25: Répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de sondage.

❖ **Le cathéter**

Le test Khi-deux a montré que le cathéter n'est pas considéré comme étant un facteur de risque d'acquisition des E-BLSE. La P value > 0,05. La figure suivante montre la répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de cathéter.

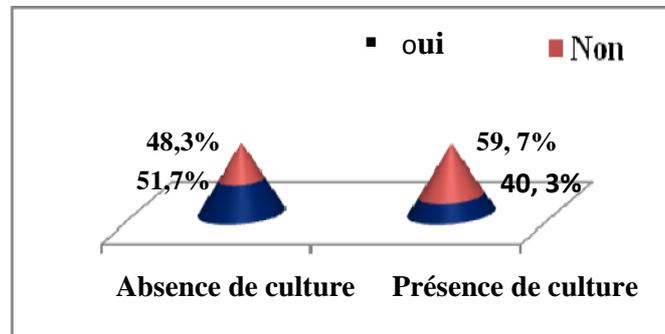


Figure 26 : Répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction de cathéter

❖ **Les prématurés**

Le test Khi-deux a montré que ce facteur influence d'une manière significative sur l'acquisition des E-BLSE (P value < 0,05). La figure suivante illustre la colonisation par les E-BLSE en fonction des prématurés.

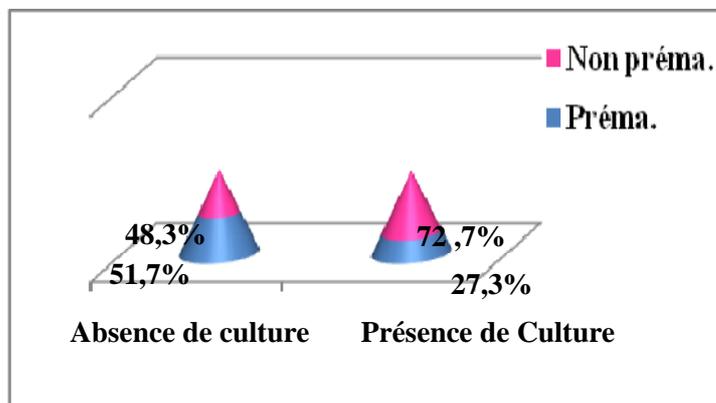


Figure 27: Répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction des prématurés.

❖ **Le moment du prélèvement**

La majorité des prélèvements sont effectués à l'admission après 24 heures. Le test Khi-deux a montré qu'il n'y a aucune différence significative entre le moment du prélèvement et la colonisation ($P \text{ value} > 0,05$). La figure suivante donne la répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction du moment de prélèvement.

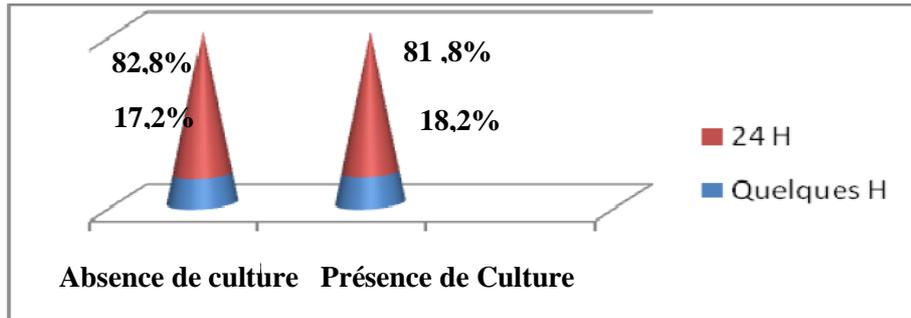
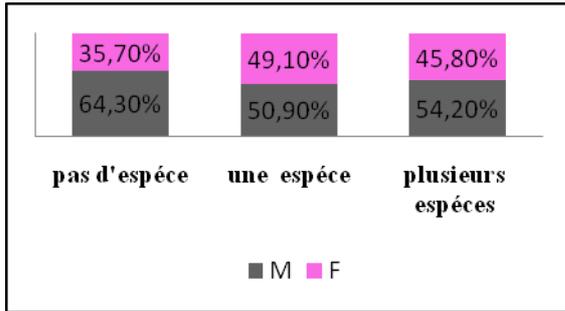


