



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>



**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES**

Année 2020

Thèse n° 4

THESE

Pour l'obtention du DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée à l'Université Claude Bernard-Lyon 1
et soutenue publiquement le 27 janvier 2020 par

Dalila BAGHADI

Née le 1 août 1992

A Lyon (69)

**Etude de la contamination bactérienne environnementale au sein
du service de réanimation néonatale de l'Hôpital de la Croix-
Rousse de Lyon**

JURY

Monsieur Frédéric LAURENT, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Madame Marine BUTIN, Maitre de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Madame Anne TRISTAN, Maitre de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Madame Camille KOLENDA, Assistant Hospitalier Universitaire

Liste des professeurs

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- | | |
|---|--------------------|
| • Président de l'Université | Frédéric FLEURY |
| • Présidence du Conseil Académique | Hamda BEN HADID |
| • Vice-Président du Conseil d'Administration | Didier REVEL |
| • Vice-Président de la Commission Recherche | Fabrice VALLEE |
| • Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire | Philippe CHEVALIER |

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directrice : Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directrice : Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Xavier PERROT
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directrice : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE
Observatoire des Sciences de l'Univers	Directrice : Mme Isabelle DANIEL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

•CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)

Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)

Madame Anne DENUZIERE (MCU)

Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)

Madame Christelle MACHON (MCU-PH)

Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

•PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)

Madame Françoise FALSON (Pr)

Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)

Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)

Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)

Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)

Madame Giovanna LOLLO (MCU)

Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)

Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)

• BIOPHYSIQUE

Madame Laurence HEINRICH (MCU)

Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)

Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)

Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (Pr)

Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

• DROIT DE LA SANTE

Madame Valérie SIRANYAN (Pr)

Madame Sarah PERIE-FREY (ATER)

• ECONOMIE DE LA SANTE

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)

Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

• INFORMATION ET DOCUMENTATION

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

• INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX

Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)

Madame Claire GAILLARD (MCU)

Madame Delphine HOEGY (AHU)

• QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU - enseignant contractuel temps partiel)

Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)

Madame Pascale PREYNAT (MCU - enseignant contractuel temps partiel)

• **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

• **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)

Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)

Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)

Madame Christelle MARMINON (MCU)

Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)

Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

• **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

• **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)

Madame Isabelle KERZAON (MCU) Monsieur Serge MICHALET (MCU)

• **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
Monsieur Teddy NOVAIS (AHU)
Monsieur Florian VAUTRIN (ATER)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

• TOXICOLOGIE

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

• PHYSIOLOGIE

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

• PHARMACOLOGIE

Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU - PH)
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)

Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL**

Monsieur Olivier CATALA (Pr - enseignant contractuel temps partiel)

Madame Anne INIGO PILLET (MCU - enseignant contractuel temps partiel)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)

Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)

Madame Morgane GOSSEZ (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)

Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)

Madame Sarah HUET (MCU-PH)

Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)

Madame Florence MORFIN (PU – PH)

Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (Pr)

Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)

Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)

Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)

Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)

Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)

• **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)

Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)

Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

Madame Camille LOURS (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

• **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)

Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)

Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)

Madame Emilie BLOND (MCU-PH)

Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)

Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)

Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)

Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)

Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Stéphanie SENTIS (MCU)

Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

Monsieur Alexandre JANIN (AHU)

• **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)

Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU- enseignant contractuel temps partiel)

Madame Valérie VOIRON (MCU- enseignant contractuel temps partiel)

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

Remerciements

Aux membres du jury :

A Monsieur le professeur Frédéric Laurent, président du jury,

Je vous remercie de m'avoir intégrée à ce passionnant projet de recherche auquel j'ai été honorée de participer. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée, les moyens logistiques déployés ainsi que tout l'encadrement mis à ma disposition. Veuillez croire en l'expression de ma sincère gratitude et ma profonde reconnaissance.

A Madame la docteure Marine Butin, directrice de thèse,

Merci pour le temps précieux que tu as consacré à la relecture et à la correction de cet écrit. Merci de m'avoir initié à ce travail d'écriture scientifique, totalement nouveau pour moi, par tes remarques judicieuses, tes conseils avisés et plus globalement, ton encadrement rigoureux, depuis les travaux de prélèvements jusqu'à la rédaction de cette thèse. Je te prie de croire en ma plus profonde sympathie et te remercie infiniment pour ton dévouement.

A Mesdames les docteurs Anne Tristan et Camille Kolenda,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici, l'expression de mes sincères remerciements.

Les travaux présentés dans cette thèse ayant été réalisés au sein du laboratoire de bactériologie de l'hôpital de la Croix-Rousse, je tenais à remercier sincèrement tous les membres que j'y ai croisés durant mon passage, pour les conseils qu'ils m'ont prodigués et pour leur bienveillance :

A Alice Monteix, technicienne de laboratoire,

Merci de m'avoir encadrée et accompagnée sur toute la partie manuelle de cette thèse, depuis les prélèvements au service de réanimation néonatale jusqu'aux manipulations au laboratoire, parfois jusqu'à tard en soirée (alors que tes collègues avaient fini leur journée depuis plusieurs heures) et ce, toujours avec le sourire. J'espère vraiment que tu auras pris autant de plaisir que moi à participer à ce projet. Je te remercie du fond du cœur pour ton implication et te souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie également les différents chefs de service de l'Hôpital de la Croix-Rousse qui ont rendu possible, la réalisation de cette thèse :

A Monsieur Jean-Charles Picaud, chef de service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse,

Monsieur, je tenais à vous remercier pour l'accueil que vous m'avez réservé au sein de votre service, aussi bien pour la réalisation de mes travaux de thèse, que pour mes 4 mois de stage. J'ai pu côtoyer de très près l'équipe soignante et j'ai été très heureuse de pouvoir assister aux tours du matin. Cette expérience au sein de votre service, demeure l'une de mes plus belles découvertes.

A Monsieur Bernard Poggi et Madame Véronique Chambon, chefs de service du laboratoire de biochimie de l'hôpital de la Croix-Rousse et directeurs de stage,

Je vous remercie pour toutes les opportunités offertes pendant cette très enrichissante année de stage au sein de votre service. C'est par votre intermédiaire que j'ai pu accéder au service de réanimation néonatale, qui a permis par la suite, l'élaboration de cette thèse. Merci pour votre rigueur et votre gentillesse qui m'ont permises d'apprendre dans une atmosphère toujours légère et conviviale.

De manière générale, je remercie l'ensemble de mes professeurs et leur exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir inculqué leurs enseignements avec foi et engagement.

Enfin, j'adresse des remerciements particuliers à celles et ceux qui me sont chers :

A mes amis (d'enfance, de lycée, de fac..)

Merci d'avoir fait de mes années à vos côtés, une aventure inoubliable. J'ose espérer que les chemins de nos vies se croiseront de nouveau encore et encore.

A mes frères,

Merci de m'avoir toujours encouragée et épaulée dans toutes les affaires de ma vie. Merci de rendre ma vie plus douce par votre présence.

A mes parents,

Je vous serai, à jamais, redevable pour l'éducation et les valeurs que vous avez su m'inculquer et pour les sacrifices que vous avez consentis, qui m'ont porté là où je suis aujourd'hui. Merci pour votre confiance absolue, votre soutien indéfectible et l'amour inestimable que vous me témoignez chaque jour.

Table des matières

Liste des professeurs	2
Remerciements	10
Liste des abréviations	14
Liste des figures	15
Liste des tableaux	16
I. Revue de la littérature.....	17
A. Infections néonatales tardives	17
1. Épidémiologie clinique	17
2. Facteurs de risque	17
3. Complications et séquelles.....	18
B. Infections néonatales via les bactéries de l'environnement.....	19
C. Bactéries responsables.....	19
1. Epidémiologie bactérienne.....	19
2. Staphylococcus aureus	20
a) Définition d'espèce.....	20
b) Identification	20
c) Pathogénie humaine	21
3. Staphylococcus capitis.....	22
a) Définition d'espèce.....	22
b) Identification	22
c) Pathogénie humaine	23
4. Entérobactéries	25
a) Définition d'espèce.....	25
b) Identification	25
c) Pathogénie humaine	26
II. Contexte du projet d'étude de la contamination environnementale dans un service de réanimation néonatale et de l'étude de la persistance <i>in vitro</i> du clone NRCS-A	28
A. Etat des connaissances concernant le clone NRCS-A.....	28
III. Objectifs de l'étude	30
IV. Matériel et méthodes.....	31
A. Prélèvements réalisés au sein du service de réanimation néonatale.....	31
1. Protocole d'identification des souches bactériennes recherchées.....	31
2. Prélèvements environnementaux.....	31
3. Prélèvement des couveuses.....	33
4. Prélèvement en salle de décontamination	35

B.	Etude de la persistance <i>in vitro</i> du clone NRCS-A	36
V.	Résultats	38
A.	Contamination au sein du service de réanimation néonatale	38
1.	Environnement.....	38
2.	Couveuses.....	40
3.	Salle de décontamination.....	41
B.	Persistance du clone NRCS-A dans l'environnement	42
VI.	Discussion	45
VII.	Conclusion	49
VIII.	Références.....	53

Liste des abréviations

API : Analytical Profile Index

BGN : Bactéries à Gram Négatif

BHI : Brain Heart Infusion (bouillon de culture cœur-cervelle)

BLSE : Béta Lactamase à Spectre Elargi

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNR : Centre National de Référence

DECT : Digital Enhanced Cordless Telecommunications

EBMR : Entéro-Bactérie Multi-Résistante

ERV : Entérocoque Résistant à la Vancomycine

GIC : Giraffe Incubator Carestation

GOC : Giraffe Omnibed Carestation

MALDI-ToF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation- Time Of Flight

NRCS-A : National Reference Center for Staphylococci-A

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : Odd Ratio

PLP : Protéine de Liaison des Pénicillines

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

TSA : Trypto-caséine Soja

TSST-1 : Toxic Shock Syndrome Toxin-1

Liste des figures

- Figure 1:** colonies de staphylocoques dorés, isolées sur gélose SAID 20
- Figure 2:** en haut : test d'agglutination négatif (SCN) ; en bas : test d'agglutination positif (*S. aureus*)..... 21
- Figure 3:** à gauche : test PLP2A positif (SARM) ; à droite : test PLP2A négatif (SASM = *S. aureus* sensible à la méticilline) 22
- Figure 4:** Colonies de *S. capitis* NRCS-A après 5 jours d'incubation à 37°C isolées sur gélose Oxoid MRSA Brilliance (58) 24
- Figure 5:** Procédure de dépistage d'entérobactéries productrices de Béta lactamases à spectre élargi (EBMR), sur gélose BLSE (62)..... 26
- Figure 6:** Les pays en noir représentent ceux pour lesquels au moins une souche de *S. capitis* appartenant au clone NRCS-A a été isolée dans une unité de réanimation néonatale (70) 28
- Figure 7:** Alvéole de soin autour d'une couveuse, dans le service de réanimation néonatale de la Croix-Rousse (71)..... 32
- Figure 8:** Echographe du service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse (71) 33
- Figure 9:** Couveuse GIC du service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse 34
- Figure 10:** Image de l'intérieur d'une couveuse du service de réanimation néonatale de la Croix-Rousse 35
- Figure 11:** Ensemencement d'une gélose à l'aide du Spiral..... 37
- Figure 12:** Diagramme des résultats de l'expérimentation in vitro : Evolution dans le temps du dénombrement bactérien moyen de 3 souches de chaque groupe d'espèces de SCN..... 43

Liste des tableaux

Tableau 1: Liste des matériels et surfaces prélevés dans le cadre de notre étude, en salle de décontamination. 36

Tableau 2 : Résultats des prélèvements environnementaux réalisés au service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse (les cases colorées correspondent aux objets pour lesquels au moins 50% des prélèvements étaient positifs) 39

Tableau 3: Résultats des prélèvements des couveuses avant et après leur décontamination. Les croix correspondent aux prélèvements positifs à *S. capitis* 41

Tableau 4: Récapitulatif des dénombrements bactériens de chaque souche de SCN, aux différents temps, obtenus au cours de l'expérimentation *in vitro*..... 44

I. Revue de la littérature

A. Infections néonatales tardives

1. *Épidémiologie clinique*

La prématurité (naissance avant la 37^{ème} semaine d'aménorrhée) concerne chaque année 15 millions d'enfants dans le monde d'après l'OMS, soit plus d'un bébé sur 10 (1). Les décès liés aux complications de ces naissances s'élevaient à plus d'un million par an en 2015, représentant ainsi la principale cause de mortalité des enfants de moins de 5 ans (1). Parmi ces complications, plus d'un tiers des prématurés de très petit poids de naissance (moins de 1500g) présentent une infection néonatale tardive (c'est-à-dire qui se développe après 72h de vie) au cours de leur hospitalisation (2–5).

2. *Facteurs de risque*

Ces infections néonatales tardives peuvent être favorisées par divers facteurs de risque. Ces derniers peuvent être « intrinsèques » (liés à la vulnérabilité et à l'immaturation du prématuré) ou « extrinsèques » (liés aux soins pratiqués par le personnel soignant).

Les principaux facteurs intrinsèques sont l'âge gestationnel et le faible poids de naissance. En 2013, Boghossian *et al*, ont mis en évidence que chaque semaine de prématurité supplémentaire pour l'enfant, multipliait par 1,25 le risque qu'il développe une infection néonatale tardive (5). Les auteurs de cette même étude ont également démontré que la fréquence de survenue de ces infections était inversement proportionnelle au poids de naissance et à l'âge gestationnel des nouveau-nés (51% et 7,5% de prévalence d'infection néonatale tardive pour les enfants ayant un poids de naissance compris respectivement dans les fourchettes [500g-750g] et [1250g-1500g]) (5).

Concernant les facteurs extrinsèques liés aux soins, le cathétérisme veineux central a été associé dans plusieurs études à une augmentation du risque d'infections néonatales tardives (3,6,7). De même, un retard à l'initiation de l'alimentation entérale serait également impliqué dans l'apparition d'infections néonatales tardives (3,8). La voie parentérale et notamment l'administration de lipides a également été décrite lors de précédentes études, comme étant un facteur de risque d'infection (3,9). Enfin, l'administration précoce d'antibiotiques exposerait également les prématurés à des risques d'infections principalement mycosiques (candidoses) (10).

3. Complications et séquelles

Les infections néonatales tardives exposent le nouveau-né à des complications et/ou séquelles à court et long terme.

Parmi les bactéries, il a été démontré une sévérité moindre des infections à staphylocoque à coagulase négatif (SCN) par rapport aux autres pathogènes, notamment *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et les bactéries à Gram négatif (BGN), dont les entérobactéries (11,12).

Ainsi, une étude concernant 424 cas d'infections néonatales tardives chez des nouveau-nés de faible poids de naissance (inférieur à 1500g), a mis en évidence une mortalité plus élevée lorsque des BGN étaient incriminées, par rapport aux bactéries à Gram positif (Odd Ratio (OR) = 17, $p=0,001$) (11). De même, une autre étude menée par Hornik *et al*, a rapporté des taux de mortalité différents selon la bactérie en cause, allant de 9% pour les SCN à 21% pour les BGN (13). Plus globalement, au cours de cette étude a été démontrée une surmortalité significative des nouveau-nés de faibles poids de naissance présentant une infection néonatale tardive, tout agent pathogène confondu, par rapport aux non infectés (13).

Outre le décès, les complications aiguës des infections néonatales tardives concernent principalement l'appareil cardio-respiratoire (apnées, détresse respiratoire, défaillance hémodynamique). Ces infections augmentent également le risque d'hémorragies intra-ventriculaires et d'entérocolite ulcéro-nécrosante. Ces complications ont notamment été démontrées pour les SCN (14).

A moyen et long terme, les prématurés infectés par des bactéries à Gram positif présentent un risque accru de dysplasie broncho-pulmonaire (15). Il s'agit d'une complication de la prématurité comprenant des lésions tissulaires pulmonaires d'origine inflammatoire (liées à la ventilation mécanique, à la survenue d'infection et à l'immaturité) entraînant des difficultés respiratoires chroniques (persistantes après la sortie de néonatalogie). Schlapbach *et al* ont également rapporté des complications neurologiques dans une étude mettant en évidence à 2 ans d'âge corrigé, une augmentation des paralysies cérébrales en cas d'infection néonatale tardive à SCN (16). De même, une autre étude menée par Stoll *et al*, a démontré un risque augmenté de troubles neurodéveloppementaux pour ces nouveau-nés (17). Ces patients présentent également un risque accru de développer une rétinopathie (18).

Les entérobactéries, et principalement *Escherichia coli* (*E. coli*), sont responsables de méningites néonatales avec à long terme, un risque de séquelles en particulier auditives (19).

Enfin, ces infections sont associées à une durée d'hospitalisation plus longue, ainsi qu'une augmentation de la consommation d'antibiotiques. Ces deux événements provoquent à la fois une élévation du risque d'émergence de souches multirésistantes dans les unités de réanimation néonatale, ainsi que des dépenses de santé supplémentaires (20,21).

B. Infections néonatales via les bactéries de l'environnement

Plusieurs études ont démontré au sein des services de réanimation néonatale, que l'environnement (matériel, surfaces et soignants) constituait une source de contamination des nouveau-nés, malgré les précautions d'hygiène strictes en place dans ces services.

Une étude menée par Hira *et al* en 2005, a mis en évidence au sein du service de réanimation néonatale de l'Hôpital Erasmus MC-Sophia Children's Hospital de Rotterdam, l'influence de la colonisation du personnel soignant sur la contamination bactérienne des enfants hospitalisés (22). Entre juin et septembre 2005, tous les médecins et infirmiers travaillant au sein du service de réanimation néonatale ont été prélevés une fois toutes les deux semaines. Au cours de l'été 2005, lorsqu'un sujet revenait de vacances, il était immédiatement prélevé avant de réintégrer le service. L'étude a montré que les souches de SCN retrouvées au niveau des mains du personnel soignant, prélevées avant leur départ en vacances, correspondaient aux souches responsables de sepsis chez les nouveau-nés hospitalisés dans ce service à la même période. Ces souches bactériennes étaient différentes de celles prélevées sur les mêmes personnes à leur retour de vacances, ainsi que celles isolées sur un groupe témoin de la population générale. L'étude a donc permis de montrer que les soignants pouvaient constituer le réservoir et le vecteur de souches spécifiques retrouvées uniquement en milieu hospitalier et très probablement responsables d'infections néonatales (22).

Une contamination environnementale a également été rapportée aux Etats-Unis lors d'une autre étude publiée en 2005, suite à une épidémie d'infections à entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) dans un service de réanimation néonatale (23). Des prélèvements ont mis en évidence une contamination bactérienne pour 3 couveuses sur les 5 prélevées, au niveau des matelas. D'autres prélèvements environnementaux ont révélé une colonisation des objets du service, notamment un thermomètre, un rangement pour les couches des prématurés, et un clavier. Dans cette étude, aucune contamination ne provenait du personnel soignant (23). L'épidémie a cessé après qu'aient été mises en place des mesures de regroupement (cohorting) des couveuses contaminées, ce qui confirme que l'environnement était bien la source de contamination.

C. Bactéries responsables

1. *Epidémiologie bactérienne*

Les infections néonatales tardives s'opposent aux infections néonatales précoces par le moment de leur survenue (après 72 heures de vie) mais également par les pathogènes impliqués. Elles sont causées principalement par des cocci à Gram positif, dont les SCN. On retrouve également des entérobactéries (surtout *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (ou *K. pneumoniae*) et *Enterobacter cloacae*), des levures, ou d'autres cocci à Gram positif (*S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*...) (3,5,24).

Il faut toutefois prendre en compte le contexte géographique dans l'épidémiologie bactérienne des infections néonatales tardives. En effet, dans les pays en voie de développement, c'est le genre *Klebsiella* qui prédomine, suivi par les SCN (25,26). En revanche, dans les pays dits développés, la majorité des infections néonatales tardives sont causées par des SCN. Dans notre étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux staphylocoques (*S. aureus* et SCN, en particulier l'espèce *S. capitis*) et entérobactéries.

2. *Staphylococcus aureus*

a) Définition d'espèce

Mise en évidence par Pasteur en 1879, c'est une espèce bactérienne commensale de la peau et des muqueuses, retrouvée aussi bien chez les humains que les animaux (27). On la retrouve au niveau de la flore cutanée, mais aussi au niveau de la sphère rhinopharyngée. Elle appartient au groupe des staphylocoques à coagulase positive. Sa dénomination provient d'un pigment jaune-orangé de la famille des caroténoïdes, produit par ses colonies, en aérobiose. Hormis sa localisation principale sur les mammifères, elle peut se trouver également dans l'environnement (sol, objets souillés, etc.) (27).

b) Identification

Il s'agit d'une bactérie en forme de coques (cocci) groupées en amas, de coloration Gram positive et mesurant entre 0,5 et 1µm de diamètre. Elle est aéro-anaérobie facultative, immobile et possède 2 enzymes : une catalase et une coagulase (28). Dans le cadre de notre étude, nous l'avons isolée sur géloses chrom ID ou SAID (milieux chromogènes), sur lesquelles les colonies sont facilement reconnaissables par leur aspect lisse de coloration rosâtre (figure1). La bactérie possède à sa surface une protéine (protéine A). La présence de cette protéine permet une détection rapide lors du test d'agglutination (figure2).



Figure 1: colonies de staphylocoques dorés, isolées sur gélose SAID

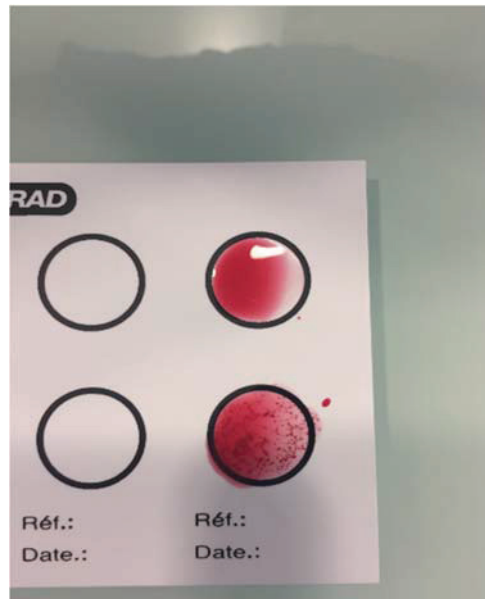


Figure 2: en haut : test d'agglutination négatif (SCN) ; en bas : test d'agglutination positif (*S. aureus*)

c) Pathogénie humaine

S. aureus est producteur de plusieurs toxines impliquées dans des pathologies. La TSST-1 (toxic shock syndrome toxin-1) est responsable entre autres, du choc toxique staphylococcique, caractérisé par une fièvre élevée ; un érythème généralisé et des atteintes multi-systémiques. Les entérotoxines quant à elles, sont retrouvées lors de toxi-infections alimentaires impliquant essentiellement les produits laitiers et produits préparés (mayonnaises), les préparations à base de crème (comme les pâtisseries) ainsi que les viandes et poissons consommés plusieurs jours après décongélation (29,30).

D'après l'INSERM, *S. aureus* serait impliqué dans 30% des cas d'infections (nosocomiales et communautaires confondues) (31) . Parmi les infections communautaires à *S. aureus*, on retrouve, entre autres, les infections de la peau et des tissus mous, les pneumonies et les septicémies (27,31).

Certaines de ces bactéries ont acquis une résistance aux antibiotiques (notamment à la méticilline). La résistance du *S. aureus* à la méticilline a été décrite pour la première fois en 1961 et elle est en relation avec la synthèse d'une protéine de liaison des pénicillines (PLP) mutante (appelée PLP2A), codée par le gène de résistance *mec* (32). Les *S. aureus* résistants à la méticilline (ou SARM) sont résistants à tous les antibiotiques de la famille des bêtalactamines (à l'exception de la ceftaroline), entraînant des difficultés dans les choix thérapeutiques (32). La présence de cette résistance chez une souche de *S. aureus* peut être rapidement mise en évidence par le test PLP2A (figure 3) (33).