Figure 28 : répartition de la colonisation par les E-BLSE en fonction du moment de prélèvement

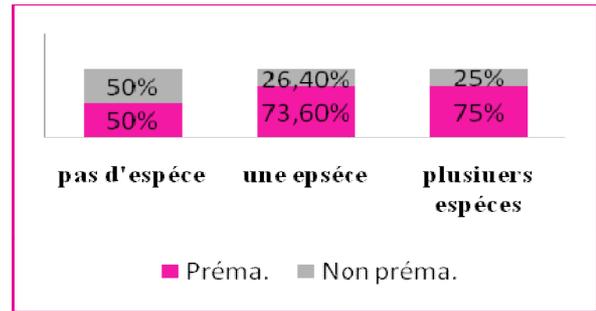
III.2. Nature des BMR isolés et facteurs de risque

Tableau N°V: Les P value pour chaque facteur de risque.

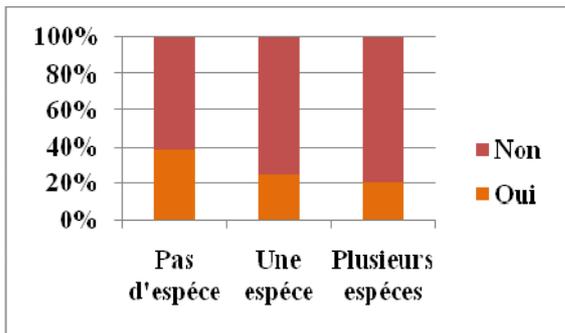
Test du Khi-deux				
Facteurs	Effectif théorique minimum	valeur	ddl	Signification
Sexe	10,74	1,334	2	0,513
Accouchement	11,2	1,704	2	0,427
Antibiothérapie	8,04	1,567	2	0,457
Salle	6,86	6,711	2	0,035
Sondage	6,63	2,713	2	0,258
Cathéter	10,29	2,462	2	0,292
Prématuré	7,77	5,428	2	0,066
Moment du prélèvement	4,34	0,055	2	0,973