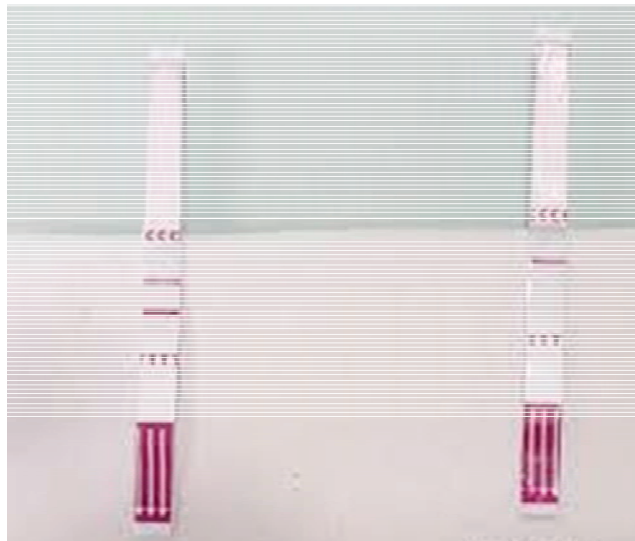


Figure 3: à gauche : test PLP2A positif (SARM) ; à droite : test PLP2A négatif (SASM = *S. aureus* sensible à la métilcilline)

3. *Staphylococcus capitis*

a) Définition d'espèce

C'est Wesley E. Kloos et Karl A. Schleifer qui décrivent pour la première fois le *Staphylococcus capitis* (ou *S. capitis*) en 1975, en même temps que 6 autres espèces de SCN (*S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. cohnii*) (34). Seules 3 espèces de staphylocoques avaient été décrites jusqu'alors : *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* (34). A l'origine, le *S. capitis* fut isolé principalement au niveau de la tête des volontaires de l'étude de Kloos et Schleifer, ce qui lui valut sa dénomination. Pour autant, *S. capitis* demeure proportionnellement moins présent sur le cuir chevelu que *S. epidermidis*, (respectivement 44% des prélèvements contre 87%) (34). De même, contrairement à *S. epidermidis*, le *S. capitis* est retrouvé de manière inconstante puisque seuls 65% des volontaires testés étaient porteurs (versus 100% pour *S. epidermidis*) (34). En 1991, Bannerman et Kloss ont décrit, sur la base de résultats d'hybridation ADN-ADN, la sous-espèce *S. capitis* subsp. *urealyticus*. Jusqu'alors, les composants de cette sous-espèce étaient jugés, à tort, comme appartenant aux espèces *S. hominis* et *S. warneri* (35). De cette description découla la définition d'une seconde sous-espèce, *S. capitis* subsp. *capitis*, constituée des souches jusqu'alors identifiées comme des *S. capitis*.

b) Identification

S. capitis est identifiable grâce à ses caractéristiques phénotypiques et biochimiques. En effet, les colonies de l'espèce *S. capitis* ont été décrites par Kloos et Schleifer comme étant blanches,

petites, convexes et opaques (34). Deux autres spécificités caractérisent les *S. capitis*, à savoir le faible nombre de sucres métabolisables par les souches (et notamment l'incapacité de métabolisation du maltose), et une production principalement lévogyre d'acides lactiques (34). Les colonies de la sous-espèce *urealyticus* sont, quant à elles, plus larges et présentent une apparition retardée de pigmentation. Cette sous espèce est dotée d'une capacité de métabolisation du maltose et, comme son nom l'indique, possède une activité uréolytique (35).

Ces différences ont probablement sous-estimé la fréquence d'isolement de *S. capitis* avec les anciennes techniques d'identification (35). L'utilisation maintenant généralisée de la technique de MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation- Time Of Flight) ou spectrométrie de masse, qui permet d'identifier de façon fine une espèce microbienne en fonction de son spectre protéique, est très performante pour l'identification de l'espèce *capitis*.

c) Pathogénie humaine

Comme la plupart des SCN, *S. capitis* est peu pathogène chez l'Homme et est souvent considéré comme un contaminant lorsqu'il est isolé dans un prélèvement clinique (36). Néanmoins certains cas d'infections documentées à *S. capitis* ont été rapportés dans la littérature.

Chez les adultes (et enfants hors nouveau-nés), les endocardites infectieuses représentent les principales complications d'infections à *S. capitis*. En 2008, le groupe « Collaboration Internationale sur l'Endocardite » a rapporté que *S. capitis* représentait 5,5% des cas rapportés d'endocardites à SCN (5 sur 91) (37) et 0,6% de l'ensemble des endocardites (38). Plus récemment en 2014, une étude espagnole retrouvait une proportion légèrement plus élevée, de 1,9% (39).

L'espèce *S. capitis*, comme beaucoup d'autres espèces de SCN, peut également être en cause dans des bactériémies en lien avec les cathéters. Une étude européenne publiée en 2009, recensait un seul cas d'infection sur cathéter imputable à *S. capitis* (sur les 81 cas d'infections sur cathéters retrouvés chez 188 adultes et enfants âgés d'au moins 1 an) (40). Néanmoins, peu d'études détaillent les espèces impliquées parmi les SCN, c'est pourquoi il est difficile d'estimer la part de *S. capitis* en cause dans les 20 à 40% de bactériémies liées au cathéter impliquant des SCN (41–44).

Des atteintes osseuses ont également été imputables à *S. capitis*, incluant des infections ostéo-articulaires sur matériel (45), mais aussi sur articulation native (46), ainsi qu'un cas d'ostéomyélite sur un enfant (47).

Ont été rapportés également de façon isolée, un cas de sinusite chronique, un cas de méningite aigue communautaire, et plusieurs cas de contamination de produits sanguins frais, impliquant *S. capitis* (48–50).

Néanmoins, dans la littérature, en dehors de ces quelques cas sporadiques, la plupart des infections rapportées à *S. capitis* concerne la survenue d'infections néonatales. Depuis la fin des années 90, plusieurs séries d'infections impliquant des souches de *S. capitis* multirésistantes ont été rapportées (51–55). En 2012, le clone NRCS-A (National Reference Center for Staphylococci-A), appartenant à l'espèce *S. capitis* et retrouvé spécifiquement au sein des services de réanimation néonatale, a été identifié au CNR des Staphylocoques (Centre National de Référence des Staphylocoques) à Lyon (55). Ce clone présente un profil de résistance atypique avec notamment une constante hétérorésistance à la vancomycine, qui avait déjà été décrite sur des souches de *S. capitis* isolées en réanimation néonatale aux Pays-Bas et en Australie (52,54). Plus globalement, le clone NRCS-A a été isolé de manière endémique dans plusieurs services de réanimation néonatale à travers le monde (56). C'est ce clone qui fera l'objet d'une étude plus précise dans la deuxième partie de notre étude.

Une méthode récemment décrite permet l'identification spécifique de ce clone (57). Elle repose sur la culture sur gélose MRSA Brilliance 2 (Oxoid®), qui présente une forte teneur en chlorure de sodium (qui favorise la culture des staphylocoques) et en méticilline (qui inhibe la croissance des souches sensibles à cet antibiotique) et qui a été développée pour la détection des souches de SARM. Cette gélose est, de plus, chromogénique, c'est-à-dire que les colonies cultivées sur cette gélose présentent des couleurs variables en fonction de leur espèce bactérienne. Sur cette gélose, les colonies de *S. aureus* présentent en 24 heures une coloration vert foncé tandis que les SCN forment des colonies blanches. Néanmoins il a été observé qu'après cinq jours d'incubation en atmosphère humide à 37°C sur ce type de gélose, les souches de *S. capitis* NRCS-A se développaient en formant des colonies mauves à halo blanc-crème, permettant de les différencier des autres SCN (Figure 4) (58).

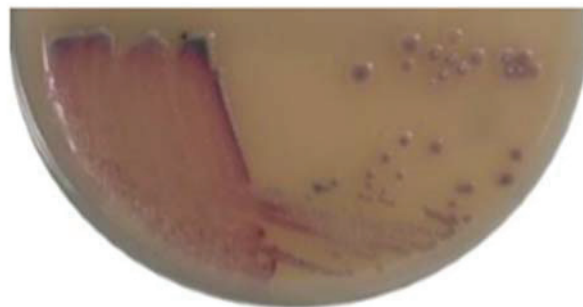


Figure 4: Colonies de *S. capitis* NRCS-A après 5 jours d'incubation à 37°C isolées sur gélose Oxoid MRSA Brilliance (58)

4. Entérobactéries

a) Définition d'espèce

Les entérobactéries représentent un groupe hétérogène de bactéries partageant des caractéristiques communes. Comme leur nom l'indique, ces bactéries se trouvent principalement au niveau du tube digestif, humain ou animal, mais elles peuvent également être présentes dans l'environnement, aussi bien dans les sols que les eaux (59). Toutes ces bactéries sont des bacilles à Gram négatif, mesurant entre 2 et 4 μm de longueur, et 0,4 à 0,6 μm de largeur (60). Elles sont aérobies-anaérobies facultatives et la plupart d'entre elles possèdent des cils les dotant de mobilité (60). On dénombre au total 177 espèces différentes, regroupées au sein de 12 genres principaux : *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providentia*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Hafnia* et *Yersinia* (60).

b) Identification

Au niveau macroscopique, les entérobactéries forment, sur gélose, des colonies lisses (« type S » pour Smooth), rugueuses (R) ou muqueuses (M) selon les espèces, d'une taille moyenne pouvant atteindre jusqu'à 2 millimètres de large, hormis l'espèce *Yersinia* dont les colonies apparaissent plus petites (61). Les entérobactéries multirésistantes (EBMR) sont classiquement isolées sur géloses dites BLSE (Béta lactamases à spectre élargi) à 37°C pendant 24 heures, comme ce fut le cas pour les prélèvements de notre étude, pour une identification présomptive (avant confirmation éventuelle par antibiogramme), et apparaissent dans ce cas de couleur bleue ou rose pour *E. coli* et verte pour les genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* et *Citrobacter* (figure 5) (62).

Les nombreux genres bactériens sont classés en espèces, selon leurs caractéristiques biochimiques et antigéniques (60). D'un point de vue biochimique, les entérobactéries poussent sur des géloses nutritives ordinaires de type géloses au sang (milieu non sélectif pour l'isolement de bactéries non exigeantes) en 24 heures à 37°C (60). Elles sont capables, pour certaines d'entre elles, de fermenter le glucose et de dégrader les nitrates en nitrites grâce à l'enzyme nitrate réductase, faisant d'elles des bactéries nitrates positives. En revanche, contrairement à d'autres bactéries, elles sont dépourvues de l'enzyme oxydase, appelée aussi phénylène diamine oxydase, et sont donc oxydase négatives (60). Enfin, elles possèdent une enzyme catalase, permettant des réactions d'oxydo-réduction. Les espèces sont différenciables entre elles, notamment grâce à la réalisation de galeries API (API 20 E) et/ou l'élaboration du profil protéique des bactéries (via la technique Maldi-Tof) (59).

Concernant la classification antigénique, on retrouve 3 types d'antigènes rendant possible l'identification de ces bactéries par technique d'agglutination (60) et le classement des espèces en sérotypes ou sérovars (59) : l'antigène O présent chez toutes les entérobactéries au niveau de la paroi et qui constitue l'endotoxine de ces bactéries, l'antigène H présent

uniquement chez les entérobactéries mobiles dotées de flagelles et l'antigène K retrouvé seulement chez les bactéries possédant une enveloppe ou capsule.

Procédure de dépistage

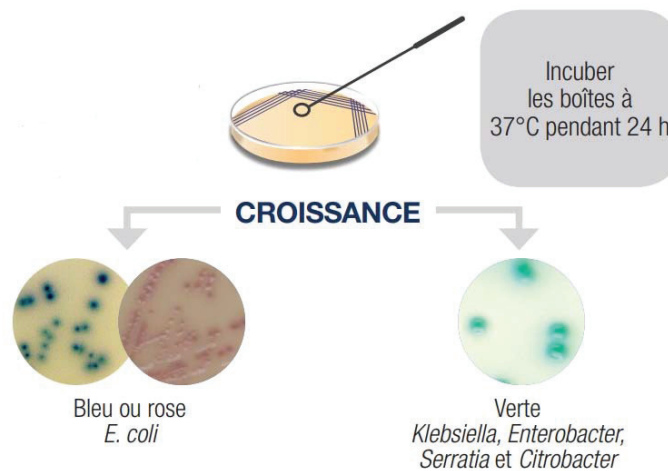


Figure 5: Procédure de dépistage d'entérobactéries productrices de Béta lactamases à spectre élargi (EBMR), sur gélose BLSE (62)

c) Pathogénie humaine

Les entérobactéries sont impliquées dans de nombreuses pathologies, aussi bien nosocomiales que communautaires (63). Elles sont notamment impliquées dans des infections urinaires (cystites, pyélonéphrites...). Avec une fréquence de 70 à 95%, *E. coli* en est le premier agent infectieux responsable (63). Les genres *Proteus* et *Klebsiella* représentent 10 à 25% des germes impliqués (63). Des infections intra-abdominales (appendicites, diverticulites, péritonites, cholécystites, angiocholites, abcès) notamment à *E. coli* sont également rapportées (63). Par ailleurs, des infections pulmonaires à entérobactéries surviennent essentiellement dans un contexte nosocomial (pneumopathies acquises sous ventilation mécanique et pneumonies d'inhalation). Dans une enquête nationale réalisée en 2012, portant sur la prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, les entérobactéries arrivaient en tête des pathogènes responsables d'infections nosocomiales (64).