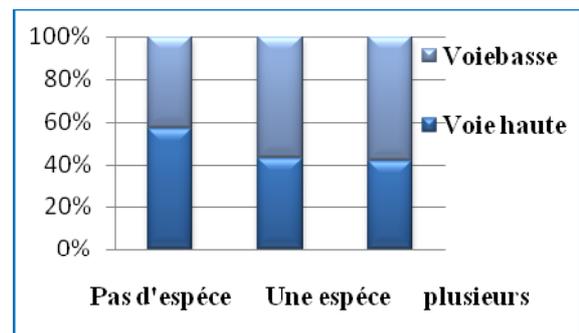
a) Sexe



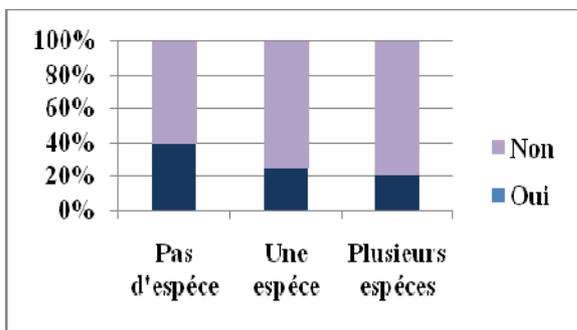
b) Prématurés



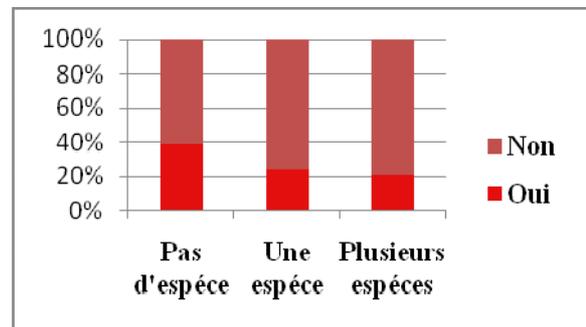
b) Sondage



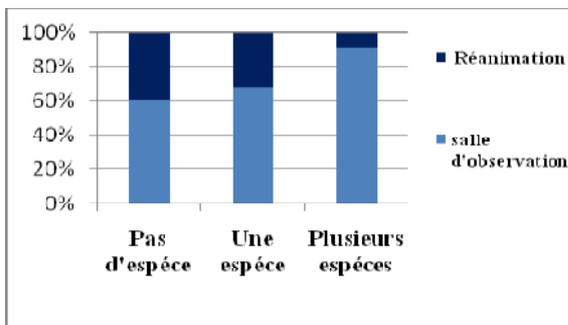
d) Mode d'accouchement



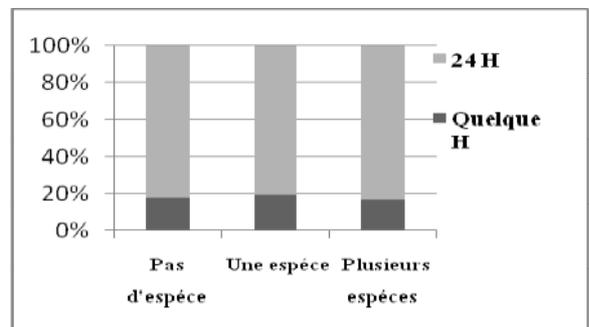
c) Cathéter



f) Antibiothérapie



g) Salle



h) Moment du prélèvement

Figures 29: Répartition de la colonisation par nature d'espèces en fonction des facteurs de risques

Cette étude a permis de mettre en évidence certains facteurs de risque favorisant la colonisation par les E-BLSE. La prématurité s'est révélée comme facteur de risque d'acquisition des E-BLSE. L'analyse des facteurs de risque relatifs, l'Odds ratio pour la colonisation étaient de 0,066 pour les prématurés ($p < 0,05$). Dans l'étude réalisée par Campeotto *et al.*(2004) portant sur la mise en place de la flore intestinale du nouveau-né a montré que la prématurité et l'hospitalisation préalable constituent les facteurs de risque d'acquisition des BLSE, l'Odds ratio pour la colonisation était de 4,06 pour la prématurité et de 43,83 pour une hospitalisation préalable.

La colonisation par plusieurs types des BLSE à été également étudié dans notre étude, Selon la figure 29- g, cette répartition montre une hétérogénéité entre les taux de colonisation et la salle, tels qu'il est très remarquable que le taux de colonisation multiple chez les nouveaux nés retrouvés dans la salle d'observation est significativement supérieur par rapport à celui noté chez les nouveaux nés restant dans la réanimation, donc la salle est un facteur de risque d'acquisition de plusieurs type de BLSE chez les nouveaux nés (P value<0,05).Ce multi-portage peut être du à l'environnement sachant que ce dernier constitue le réservoir majeur des bacille à gram négatif et conditions d'hygiène.

Selon la figure 29-B, la majorité des prématurés sont colonisés à la fois par plusieurs types d'espèce productrice des BLSE, le test Khi-deux à prouvé que la prématurité influence d'une manière significative sur l'acquisition de plusieurs bacilles à gram négatif producteurs de BLSE (P value est presque égale à 0,05 dans ce cas le test n'est pas hautement significatif). Il est à noter que les facteurs ; antibiothérapie, sondage, cathéter, moment du prélèvement, sexe et la voie d'accouchement ne sont pas des facteurs de risque d'acquisition des BLSE (P value>0,05).

L'étude réalisée par Y. Huang *et al.*, 2007 a montré que l'acquisition des BLSE dans le service de néonatalogie est due à certains facteurs de risque qui sont : les prématurés (P value = 0,019 et OR = 6,43]1.51–27.44[à 95% CI), l'âge gestationnel (P value = 0.007), l'utilisation des C3G (P value = 0.008 et OR = 9.00]1.65–49.14[à 95% CI) et la Ventilation mécanique prolongée durant sept jours d'hospitalisation (P value = 0.017et OR= 7.50]1.38–40.88 [à 95% CI). Tandis que le sexe (P value = 0,094) et le cathéter (P value = 0.288 et OR = 2,67] 0.58–12.19 [à 95 % CI) ne sont pas fixés comme étant des facteurs de risque d'acquisition des BLSE.

L'étude effectuée par Andriatahina et al. (2010) a prouvée également que l'acquisition des *K. pneumoniae* productrices des BLSE est liée à l'utilisation des antibiotiques à large spectre (P value < 0,01), des injections intramusculaires (P value < 0,01), des cathéters (P value = 0,08).