D'après cette même étude, environ 20% des micro-organismes isolés lors de pneumonies nosocomiales étaient des entérobactéries (64). Enfin, il a été rapporté qu'en France en 2012, *E. coli* représentait le 2^{ème} germe le plus fréquemment retrouvé dans les bactériémies, derrière *S. aureus*, d'après les résultats de l'enquête nationale citée plus haut (64).

De plus, on constate ces dernières années, l'émergence d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques classiquement utilisés (65). En effet, les entérobactéries sont habituellement sensibles aux antibiotiques de la famille des bêta-lactamines (pénicillines, céphalosporines)

mais naturellement résistantes aux pénicillines G (benzylpénicilline) et M (oxacilline et cloxacilline). Cependant, certaines d'entre elles vont devenir insensibles à d'autres bêta-lactamines, par acquisition de plasmide ou mutation génétique. Les bactéries vont alors synthétiser une enzyme capable d'inactiver les bêta-lactamines par hydrolyse du cycle bêta-lactame de ces antibiotiques. On distingue 4 types de bêta-lactamases (66) :

-les pénicillinases : elles sont synthétisées grâce à l'acquisition d'un plasmide et hydrolysent toutes les pénicillines. Selon l'expression de leur gène de régulation, les bactéries sont partiellement ou totalement sensibles aux inhibiteurs de bêta-lactamases (66)

-les céphalosporinases : elles sont produites par mutations chromosomiques et hydrolysent toutes les bêta-lactamines à l'exception des carbapénèmes. De plus, elles sont insensibles aux inhibiteurs de bêta-lactamases (66)

-les bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) : ce sont des pénicillinases qui ont subi des modifications génétiques et confèrent une résistance à toutes les bêta-lactamines à l'exception des carbapénèmes (66)

-les carbapénémases : elles sont synthétisées à partir d'un gène le plus souvent plasmidique, acquis par transfert horizontal au contact d'une bactérie portant ce gène. Ces enzymes hydrolysent toutes les bêta-lactamines, y compris les carbapénèmes (67)

En cas de résistance, ces entérobactéries deviennent plus difficiles à éradiquer et nécessitent le recours à d'autres antibiotiques que ceux habituellement utilisés (carbapénèmes notamment). De plus, elles imposent des précautions d'isolement du patient colonisé à l'hôpital et un renforcement des mesures d'hygiène au sein des services de soin, afin de limiter leur transmission inter-patients (65).

En réanimation néonatale, ces EBMR sont en cause dans des épidémies (68). Les principales entérobactéries responsables d'infections néonatales sont *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Enterobacter sp.* (68). Une étude menée par Biran *et al.* entre 2000 et 2009 dans le service de réanimation néonatale de l'hôpital Robert Debré à Paris, a rapporté 46 cas de colonisation à EBMR (69). Parmi ces pathogènes, 58,7% d'*E. coli* étaient impliqués, ainsi que 19,5% de *K. pneumoniae* et 10,8% d'*Enterobacter cloacae* (69).

Dans le cadre de ce travail de thèse, la recherche d'entérobactéries s'inscrit dans un contexte d'épidémie à EBMR du genre *Klebsiella* et *Enterobacter* au sein du service de réanimation néonatale de la Croix-Rousse.

II. Contexte du projet d'étude de la contamination environnementale dans un service de réanimation néonatale et de l'étude de la persistance *in vitro* du clone NRCS-A

A. Etat des connaissances concernant le clone NRCS-A

Comme nous l'avons évoqué, les infections néonatales tardives sont responsables d'une hausse de la mortalité et des morbidités des nouveau-nés hospitalisés en réanimation néonatale. Les agents bactériens majoritairement impliqués sont les entérobactéries, les staphylocoques dorés et les SCN comme *S. capitis*.

Le clone NRCS-A appartenant à l'espèce *S. capitis*, a été identifié en 2012 après avoir observé que l'espèce *S. capitis* représentait une forte proportion des bactériémies au sein des services de réanimation néonatales lyonnais (39,1 % des hémocultures positives)(55). A l'inverse, cette espèce était rarement retrouvée chez les adultes hospitalisés en service de réanimation à Lyon (1% seulement des hémocultures positives)(55). Les profils des souches de *S. capitis*, ont été comparés par électrophorèse à champs pulsé, et ont mis en évidence que 24 souches de *S. capitis* sur 25 isolées en réanimation néonatale appartenaient au même clone (55). En revanche, les souches de *S. capitis* isolées en service de réanimation adulte, étaient toutes différentes de ce clone et également différentes entre elles (55). Ce clone appelé NRCS-A a ensuite été identifié dans 42 services de réanimation néonatale de France (sur 46) et dans 17 pays à travers 4 continents (figure 6) (55,56,70).

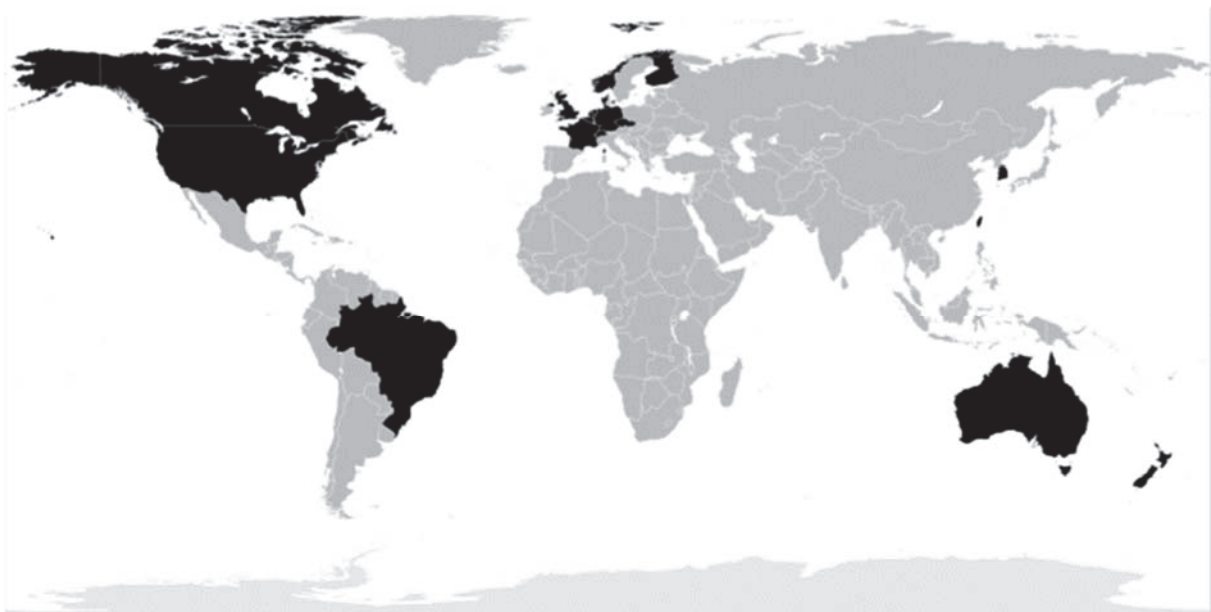


Figure 6: Les pays en noir représentent ceux pour lesquels au moins une souche de *S. capitis* appartenant au clone NRCS-A a été isolée dans une unité de réanimation néonatale (70)

Le clone NRCS-A présente un phénotype de résistance aux antibiotiques caractéristique au sein de l'espèce *S. capitis* avec notamment une résistance aux pénicillines G et M (71). Cette résistance particulière est due à la présence du gène *mecA* (72). Ces souches possèdent également le gène *aacA-aphD* responsable d'une résistance à tous les aminosides (dont la gentamicine) par inactivation de ces antibiotiques via acétyl- et phospho-transférase (71).

De plus, les souches du clone NRCS-A possèdent toutes une sensibilité diminuée à la vancomycine. En effet les souches du clone NRCS-A sont toutes résistantes ou hétérorésistantes à la vancomycine (57). En particulier, la CMI (concentration minimale inhibitrice) de vancomycine des souches NRCS-A est en moyenne supérieure à celle des autres souches de *S. capitis*. Ainsi, dans l'étude de 2012 évoquée ci-dessus, 37,5% des souches isolées en réanimation néonatale étaient résistantes à la vancomycine (avec une CMI supérieure à 2mg/L) contre 7,7% des souches isolées chez des adultes (55). Par ailleurs, en 2015, une étude a démontré que ce clone était doté d'une capacité élevée d'adaptation à la pression de sélection par la vancomycine, supérieure à celle des autres souches de *S. capitis*, mais aussi des souches de *S. epidermidis* et de la souche *S. aureus Mu3* (souche de *S. aureus* de référence pour l'hétérorésistance aux glycopeptides) (73). Une augmentation de l'épaisseur de la paroi bactérienne était associée à cette résistance et ce mécanisme est le même que celui décrit chez les souches de *S. aureus* ayant une sensibilité diminuée à la vancomycine (73,74).

Entre juillet 2015 et octobre 2016, une étude de contamination bactérienne environnementale avait été menée au sein du service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse à Lyon (71). Les résultats de cette étude avaient mis en évidence une présence élevée de *S. capitis* NRCS-A au sein des alvéoles de soin (espace de soins autour des nouveau-nés) et en particulier au niveau des couveuses (71). Ainsi nous avons émis l'hypothèse d'une capacité du clone NRCS-A à persister sur les surfaces inertes de l'environnement, qui fera l'objet d'un des axes de notre travail. Par ailleurs, comme évoqué en introduction, le service de réanimation néonatale de la Croix-Rousse a été confronté à des infections impliquant des EBMR. La recherche de ces bactéries ainsi que des *S. capitis* et *S. aureus* dans l'environnement du service de réanimation, fera l'objet de l'autre axe de notre travail.

III. Objectifs de l'étude

Dans une première partie, nous avons cherché à identifier les réservoirs de 3 bactéries pathogènes (*S. aureus*, *S. capitis* NRCS-A et EBMR) dans l'environnement d'un service de réanimation néonatale, notamment à proximité des couveuses. Nous avons également réalisé des prélèvements directement sur les couveuses avant et après leur décontamination pour étudier l'efficacité des procédures de désinfection. Enfin, nous avons suspecté une éventuelle recontamination précoce des couveuses et avons donc réalisé des prélèvements directement dans la salle de décontamination, sur les surfaces et objets touchés par le personnel.

Dans une seconde partie, une expérimentation *in vitro* a été menée afin de comparer la capacité de persistance du clone NRCS-A sur surface inerte, avec celle d'autres souches de SCN.

IV. Matériel et méthodes

A. Prélèvements réalisés au sein du service de réanimation néonatale

1. *Protocole d'identification des souches bactériennes recherchées*

Des prélèvements ont été réalisés dans le service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse (Hospices Civils de Lyon) entre juillet et octobre 2017. Ces prélèvements ont été effectués grâce à des écouvillons floqués E-swab (Copan, Italie). Après échantillonnage, ces écouvillons ont été immédiatement utilisés pour ensemercer des tubes stériles contenant chacun 2mL de bouillon de culture cœur-cerveau, puis mis en incubation 24h à 36°C en aérobiose, afin de permettre la croissance des bactéries prélevées. L'ensemencement des géloses en quadrant, était ensuite réalisé à partir de ces suspensions bactériennes sur géloses ChromID® SAID (Biomérieux), MRSA Brilliance (Oxoid) et ChromID® BLSE (Biomérieux), destinées à isoler respectivement : *S. aureus*, *S. capitis* NRCS-A et les entérobactéries.

Les géloses étaient ensuite incubées à 36°C pour permettre la multiplication des bactéries pendant 24h pour les géloses SAID et BLSE et 5 jours pour les géloses MRSA Brilliance. En effet, pour l'espèce *S. capitis*, il a été démontré au cours de travaux précédents, que sur ces géloses MRSA Brilliance, les souches NRCS-A formaient après 5 jours d'incubation, des colonies de couleur mauve avec un halo blanc-crème (57). Cet aspect était très évocateur des souches NRCS-A, sans toutefois en être spécifique. C'est pourquoi une analyse en MALDI-ToF était systématiquement réalisée pour chaque gélose MRSA montrant la coloration mauve évocatrice afin de confirmer l'identification de *S. capitis* NRCS-A. Concernant les géloses SAID positives, un test d'agglutination permettait de confirmer la présence de souches de *S. aureus*. Enfin, un test PLP2A, était réalisé pour toutes les souches de *S. aureus* afin de mettre en évidence les SARM. Pour les entérobactéries, nous avons uniquement recherché les souches résistantes par culture sur gélose BLSE.

2. *Prélèvements environnementaux*

Afin d'isoler les bactéries pathogènes pour les prématurés, nous avons ciblé nos prélèvements au niveau des alvéoles de soin et des objets fréquemment manipulés par le personnel soignant.

Chaque prématuré a autour de sa couveuse, un périmètre bien délimité appelé « alvéole de soin » dans lequel se trouve le matériel nécessaire à sa prise en charge, qui comprend sa couveuse, un respirateur, un chariot de soins, un scope, et du matériel informatique (figure 7). Nous avons prélevé un même jour 8 alvéoles de soins choisies aléatoirement parmi les 15 alvéoles du service de réanimation. Pour chaque alvéole, les points prélevés étaient les suivants : le respirateur branché à l'enfant (les touches de fonctionnement et l'écran tactile), le poste ordinateur attribué à chaque patient (les touches de fonctionnement de l'écran et la surface des claviers et souris), la couverture appelée « cache-couveuse » située au-dessus de chaque couveuse servant à contrôler la luminosité (le jour de notre prélèvement, 2 couveuses sur les 8 prélevées, n'en n'avaient pas), le stéthoscope attribué à chaque enfant (au niveau du pavillon).



Figure 7: Alvéole de soin autour d'une couveuse, dans le service de réanimation néonatale de la Croix-Rousse (71)

Des prélèvements ont également été réalisés sur les surfaces des objets fréquemment utilisés par le personnel soignant au sein de l'unité de réanimation néonatale, à savoir : 16 manivelles de store, 2 tableaux d'ardoise, 4 tabliers de protection contre les rayons X (situés dans le

service de réanimation et utilisés par les manipulateurs radio), 5 ordinateurs utilisés par les internes en médecine (claviers et souris), 3 ordinateurs utilisés par le personnel infirmier (claviers et souris), 4 DECT (téléphones sans fil utilisés par les médecins), 1 téléphone fixe utilisé par tous le personnel soignant, 1 interphone, 1 calculatrice utilisée par les internes en médecine, 1 poste de radio, 1 échographe (l'ensemble des touches de fonctionnement du clavier ont été prélevées) (figure 8).

Au total, 69 prélèvements environnementaux ont été réalisés.



Figure 8: Echographe du service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse (71)

3. Prélèvement des couveuses

Selon le même protocole de prélèvement, nous nous sommes intéressés à la contamination bactérienne des couveuses. Celles-ci étaient de type GIC (Giraffe Incubator Carestation : réservée aux enfants particulièrement fragiles présentant un très petit poids de naissance) et GOC (Giraffe Omnibed Carestation : pour les bébés moins petits, ces couveuses pouvant s'ouvrir et s'utiliser comme des tables radiantes classiques).

L'objectif était d'analyser la colonisation bactérienne des couveuses et d'apprécier l'efficacité de leur décontamination.

Dans ce service, chaque couveuse est décontaminée tous les 10 jours ou lorsque le patient peut sortir de couveuse ou quitte le service. La méthode de décontamination consiste à immerger pendant 15 à 20 minutes, dans un bain antiseptique (composé d'un ammonium quaternaire et d'un biguanide, respectivement : le chlorure de didécyldiméthylammonium et le chlorhydrate de polyhexaméthylène) les pièces détachées de la couveuse. Les pièces non détachables ou trop fragiles pour l'immersion (matelas et balance), sont nettoyées à l'aide d'une lingette imbibée de la même solution antiseptique.

Des prélèvements ont été réalisés avant et après la décontamination de 6 couveuses choisies aléatoirement. Les points ciblés pour chacune d'entre elles, étaient les suivants (figures 9 et 10) :

- les hublots : sur leur face interne et externe ainsi que leur contour
- les poignées : à l'avant et à l'arrière de la couveuse, gauches et droites
- le matelas sur lequel est posé l'enfant : à sa face interne et externe, et également au niveau des coutures
- la balance sur laquelle est posé le matelas : au niveau de sa face apparente et des touches de fonctionnement

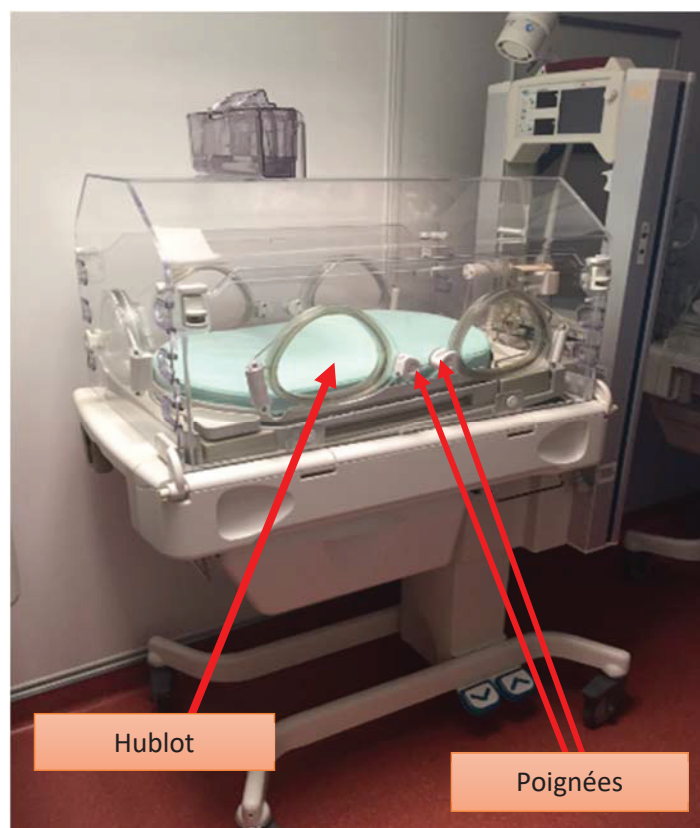


Figure 9: Couveuse GIC du service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse

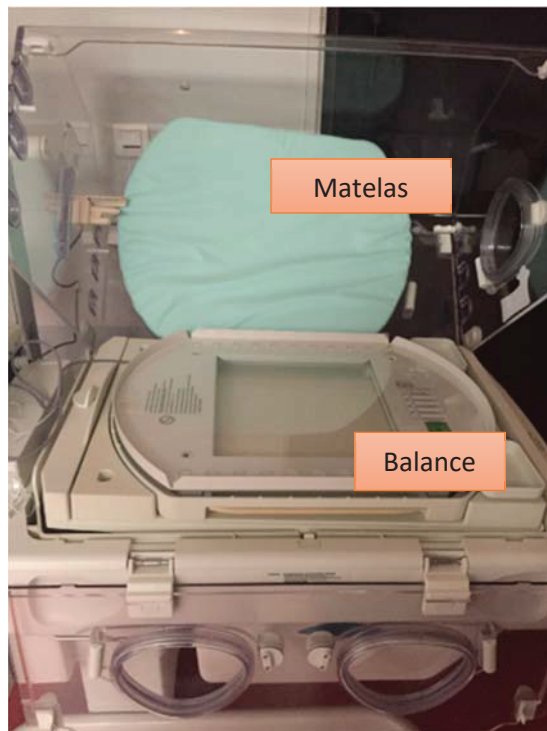


Figure 10: Image de l'intérieur d'une couveuse du service de réanimation néonatale de la Croix-Rousse

Les prélèvements ont été répartis sur 4 journées. Chaque groupe de 3 couveuses était prélevé pendant 2 jours : un jour de prélèvement avant décontamination et un jour de prélèvement après décontamination. Chaque jour, 27 prélèvements étaient réalisés sur 3 couveuses. Ces mêmes couveuses étaient de nouveau prélevées le lendemain, aux mêmes endroits que la veille, après leur décontamination. Cette procédure était de nouveau réitérée sur 3 autres couveuses, soit un total de 6 couveuses prélevées pendant 4 jours.

Ainsi, 54 prélèvements ont été effectués avant puis après décontamination des 6 couveuses, soit un total de 108 prélèvements pour les 6 couveuses durant ces 4 jours.

4. Prélèvement en salle de décontamination

Les résultats de ces derniers prélèvements ont mis en évidence une forte contamination des couveuses à *S. capitis* même après décontamination. Nous avons donc suspecté une recolonisation bactérienne précoce des couveuses par le personnel en charge de la décontamination. Ainsi une série de prélèvements a été réalisée directement dans la salle de décontamination sur le matériel fréquemment manipulé par le personnel en charge de cette décontamination, et sur les surfaces susceptibles d'être contaminées (tableau 1). Le même

protocole de prélèvement et d'isolement des 3 types de bactéries que celui décrit précédemment a été appliqué.

Tableau 1: Liste des matériels et surfaces prélevés dans le cadre de notre étude, en salle de décontamination.

Matériels	Surfaces
<ul style="list-style-type: none"> -Ordinateurs (écrans+ claviers + souris) -Tableaux d'ardoise (+ feutres + aimants) -Gants 	<ul style="list-style-type: none"> -Interrupteurs -Placards (poignées + intérieur) -Manivelles de stores -Robinets (+ mitigeurs) -Eviers -Carreaux (situés au-dessus des éviers)

B. Etude de la persistance *in vitro* du clone NRCS-A

Devant la forte prévalence de l'espèce *S. capitis* par rapport aux autres bactéries recherchées au sein du service de réanimation néonatale de la Croix-Rousse, nous nous sommes interrogés sur une possible capacité du clone NRCS-A à persister dans l'environnement. Nous avons donc réalisé une expérimentation *in vitro* de comparaison des survies de différentes espèces de SCN incluant le clone NRCS-A.

L'étude a été réalisée sur 3 souches différentes pour chacune des 4 espèces bactériennes suivantes : *S. capitis* NRCS-A, *S. capitis* non NRCS-A, *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*, soit un total de 12 souches. Ces souches étaient des souches cliniques isolées d'hémocultures de nouveau-nés, et disponibles dans la collection du laboratoire de bactériologie de l'hôpital de la Croix Rouse.

Pour chacune des souches, 14 tubes ont été ensemencés afin de prévoir deux tubes par temps de lectures (1^{er}, 3^e, 7^e, 14^e, 21^e, 28^e et 60^e jour). Pour chaque tube, 10 µL d'inoculum bactérien standardisé à 0,5 Mc Farland (soit environ $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL) ont été déposés au fond d'un tube de 2mL puis les tubes ont été laissés sous hotte à température ambiante. A chaque temps de lecture et pour chaque souche, le dénombrement des bactéries persistantes en fond de tube était estimé sur 2 tubes. Pour cela, les bactéries étaient resuspendues dans 1mL de BHI (« Brain Heart Infusion » ou Bouillon de culture cœur-cerveille), puis des aspirations-refoulements étaient réalisés à l'aide d'une pipette, ainsi qu'une sonication pendant 5 minutes à 100%, afin d'homogénéiser le contenu des tubes et de décoller d'éventuelles

bactéries adhérentes. Le contenu des tubes était ensuite étalé sur gélose TSA (Trypto-caséine soja) (Figure 11) et dénombré à l'aide du Spiral après incubation pendant 48 heures à 37°C. A noter qu'avant étalement, une dilution à 10^{-2} et 10^{-4} était réalisée pour les tubes de J0 et J1 puisque l'inoculum attendu était plus élevé que celui des jours suivants.