D'après les travaux de Cassettari et al., 2009, la prématurité et le mode d'accouchement ne sont considérés comme étant des facteurs de risque d'acquisition des BLSE.

Conclusion

Les données recueillies par cette présente étude, apportent un certain nombre de confirmations concernant la présence des souches d'entérobactéries productrices des BLSE. En effet, la détection des E-BLSE dans la matière fécale des nouveaux nés montre que le tube digestif, représente un réservoir important de bactéries multi-résistantes.

Les résultats que nous avons obtenus, sont les suivants :

- Sur les 108 prélèvements effectués par écouvillonnage rectal, un portage par les BLSE était trouvé chez 79 nouveaux nés.
- Le nombre des souches de bacille à Gram négatif collectées est de 169 souches, dont 159 souches d'Enterobacteriaceae, 5 de *P. aeruginosa* et d'*A. baumannii*.
- 146 souches ont présentés une image de synergie sur le MH sans oxacilline.
- les E-BLSE présentent des taux de résistance trop élevés vis-à-vis les B-lactamines,
- Les taux de résistance des souches d'entérobactéries sont de 84,42% à la gentamycine, 71,06% à la tobramycine et de 8,17% à l'amikacine.
- 11 souches des entérobactéries ont une BLSE et une céphalosporinase plasmidique
- On y note une prédominance des *Klebsiella pneumoniae* avec un taux avoisinant 50 %. Les taux de résistance sont de 100% de CTX, 100% de CF, 100% de CRO, 93,42% de CAZ, 93,42% de CZ, 7,89% de FOX et 1,31% d'IMP. les *K. pneumoniae* sont résistantes à la gentamycine (94,73%), à la tobramycine (85,52%), à l'amikacine (9,21%), à la ciprofloxacine (2,63%),
- les *K. pneumoniae* présentent un taux élevé de résistance vis-à-vis les sulfamides (82,89%)

- la colistine, le furane et le chloramphénicol révèlent des taux de résistance de 0%, 10,52%, 69,73% respectivement.
- *K. pneumoniae* hydrolyse préférentiellement la céfotaxime (CMI > 256µg/ml) que d'autre tel que l'ATM, AMC et la CAZ.
- le transfert de gènes de résistance par conjugaison n'a été obtenu pour aucune souche.
- La population de laquelle nous avons isolé ces souches se caractérise par la sex-ratio de 1,25 (M/F), 50% des prélèvements sont issus des nouveaux nés par voie basse, 63,9% des prélèvements sont issus des nouveaux nés qui ne sont pas sous antibiothérapies.
- la prématurité est le seul facteur de risque d'acquisition des BLSE dans le service avec P value <0,05.
- la salle et la prématurité sont des facteurs qui influence sur la nature des BLSE.

Le nombre de travaux réalisés et en cours de réalisation sur la résistance aux antibiotiques est très important, ce qui nous indique l'importance du danger auquel l'humanité est confrontée aujourd'hui. La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique, un problème d'ordre budgétaire et écologique. La surveillance de son évolution dans le temps et dans l'espace nous permettra d'éviter plusieurs impasses thérapeutiques, de contourner à toute nouvelle surprise qui peut rendre l'arsenal des antibiotiques existants inefficace comme elle nous permettra une meilleure gestion de la prescription et de la consommation de ces molécules.

En perspective,

Les résultats obtenus par la présente étude restent préliminaire, ils doivent être complétés par Les techniques de biologie moléculaire qui caractérisent les gènes de résistance. L'acides clavulanique, tazobactam et sulbactam sont des inhibiteurs des B-lactamases, donc prochainement nous souhaiterons de réaliser une étude portant sur la recherche des plantes médicinales inhibitrices de B-lactamases ainsi la caractérisation des gènes de résistances aux B-lactamines.

Références bibliographiques

-Afssa (2005). Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte.

-Andrianarivelo A., Rafaravavy NE., Rafalimanana C., Andriantahiana TN. et Robinson A. (2010). Profil bactériologique des infections néonatales à l'unité de réanimation néonatale de la Maternité de Befelatanana. *Revue d'anesthésie - réanimation et de médecine d'urgence*. 2(2), 1-4.