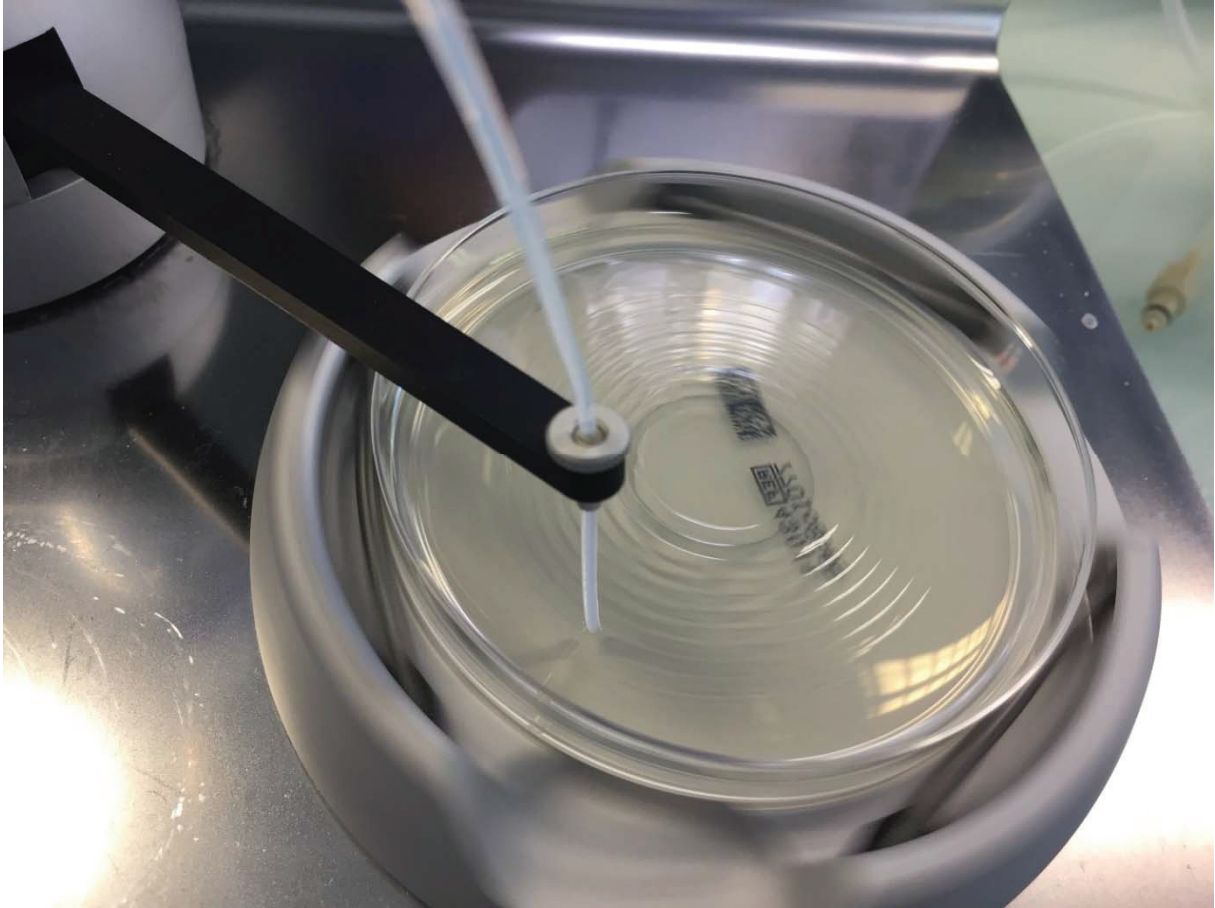


Figure 11: Ensemencement d'une gélose à l'aide du Spiral

V. Résultats

A. Contamination au sein du service de réanimation néonatale

1. Environnement

Les 69 prélèvements environnementaux ont été réalisés sur le matériel utilisé par le personnel soignant, se trouvant à l'intérieur mais également à l'extérieur des alvéoles de soin (tableau 2). Les résultats ont mis en évidence une présence fréquente de *S. capitis* au sein du service, surtout au niveau des alvéoles de soin (26 prélèvements positifs, soit 37,7% de *S. capitis*). Concernant *S. aureus*, 12 prélèvements se sont révélés positifs, ce qui représente un pourcentage de 17,4%. En revanche, nous n'avons retrouvé ni EBMR ni SARM. Au vu de ces résultats, il apparaît que *S. aureus* se localise sur les objets éloignés des alvéoles de soin (notamment les tabliers de radioprotection, les DECTs et le poste d'ordinateur utilisé par les infirmiers) et donc fréquemment manipulés par le personnel soignant, tandis que *S. capitis* se retrouve préférentiellement à proximité des couveuses (notamment les stéthoscopes, les couvertures « cache-couveuses » et les respirateurs et ordinateurs attribués aux alvéoles de soin). Cela concorde avec l'idée évoquée dans la thèse de 2015 selon laquelle les nouveau-nés constituent le réservoir des *S. capitis* (58).

Tableau 2 : Résultats des prélèvements environnementaux réalisés au service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse (les cases colorées correspondent aux objets pour lesquels au moins 50% des prélèvements étaient positifs)

Types de prélèvements	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>
	Positifs (%)	Positifs (%)
Manivelles (n=16)	0	6,25
Tableaux ardoise (n=2)	0	0
Tabliers protection rayons X (n=4)	50	25
Ordinateurs internes (n=5)	40	20
Ordinateurs infirmiers (n=3)	66,7	33,3
DECT (n=4)	75	25
Téléphone fixe (n=1)	0	100
Interphone (n=1)	0	0
Calculatrice internes (n=1)	0	0
Radio portable (n=1)	0	100
Echographe (n=1)	0	0
Alvéole (écran tactile et boutons des respirateurs + écran ordinateurs) (n=8)	0	62,5
Alvéole (clavier +souris) (n=8)	25	37,5
Couvertures (n=6)	16,7	83,3
Stéthoscopes (n=8)	0	87,5
Total (n=69 prélèvements)	17,4	37,7

2. Couveuses

Les résultats précédents ayant mis en évidence une forte colonisation des alvéoles de soin à *S. capitis*, nous nous sommes intéressés ensuite plus particulièrement aux couveuses. Les résultats ont mis en évidence une faible présence de *S. aureus* (parmi les 6 qui ont été prélevées, une seule couveuse était positive et ce seulement après l'étape de décontamination, ce qui laisse supposer une éventuelle recontamination après son nettoyage). En revanche, toutes les couveuses prélevées étaient contaminées par *S. capitis* avant décontamination, et 4 d'entre elles le restaient après (tableau 3). Sur les 54 prélèvements avant décontamination, 31 étaient positifs pour *S. capitis* (57,4%) contre 7 après décontamination (13%). Les matelas, notamment les coutures, ainsi que les hublots et balances étaient les endroits où l'on retrouvait le plus souvent du *S. capitis* après décontamination. Cela peut s'expliquer par le fait que matelas et balances, non immergeables, sont nettoyées à l'aide d'une lingette imbibée de solution antiseptique, contrairement aux autres pièces de la couveuse qui sont immergées dans un bain antiseptique pendant 15 minutes. Concernant les hublots, bien qu'étant immergeables, la présence de bactéries pourrait s'expliquer par un contact insuffisant voire inexistant avec la solution antiseptique, au niveau des contours, dans le cas où les hublots n'auraient pas été ouverts au préalable.

Tableau 3: Résultats des prélèvements des couveuses avant et après leur décontamination. Les croix correspondent aux prélèvements positifs à *S. capitis*

	AVANT DECONTAMINATION						APRES DECONTAMINATION					
Couveuses	G5	G18	G29	G4	G30	G33	G5	G18	G29	G4	G30	G33
Matelas (coutures)	X	X	X	X		X	X		X			
Matelas (dessus)	X	X	X		X	X					X	
Balance (contour + dessus)	X	X	X	X	X	X				X	X	
Poignée arrière		X										
Poignée avant droite	X	X			X							
Poignée avant gauche	X		X	X								
Poignée arrière droite	X		X									
Poignée arrière gauche			X									
Hublots	X	X	X	X	X		X				X	

Par ailleurs, dans notre étude, nous n'avons retrouvé ni EBMR ni SARM au niveau des couveuses.

La forte prévalence de *S. capitis* au niveau des couveuses et des alvéoles de soin, concorde avec les résultats obtenus lors d'études similaires menées au sein du même service lyonnais en 2015 (58) et 2017 (71), mettant en évidence une colonisation large du service, et en particulier des couveuses par *S. capitis*.

3. Salle de décontamination

Devant la présence de *S. aureus* sur une couveuse après décontamination (alors que cette souche n'était pas retrouvée avant décontamination sur le même site de prélèvement), ainsi que la forte colonisation à *S. capitis*, avant et après décontamination, l'idée d'une possible recontamination précoce par le personnel en charge de leur entretien a été envisagée. Après analyse des différents prélèvements, seul un prélèvement réalisé sur le poste d'ordinateur se trouvant dans la salle de décontamination était positif à *S. capitis*. Aucun prélèvement n'était

positif pour *S. aureus*. Ces résultats ne permettent donc pas de confirmer avec certitude l'imputabilité du personnel en charge de la décontamination.

Comme pour les précédents prélèvements, aucuns SARM ni EBMR n'ont été identifiés en salle de décontamination.

B. Persistance du clone NRCS-A dans l'environnement

Au vu des résultats précédents, montrant une forte colonisation du service par *S. capitis*, au niveau des alvéoles de soin et des couveuses, nous avons suspecté que le clone NRCS-A pouvait présenter une capacité particulière de persistance dans l'environnement. Afin d'évaluer les capacités de persistance du clone NRCS-A, nous avons comparé les courbes de survie sur surface inerte (*in vitro*) de souches appartenant à 4 espèces bactériennes, à savoir *S. capitis* NRCS-A, *S. capitis* non NRCS-A, *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*.

Nous avons observé que l'espèce NRCS-A était celle qui présentait le dénombrement bactérien le plus élevé au cours des 60 jours, par rapport aux autres bactéries testées. Les quantités de bactéries persistantes dans les tubes aux différents temps, rapportées à l'inoculum initialensemencé dans le tube, sont détaillées dans le tableau 4. Les résultats sont présentés sur le graphique ci-dessous (Figure 12).

Ces résultats appuient l'hypothèse émise précédemment selon laquelle le clone *S. capitis* NRCS-A aurait une capacité de persistance dans l'environnement supérieure aux autres SCN, ce qui pourrait expliquer la forte prévalence de *S. capitis* au sein du service de réanimation néonatale lyonnais.

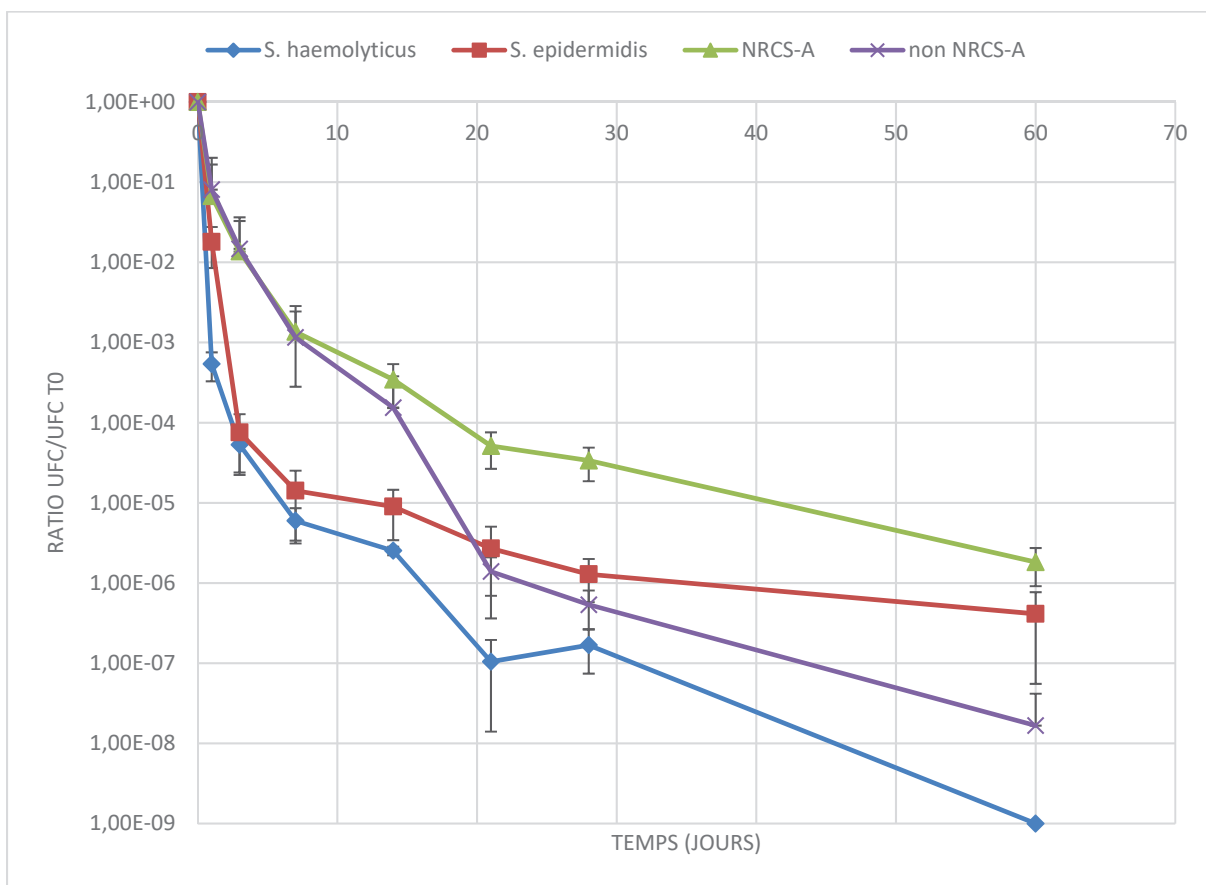


Figure 12: Diagramme des résultats de l'expérimentation in vitro : Evolution dans le temps du dénombrement bactérien moyen de 3 souches de chaque groupe d'espèces de SCN

Tableau 4: Récapitulatif des dénombrements bactériens de chaque souche de SCN, aux différents temps, obtenus au cours de l'expérimentation in vitro.

	<i>S. capitis</i> NRCS-A	<i>S. capitis non</i> NRCS-A	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Temps (jours)	Ratio UFC/UFC T0	Ratio UFC/UFC T0	Ratio UFC/UFC T0	Ratio UFC/UFC T0
0	1	1	1	1
1	0,067138629	0,080721313	0,000540838	0,018023086
3	0,01363765	0,014730639	5,31807E-05	7,57499E-05
7	0,001358544	0,001156076	5,97809E-06	1,41631E-05
14	0,000344728	0,000154272	2,52884E-06	8,99514E-06
21	5,11636E-05	1,39388E-06	1,04493E-07	2,7014E-06
28	3,37149E-05	5,36832E-07	1,6813E-07	1,28628E-06
60	1,82298E-06	1,66667E-08	1,00E-09	4,12371E-07

VI. Discussion

Les SCN (dont l'espèce *S. capitis*) ainsi que *S. aureus* et les entérobactéries (dont les BLSE) font partie des bactéries les plus fréquemment impliquées dans les infections néonatales tardives. En particulier, le clone NRCS-A, appartenant à l'espèce *S. capitis* et présentant une constante hétérorésistance à la vancomycine, est retrouvé spécifiquement chez les nouveau-nés hospitalisés, et avec une forte prévalence dans certains services.

L'objectif des travaux présentés ici était d'identifier la localisation des différentes bactéries dans l'environnement au sein d'un service de réanimation néonatale, afin d'en déterminer les réservoirs. Dans un deuxième temps nous avons évalué l'aptitude du clone NRCS-A à persister dans l'environnement, qui pourrait expliquer sa capacité d'implantation et de diffusion dans de nombreux services de réanimation néonatale.

L'ensemble des prélèvements et analyses présentés ici démontrent tout d'abord la colonisation du service de réanimation néonatale par des souches de *S. aureus* et *S. capitis*, avec des spécificités identifiées pour chaque espèce.

En effet, les souches de *S. aureus* ont été isolées en majorité sur les objets utilisés et manipulés par les soignants, à distance des couveuses, laissant suggérer une mauvaise aseptisation des mains du personnel, puis une transmission manuportée (les claviers d'ordinateurs, y compris ceux des alvéoles de soin, en étaient porteurs). Ces résultats sont cohérents avec des données de la littérature démontrant que *S. aureus* est un pathogène fréquemment identifié dans l'environnement des services (75).

Nous n'avons pas réalisé de typage des souches isolées, donc il n'est pas possible de savoir si une ou plusieurs souches circulaient dans le service durant la période de l'étude. Cette analyse pourrait être intéressante pour explorer les voies de transmission intra-service et les potentielles contaminations des soignants vers l'environnement et/ou les patients, comme cela a été démontré dans d'autres travaux (76). En outre ces données rappellent la nécessité d'une hygiène stricte des mains dans les services, y compris après la manipulation du matériel de soins et/ou des patients pour limiter la transmission de bactéries potentiellement pathogènes à travers le service.

En ce qui concerne les souches de *S. capitis* NRCS-A, elles ont majoritairement été isolées à proximité des couveuses, et donc des patients. Ces résultats suggèrent que le réservoir de ce clone au sein des services de réanimation néonatale serait les patients et les couveuses, et non pas les soignants. Ces données sont cohérentes à la fois avec les données précédentes obtenues dans le même service (71), mais aussi avec les travaux récemment publiés par une équipe néozélandaise qui a montré que les souches de *S. capitis* isolées dans les hémocultures de nouveau-nés étaient les mêmes que celles retrouvées sur le matériel, notamment les stéthoscopes et les couveuses, mais différentes des souches isolées chez les soignants (77). Pour autant, il est probable que sans être le réservoir, l'équipe soignante contribue à la diffusion de ce clone dans le service, par manuportage, au vu de nos résultats (clone retrouvé sur les ordinateurs du service).

A la suite de ces résultats, afin de mieux comprendre les raisons de la forte présence de *S. capitis* à proximité des couveuses, nous avons réalisé une deuxième série de prélèvements directement sur les couveuses, avant et après leur décontamination. Cette étude a permis de mettre en évidence une fréquence importante de colonisation par *S. capitis* dans les deux situations. Ces résultats sont préoccupants puisqu'ils suggèrent qu'une couveuse toujours contaminée par *S. capitis* pourrait être réutilisée pour accueillir un nouveau-né et ainsi l'exposer à un risque de colonisation voire d'infection. Une analyse plus fine de nos résultats a permis de montrer que ce sont les pièces non immersibles dans la solution antiseptique (matelas et balances) et difficilement atteignables par frictions (coutures des matelas) ou par contact (contours des hublots), qui sont les plus souvent contaminées par *S. capitis* après l'étape de désinfection.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans l'étude précédente réalisée dans le même service (71), et font écho à d'autres études publiées concernant des épidémies dans des services de réanimation néonatale. Ainsi récemment Cadot *et al* ont décrit une épidémie impliquant une souche multirésistante de *K. pneumoniae* dans un service de réanimation néonatale et ont identifié les matelas comme étant la principale source de contamination des patients (78). Prises ensemble, ces données insistent sur l'importance d'optimiser les conditions de décontamination des incubateurs et plus largement de l'ensemble du matériel utilisé en réanimation néonatale pour limiter les risques de contamination des patients via leur environnement. Une résistance aux molécules antiseptiques utilisées est possible, et a déjà été évoquée par plusieurs auteurs ayant mis en évidence une tolérance à la chlorhexidine ou aux ammoniums quaternaires chez des souches de *S. capitis* de réanimation néonatale (77,79). Une méthode basée sur l'utilisation de vapeur pourrait être utilisée, puisqu'une étude récente a montré que l'introduction d'un nettoyeur vapeur dans un service de réanimation néonatale avait été associée à une éradication du clone NRCS-A dans ce service (80). Des travaux complémentaires seront prochainement menés dans le laboratoire de la Croix Rousse afin d'étudier l'efficacité des différentes méthodes de décontamination.

Parmi nos résultats, nous avons observé que certains sites de couveuses étaient contaminés après l'étape de désinfection alors qu'ils n'étaient pas contaminés avant. Cela a conduit à réaliser une dernière série de prélèvements sur différentes surfaces dans la salle de décontamination afin d'identifier un possible réservoir dans cette salle qui pourrait être en cause dans cette contamination post-désinfection. Un des prélèvements (ordinateur de la salle) a révélé la présence de *S. capitis*, les autres étaient tous négatifs. Aucun prélèvement n'a retrouvé de *S. aureus*. Des analyses plus poussées, au niveau des mains du personnel, auraient été judicieuses afin de déterminer une possible source à la présence bactérienne après décontamination, autre que l'inefficacité de la technique de nettoyage utilisée.

Enfin on ne peut exclure une contamination des tubes par les personnes réalisant les prélèvements, qui pourrait expliquer la présence de *S. aureus* sur un des prélèvements après décontamination. Ces résultats ne permettent donc pas d'affirmer la recontamination précoce via le personnel en charge de l'entretien des couveuses, même si une rigueur constante est requise pour l'entretien de cette salle.

Au terme de cette première partie de notre travail de recherche, la transmission bactérienne par manuportage via les soignants, attire l'attention sur la nécessité de rigueur de l'équipe soignante au respect des règles d'hygiène dans un service de réanimation néonatale où des patients en situation de vulnérabilité immunologique extrême sont exposés à diverses contaminations. Des erreurs d'hygiène de la part des soignants sont effectivement possibles, comme cela a été rapporté en 2008 dans un service de néonatalogie français, aussi bien au niveau des connaissances théoriques que dans leur application pratique, avec notamment une mauvaise qualité du lavage des mains dans 67% des cas (81).

Dans une deuxième partie de notre travail, nous avons cherché à comprendre pourquoi le clone NRCS-A était particulièrement présent sur les couveuses. Nous avons donc étudié sa capacité à persister dans l'environnement, en mettant au point un protocole de suivi de courbes de croissance de *S. capitis* NRCS-A sur surface inerte *in vitro*, en comparaison avec d'autres souches de SCN. Cette étude a démontré une capacité de maintien de *S. capitis* NRCS-A supérieure aux autres bactéries testées dans les mêmes conditions.

Cela soulève plusieurs hypothèses quant au pouvoir des souches du clone NRCS-A à résister à différentes situations comme la chaleur, l'humidité, la sécheresse ou encore à des variations importantes de pH ou de luminosité, qui nécessiteraient d'être plus approfondies à l'avenir. Une autre théorie pour expliquer la forte prévalence de *S. capitis* NRCS-A au sein du service, porterait sur son biofilm, qui serait plus résistant ou produit en quantité plus importante que ceux des autres SCN, lui conférant ainsi une protection optimale permettant sa prolifération et son implantation au sein du service. Il est également possible que le clone NRCS-A présente une vitesse de multiplication supérieure à celle des autres SCN, qui expliquerait sa fréquence importante par diffusion rapide au sein du service. Ces suppositions devront être confirmées expérimentalement.

Au cours de nos travaux, nous avons dû faire face à certains résultats inattendus. En particulier, le service de réanimation néonatale de la Croix-Rousse a été prélevé en pleine période d'épidémie à EBMR. L'un des principaux objectifs était de pouvoir établir une liste des réservoirs potentiels de ces bactéries. Or, aucun des prélèvements n'a mis en évidence d'entérobactéries. La question se pose alors quant à la fiabilité de la méthode d'isolement utilisée, qui ne serait peut-être pas assez sensible pour détecter ce type de bactéries.

Une autre hypothèse pourrait être que le portage des EBMR ne serait pas environnemental mais plutôt humain, ou encore que ces bactéries ne puissent survivre longtemps sur des surfaces inertes et se transmettraient plutôt de soignants à patients et/ou de patients à patients par manuportage, d'où l'intérêt d'un prélèvement des soignants que nous aurions pu envisager.