-Ang JY., Ezike E. et Asmar BL. (2004). Antibacterial résistance. *Indian J. Pediatr.* 71, 229-239.

-Bonnet R., Courvalin P., Leclerc R. et Bingen E. (2006). β -lactamines et entérobactéries. In: eds. *ANTIBIOGRAMME*, 2ème ed. ESKA, Paris. pp. 141-162.

-Bou G., Oliver A., Ojeda-Onzon C. et Beltran J. (2000). Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from an *E. coli* strain isolated in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(9), 2549-2553.

-Bradford PA. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14, 933-51

-Bush K. et Jacoby A. (2010). Updated Functional Classification of β Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* Rev. 54, 969-976.

-Canton R. et Coque TM. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 9, 466-75.

-Cassettari VC., Silveira IR., Droga M., Lincopan CD. et Mamizuka EM. (2009). Risk factors for colonisation of newborn infants during an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit. *Menezes Journal of Hospital Infection*. 71, 340-347.

-Cattoir V. (2008). Les nouvelles bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). *MAPAR*, 204-209.

-Cézario C. (2004). Infection and colonization by gram negative bacilli in neonates hospitalized in risk nursery at Uberlandia federal university hospital : etiology, resistant phenotypes and risk factors, *Brazilian journal of microbiology*. 35,193-198.

-Chong Y., Yakushiji H., Ito Y. et Kamimura T. (2011). Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a long-term study from Japan, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* .30,83–87 .

-Coudron PE., Moland ES. et Thomson KS. (2000). Occurrence and detection of AmpC beta-lactamase among *E.coli*, *K. pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center.

-Courvalin P., Leclerc R., Bingen E. et Lambert T. (2006). Aminocyclitol et bactéries à Gram négatif. Paris. *ESKA*. 227-244.

-Demir S., Soysal A., Bakir M., Kaufmann ME. et Yagci A. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in paediatric wards: a nested case-control study. *J Paediatr Child Health*. 44, 548-553.

-Doi Y., Adams JM., Yamane K. et Paterson DL. (2007). Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains in North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51 (11), 4209-4210.

-Ducluzeau R. (1993). Installation, équilibre et rôle de la flore microbienne chez le nouveau-né. *Ann Pédiatr*. 40, 13-22.

-Essack SY. (2001). The development of β -lactam antibiotic in response to the evolution of β -lactamase. *Pharm. Res.*18, 1391-1399.

-Gérardin P., Farny K., Simacc C., Laurent AF., Grandbastiend B. et Robillard P Y.(2006). Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* en néonatalogie à l'île de la Réunion. *Archives de pédiatrie* 13, 1500–1506.

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

-Goulet O. (2009) La flore intestinale : un monde à préserver. *Journal de pédiatrie et de puériculture* 22, 102-106.

-Gniadkowski M. (2001). Evolution and epidemiology of extended spectrum beta-lactamases and ESBL producing micro-organisms. *Clin. microbial infect.* 7, 557-608.

-Gröndlund MM., Lehtonen OP., Eerola E. et Kero P. (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28, 19–25.

- Hamouche E. et Sarkis DK.. (2011). Evolution de la sensibilité aux antibiotiques d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans un CHU de Beyrouth entre 2005 et 2009. *Pathologie et biologie* , Article in press.

-Harmsen HJ., Gibson GR., Elfferich P., Raangs GC., Wildeboer-Veloo AC. et Argaiz A. (2000). Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol Lett* .183, 125-9.

-Huang Y., Zhuang S. et Du M. (2007). Risk factors of neonatal nosocomial infection with extended-spectrum beta-lactamase -producing bacteria in a neonatal intensive care unit. 35(5), 339-45.

-Jarlier V., Carbonne A., Astagneau P. et Coignard B. (2003). Cas groupés d'infections à *Klebsiella pneumoniae* résistantes à toutes les bêta-lactamines y compris à l'imipénème en région parisienne. Edition InVS, p. 84.

-Kaftandzhieva A., Vesna K., Gordana J., Biljana KT., Zhaklina C. et Milena P. (2009). Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *E. Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* in Children at University Pediatric Clinic in Skopje. Macedonian Journal of Medical Sciences. 2(1), 23-25.

-Kong KF., Schnepfer L. et Mathee K. (2010). Beta-lactam antibiotics : from antibiosis to resistance and bacteriology. APMIS, 118 (1), 1-36.

-Krawczyk B., Samet A., Czariank E., Szscapa J. et Kur J.(2005). Extended -spectrum B-lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae* in neonatal unit: control an of outbreak using a new ADSRRS technique . polish journal of microbiology 54(2),105-110.

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

-Leclerc M., Juste C., Blottière H. et Doré J. (2007). Microbiote intestinal : un univers méconnu. Cah Nutr Diet. 42, 22-27.

-Livermore DM., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini GM., Arlet G., Ayala J., Coque TM., Kern ZI., Luzzaro F., Poirel L. et Woodford N. (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother.59,165-74

- Luciene A., Minarini R., Eduardo C., Clímaco DB., Guimaraes JC., Ferreira IC., Palazzo RM. et Lucia AC. (2008). Clonal Transmission of ESBL-Producing

Klebsiella spp at a University Hospital in Brazil. Brazilian journal of microbiology. 35,45-50.

-Mamma C., Paola MD., Domenico MD., Giuffre M. et Casuccio A. (2007). Surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit: prominent role of cross transmission. 35 (4), 223-230.

-Mansour W., Bouellegue O., Dahmen S. et Boujaafar N. (2005). Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux β -lactamines chez des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie. Pathologie Biologie. 56, 116-120.

-Martin F., Savage SH., Parret AM., Gramet G., Edwards C. et Doré J. (2000). Dynamics of colonization of the colon in breast-fed infants. Reprod Nutr Dev. 40,180-1.

-Moustaoui N., Bensghir R., Mjahedk A., Hakim K., Aimhand R., Boudouma M., Barroul E., M'daghri N. et Benbachir M. (2000). Digestive tract colonization with Extended spectrum beta-lactamases producing *Enterobacteriaceae* in a surgical intensive care unit in Casablanca. Journal of Hospital Infection.46, 238 - 239.

-Naas T., Poirel L. et Nordmann P. (2008). Minor extended-spectrum- β -lactamases.

- Neonakis I., Gikas A., Scoulica E., Manios A., Georgiladakis A. et Tselentis Y. (2003). Evolution of aminoglycoside resistance phenotypes of four Gram-negative bacteria: an 8-year survey in a University Hospital in Greece. International Journal of Antimicrobial Agents. 22, 526-531.

-Neu HC. (1998). Définition et classification des bêta-lactamases. *Med. Mal. Infect.*, (hors série) ,7-10.

- Chanoine N. (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. J. Antimicrob. Chemother. 61, 273-281.

-Orrhage K. et Nord CE. (1990). Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediat Suppl* .430 , 47-57.

-Oteo J. (2009). Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 524–528.

-Paterson D. et Bonomo RA. (2005). Extended-Spectrum β -lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews* . 18 (4), 657-686.

-Poirel L., Naas T. et Nordmann P. (2008). Genetic support of extended-spectrum- β -lactamases. *Clinical Microbiology and infection* 14 (1), 75-81.

-Rambaud J., Buts J., Corthier G. et Flourié B. (2004). Flore microbienne intestinale. PARIS: John Libbey Eurotext.

-Riché D. (2008). Micronutrition, santé et performance. Paris: De boeck.

-Rossolini GM., Andrea MM. et Mugnaioli C. (2000). The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 14,33-41.

-Ruiz de Alegría C., Rodríguez-Bano J., Cano M. E., Hernández-Bello JR., Calvo J., Roma E., Díaz M., Pascual A. et Martínez L. (2011). *Klebsiella pneumoniae* Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases in Spain: Microbiological and Clinical Features. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, p. 1134–1136

-Ruppé E. (2010). Epidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTXM. *Antibiotique.* 12 ,3-16.

-Ploy MC., Gassama A., Chainier D. et Denis F. (2005). Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 20, 343-352.

-Sakata H., Yoshioka H. et Fujita K. (1985). Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr* .144 , 186-90.

-Seignalet J. (2004). *L'alimentation ou la troisième médecine*. Paris: François-Xavier de Guibert.

-Sepp E., Naaber P., Voor T., Mikelsaar M. et Björkstén B. (2000). Development of intestinal microflora during the first month of life in Estonian and Swedish infants. *Microbiol Ecol Health Dis.*12, 22-6.

-Stürenburg E., Dietrich M. (2003). Extended spectrum beta- lactamases implication for the clinical microbiology, therapy, and infection control. *Journal of infection*,; 47, 273-295.

- Andriatahina T., Randrianirina F., Hariniana ER., Talarmin A., Raobijaona H., Buisson Y. et Richard V. (2010). High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric unit in Madagascar. *BMC Infectious Diseases*, 10,204

-Tonkic M., Ivana GB. et Volga pp. (2005). Prevalence and antimicrobial resistance of extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a university hospital in Split, Croatia. *International microbiology* 8,119-124.

-Touati A. (2006). *Caractérisation des phénotypes de résistance des entérobactéries aux β -lactamines isolées en milieu hospitalier ; cas de deux hôpitaux de la wilaya de Béjaia. (Thèse de doctorat). Université A. Mira.*

Références bibliographiques

-Weldhagen GF., Poirel L., et Nordmann P. (2003). Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* .47:2385-92

ANNEXE I

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

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	EDTA		
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- β -lactamines	GCI, 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- β -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- β -lactamines ; - Résistance aux inhibiteurs de β -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 cefpirome	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- β -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- β -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					

AC : acide clavulanique, **TZB**: tazobactam, **EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique, **NI** : non inclus

Annexe II

Code :	Hôpital :	Service :	Salle :
Date d'admission :		Motif d'admission :	
Age :	Sexe :	Cathéter : Oui/Non	
Grossesse à terme: oui/non		Prématuré : oui/non	
Nbre de semaines :		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 :	

Tableau N°II : le questionnaire

Annexe III

✓ **Composition des milieux de culture (en g/l) TSB, Mac conkey et Mueller Hinton**

Gélose Mueller Hinton

C'est un milieu prêt à usage fourni par l'institut pasteur d'Alger, généralement utilisé pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques et sulfamides.

Infusion de viande de boeuf	300 G	
Hydrolysate de caséine	17,5 G	pH 7.4
Amidon	1,5 G	
Agar	17 G	

Bouillon Trypticase soja

Peptone tryptique de caséine	17G	
Peptone papainique de soja	3 G	pH 7.3
Chlorure de Sodium	5 G	
Phosphate bipotassique	2 G	
Glucose	2 G	

Gélose Mac conkey

Bacto-peptone	17g
Protéose ou polypeptone	3g
Lactose	10g
Sels biliaires	1,5g
NaCl	05g
Agar	13,5g
Rouge neutre	0,03g
Cristal violet	0,001g
Eau distillée	1litre

✓ **Composition des réactifs VPI, VPII et Kovacs**

Réactif de Kovacs

Alcool amylique ou isoamylique	150ml
P.diméthylaminobenzaldehyde	10ml
Acide chlorhydrique concentré	50ml

Réactif de Voges-Proskauer (VPI)

α Naphtol	6g
Alcool éthylique à 90°	100ml

Réactif de Voges-Proskauer (VPII)

NaOH 4N

Annexe V

Tableau N° IV: valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions

ATB	Diamètres critiques	
	R	S
AMC	≤ 13	≥ 18
CTX	≤ 22	≥ 26
ATM	≤ 21	> 27
IPM	≤ 19	> 23
CF	≤ 14	≥ 18
CZ	≤ 19	≥ 23
AM	≤ 13	≥ 17
CPO	< 17	≥ 24
FEP	< 17	≥ 24
FOX	≤ 14	≥ 18
CIP	≤ 15	≥ 21
CS	< 15	≥ 16
FT	≤ 14	≥ 17
SSS	\leq	\geq
SXT	≤ 10	≥ 16
C	≤ 12	≥ 18
TM	\leq	\geq
GM	≤ 12	≥ 15
AN	≤ 14	≥ 17
FOS 50	≤ 12	≥ 16
RA30	\leq	\geq
TEC 75	\leq	\geq
TCC75/10	\leq	\geq
PIP100	\leq	\geq

Annexe IV

Tableau N°III: la lecture de la galerie API NE

Tests	composants actifs	Réactions/Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
NO3	Potassium nitrate	réduction des nitrates en nitrite	incolore	rouge-rose
TRP	L-tryptophane	formation d'indole	Incolore vert pâle/jaune	rose
GLU	D-glucose	fermentation de glucose	Bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	arginine dihydrolase	jaune	orange/rose/rouge
Ure	Urée	uréase	jaune	orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse par Bêta-glucosidase	jaune	gris/marron/noir
Gel	gélatine	hydrolyse par protéase	pas de diffusion de pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophénule-bêtaD-galactopyranoside	paranétnitophyl bêtaD-galactopyranosidase	Incolore vert pâle/jaune	jaune
GLU	D-glucose	assimilation de glucose	transparence	trouble
ARA	L-arabinose	assimilation d'arabinose	transparence	trouble
MNE	MAN	assimilation de mannose	transparence	trouble
MAN	mannitol	assimilation de manitol	transparence	trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	assimilation de potassium gluconate	transparence	trouble
MAL	D-maltose	assimilation de maltose	transparence	trouble
GNT	potassium gluconate	assimilation de potassium gluconate	transparence	trouble
CAP	acide caprique	assimilation d'acide caprique	transparence	trouble
ADI	acide adipique	assimilation de l'acide adipique	transparence	trouble
MLT	acide malique	assimilation de malate	transparence	trouble
CIT	trisodium citrate	assimilation de trisodium citrate	transparence	trouble
PAC	acide phénylacétique	assimilation d'acide phénylacétique	transparence	trouble
OX	/	cytochrome-oxydase	absence d'effervescence	présence d'effervescence

Résumé

La résistance aux antibiotiques est un problème de santé publique de plus en plus grave en Algérie touchant le milieu hospitalier et extra-hospitalier.

Objectif: notre étude a pour objectif la détermination des facteurs de risque influençant l'acquisition des E-BLSE en néonatalogie avec la caractérisation phénotypique de la résistance des souches isolées.

Méthodes : un travail portant sur l'isolement d'E-BLSE a été réalisé par écouvillonnage rectaux recueillis auprès de 108 nouveau-nés hospitalisés dans le service de néonatalogie. L'isolement a été réalisé par mise en culture des prélèvements sur milieu Chromogène « **chromIDTM** ». L'identification des souches et leur résistance aux antibiotiques est réalisée. Les CMI de ces souches sont déterminées en utilisant l'E-test.

Résultats : Au total, nous avons collecté 169 bacilles à Gram négatif, les E-BLSE sont les plus collectées (94%), *K. pneumoniae* est la plus détectée (47%). Une résistance élevée vis-à-vis des β -lactamines est notée à l'exception de l'imipénème. Des résistances associées à l'égard d'autres antibiotiques est observée. Des CMI élevées sont obtenues vis-à-vis du céfotaxime

Conclusion: L'émergence significative de multi-résistantes des agents pathogènes entériques dans les hôpitaux algériens pose une menace importante pour la santé nécessitant la mise en œuvre des mesures de surveillance et de contrôle des infections nosocomiales

Les mots clés : résistance aux antibiotiques, E-BLSE, *K. pneumoniae*, néonatalogie, facteurs de risque.

Abstract

Antibiotic resistance is a public health problem more serious in Algeria affecting the hospital.

Objective: Our study aims to determine risk factors influencing the acquisition of ESBL-E in neonatology with characterization of isolates.

Methods: work on the isolation of ESBL-E was made by rectal swabs collected from 108 news born hospitalized in the neonatology service. We searched the digestive colonization by ESBL-E among newborns. The isolation was achieved by culturing the samples referred to ecological environment Chromogen "chromIDTM". MICs of these strains were determined using the E-test.

Results: In total, we collected 169 gram-negative bacilli, the ESBLs are the most-collected (94%), *K. pneumoniae* is the most detected (47%). A high strength vis-à-vis the β -lactam antibiotics is noted with the exception of imipenem. Associated with resistance against other antibiotics was observed. MICs obtained are high against the cefotaxime .

Conclusion: The significant emergence of multidrug-resistant enteric pathogens in Malagasy hospitals poses a serious health threat requiring the implementation of surveillance and control measures for nosocomial infections.

Key words: antibiotic resistance, E-ESBL, *K. pneumoniae*, neonatology, risk factors.