L'absence d'EBMR isolées pourrait également s'expliquer par une transmission mère-enfant directe, comme ceci a déjà été démontré lors d'une récente étude (82). A la lumière des résultats de cette dernière étude, des prélèvements pourraient être envisagés auprès des mères des prématurés pour lesquels les hémocultures et/ou coprocultures se sont révélées positives aux EBMR. Un typage des souches isolées serait alors intéressant afin de les comparer aux souches des nouveau-nés infectés, pour pouvoir confirmer leur mode de

transmission, de la mère à l'enfant. Toutefois, ce type de transmission pourrait être incriminé dans des cas sporadiques mais n'expliquerait pas la survenue d'épidémie au sein d'un service.

Par ailleurs, d'autres phénomènes ont précédemment été rapportés à l'origine de contaminations croisées à EBMR, responsables d'épidémies dans les services de réanimation néonatale. Ainsi, Gransden *et al* ont rapporté une épidémie liée à la contamination de lait maternel en raison d'une mauvaise désinfection des tire-laits d'un service. L'épidémie a pu être maîtrisée grâce à un réajustement des mesures de décontamination de ces appareils (83). Une autre étude avait documenté une transmission d'EBMR via le gel utilisé pour les échographies (84). En résumé, comme nous l'avons rappelé plus haut, une constante rigueur dans l'application des règles de désinfection est primordiale afin d'éviter une contamination bactérienne au sein des services de réanimation néonatale.

L'épidémie à EBMR, présente au sein du service lors de nos travaux, justifie l'importance d'une surveillance accrue des voies de transmission et de diffusion de ces bactéries, avec notamment, si possible, l'isolement précoce des enfants contaminés mais également des mères porteuses d'EBMR. A cet effet, des dépistages précoces doivent être effectués dès l'admission des patients dans le service.

Enfin, il est possible qu'une résistance des EBMR aux antiseptiques utilisés au sein du service puisse expliquer la diffusion d'une souche responsable de l'épidémie, comme évoquée précédemment pour des souches de *S. capitis*. Cette hypothèse pourrait faire l'objet d'une étude expérimentale *in vitro*, en soumettant des souches d'EBMR, mais également de toutes les bactéries recherchées dans ce travail, à des concentrations croissantes de l'antiseptique utilisé en service.

Concernant l'absence de SARM dans l'environnement, cela n'exclue pas, comme pour les entérobactéries, une transmission directe soignants-patients, comme ceci a déjà été rapporté dans d'autres études (85). Les soignants pouvant être des réservoirs de SARM, il aurait été intéressant de réaliser des prélèvements au niveau des mains mais également des fosses nasales où se loge le *S. aureus* chez les porteurs sains, puis de les comparer aux hémocultures des nouveau-nés positifs au SARM.

En ce qui concerne l'impact de nos résultats, on ignore si l'on peut les extrapoler à d'autres services dans la mesure où ils ont été réalisés dans un seul service de réanimation néonatale sur une période donnée et sur un petit nombre de prélèvements. Néanmoins ces données pointent une problématique centrale en réanimation néonatale qui est celle de l'entretien des couveuses et du matériel.

Enfin, notre étude *in vitro* est probablement exposée à des biais liés à la méthodologie puisque les conditions expérimentales qui ont été choisies ne sont pas forcément représentatives des conditions réelles au sein du service (matériaux différents, exposition à la chaleur, à l'humidité, à la lumière etc...). Des travaux complémentaires devront être menés pour mieux comprendre comment NRCS-A arrive à persister.

VII. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons démontré que les souches de *S. aureus* étaient principalement retrouvées à proximité des soignants, laissant suggérer un portage par le personnel même si les données disponibles ne permettent pas de confirmer cette hypothèse. Toutefois aucun SARM n'a été identifié au sein du service. Les souches de *S. capitis*, quant à elles, ont été isolées en très grande majorité aux alentours des couveuses, laissant suggérer que ces dernières seraient la source de contamination du service à *S. capitis*. La capacité de NRCS-A à persister sur les surfaces inertes pourraient expliquer ce phénomène. De plus, l'inefficacité des techniques de décontamination des couveuses a également été mise en évidence, notamment pour les pièces non immergeables ou non atteignables. Enfin, les derniers prélèvements réalisés en salle de décontamination n'ont pas permis d'établir un lien entre le personnel en charge de l'entretien des couveuses, et une recontamination précoce de celles-ci par manuportage.

Malgré un travail réalisé dans un contexte d'épidémie à EBMR au sein du service de réanimation néonatale, aucune entérobactérie n'a été identifiée. Cela soulève la question de la fiabilité des méthodes de prélèvement utilisées mais aussi de la stratégie choisie de ne rechercher les EBMR uniquement dans l'environnement, sans y inclure les soignants ou les visiteurs extérieurs au service, ainsi que les nouveau-nés.

Plusieurs problématiques ressortent de notre étude. Tout d'abord, pour l'entretien des couveuses, il est urgent de renforcer les protocoles actuels et d'étudier des techniques alternatives, basées sur d'autres molécules ou d'autres procédés comme la vapeur. Concernant le service dans sa globalité, le manuportage bactérien via les soignants étant fortement suspecté dans la dissémination bactérienne environnementale, la nécessité de rappeler régulièrement au personnel soignant, les règles d'hygiène, s'avère indispensable. Les nouveaux arrivants doivent y être initiés et les autres membres de l'équipe médicale doivent être soumis à des évaluations de leurs acquis, réactualisés le cas échéant. Afin de garantir cette démarche, des audits et formations continues devraient être menées régulièrement pour permettre une totale implication de l'équipe médicale, dans la lutte contre les infections nosocomiales.

De même, afin d'établir avec certitude l'origine de transmission des bactéries étudiées, il serait judicieux de recourir à des prélèvements sur les soignants, visiteurs du service, nouveau-nés et leur mère, puis de réaliser des typages des souches isolées. La meilleure compréhension des cycles de transmission pourrait ainsi permettre de mieux combattre la transmission au sein du service, par des mesures d'isolement de patients ou éventuellement de décontamination.

Par ailleurs, au regard de nos résultats, il semble nécessaire d'étendre les connaissances concernant les caractéristiques bactériennes des souches impliquées dans les infections néonatales tardives (capacité de persistance in vitro, biofilm, résistance aux antiseptiques...). Ceci, afin de mieux comprendre et contrer leur capacité de dissémination.

Enfin, même si ce n'était pas l'objet de la présente étude, la présence de bactéries multi-résistantes (EBMR, *S. capitis* NRCS-A) au sein du service de réanimation néonatale doit rappeler la nécessité d'une utilisation raisonnée et adaptée des antibiotiques, démarche indispensable dans la lutte contre les résistances bactériennes.

En effet, il avait déjà été démontré que le clone NRCS-A qui se retrouvait principalement dans les services de réanimation néonatale, s'y implantait par adaptation à la pression de sélection à la vancomycine, antibiotique largement prescrit dans ces services (58).

Pour conclure, les infections néonatales tardives doivent faire l'objet d'une attention particulière, par le renforcement des protocoles d'hygiène et de lutte contre les résistances bactériennes, mais également par l'approfondissement des connaissances des bactéries incriminées.

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR: Madame BAGHADI Dalila

Les complications liées à la prématurité sont à l'origine de plus d'1 million de décès par an dans le monde, et constituent la première cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans.

Parmi ces complications, les infections néonatales tardives (survenant après le 3^{ème} jour de vie) concernent plus d'un tiers des prématurés de faible poids de naissance (inférieur à 1500g). Plusieurs études ont précédemment décrit un lien entre ces infections et l'environnement des services de réanimation néonatale.

Trois types bactériens sont fréquemment mis en cause lors de ces infections : les staphylocoques à coagulase négative, les *Staphylococcus aureus* (dont le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline) et les entérobactéries (dont les entérobactéries multi-résistantes, d'ailleurs impliquées dans une épidémie au service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse au moment de notre étude). Parmi les staphylocoques à coagulase négative, des études récentes ont démontré que le clone NRCS-A, appartenant à l'espèce *Staphylococcus capitis*, et présentant un profil multirésistant aux antibiotiques, était retrouvé avec une forte prévalence, dans plusieurs services de réanimation néonatale à travers le monde.

Dans ce travail, afin d'identifier les réservoirs de ces pathogènes, plusieurs prélèvements bactériens ont été réalisés entre les mois de juillet et octobre 2017, au sein du service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse à Lyon.

Une première série de prélèvements a été menée sur les surfaces et les objets utilisés pour les soins des prématurés. Les *S. aureus* ont été retrouvés majoritairement à distance des couveuses sur les objets fréquemment manipulés par le personnel, évoquant une origine de contamination par les soignants via manuportage. En revanche, la plupart des *Staphylococcus capitis* NRCS-A a été isolée à proximité des couveuses, laissant supposer que les prématurés seraient à l'origine de la contamination du service par cette espèce bactérienne.

Une deuxième série de prélèvements a ensuite été effectuée sur 6 couveuses choisies aléatoirement, avant et après leur décontamination. Les résultats ont révélé une forte colonisation des couveuses par *Staphylococcus capitis* NRCS-A, avant et après leur nettoyage, mettant en évidence une inefficacité de leur désinfection.

Devant la suspicion d'une recontamination précoce des couveuses par le personnel en charge de leur entretien, les surfaces et le matériel de la salle de décontamination ont fait l'objet d'une dernière série de prélèvements, qui n'a pas permis de confirmer cette hypothèse.

Aucune souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la métilcilline, ni d'entérobactéries multi-résistantes n'a été mise en évidence lors de ces différentes séries de prélèvements dans le service de réanimation néonatale.

Nos résultats suggèrent la capacité de persistance dans l'environnement du clone NRCS-A. Cette hypothèse a été testée par expérimentation *in vitro* consistant en un suivi sur plusieurs semaines du dénombrement bactérien de différents staphylocoques sur surface inerte. Ces derniers travaux ont mis en évidence une persistance plus importante pour le clone NRCS-A que pour les autres staphylocoques blancs auxquels il était comparé, à savoir : les espèces *Staphylococcus epidermidis*, *haemolyticus* et *capitis* non NRCS-A.

Au terme de notre étude, il apparaît nécessaire de renforcer les mesures d'hygiène au sein du service. En particulier de nouvelles techniques de décontamination des couveuses doivent être envisagées (comme la méthode de stérilisation à la vapeur) et une réactualisation des règles d'aseptisation en service doit être menée afin de palier à la transmission manuportée des pathogènes.

A ce titre, des prélèvements humains (nouveau-nés, soignants, parents, visiteurs) suivis d'un typage des bactéries isolées, pourront apporter plus d'informations sur les origines de contamination et de diffusion des pathogènes à travers le service. Ils aideront, ainsi, à lutter contre la transmission bactérienne, par la mise en place de mesures d'isolement et/ou de décontamination.


D'autre part, il est primordial d'étendre les connaissances à propos des caractéristiques des bactéries incriminées (capacité de persistance *in vitro*, biofilm, résistance aux antiseptiques..).

Enfin, de manière plus générale, la présence de bactéries multi-résistantes au sein du service (Entérobactéries multi-résistantes, clone NRCS-A) rappelle la nécessité d'une utilisation raisonnée des antibiotiques. En effet, l'implantation du clone NRCS-A en réanimation néonatale avait déjà été imputée à une adaptation à la pression de sélection à la vancomycine, antibiotique largement prescrit dans ces services.

Le Président de la thèse,



Signature


Pr Frédéric LAURENT
Laboratoire de Microbiologie et Mycologie
UCB LYON 1 - ISPBL
Centre International de Recherche en Infectiologie
INSERM U1111 - CNRS UMR5308 - ENS Lyon
8 avenue Rockefeller
69373 LYON Cedex 08 - France
Tél. : 04 72 07 18 37 - 06.74.25.65.09
Frederic.laurent@univ-lyon1.fr

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 12 DEC. 2019

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie



Pour le Président de l'Université Claude Bernard
Lyon 1,

VIII. Références

1. OMS. Naissances prématurées. [en ligne]. 2018 [consulté le 23 septembre 2018]. Disponible: <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>.
2. Costeloe KL, Hennessy EM, Haider S, Stacey F, Marlow N, Draper ES. Short term outcomes after extreme preterm birth in England: comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies). *BMJ*. 2012;345:e7976.
3. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2002;110(2 Pt 1):285-91.
4. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD neonatal research network. *Pediatrics*. 2010;126(3):443-56.
5. Boghossian NS, Page GP, Bell EF, Stoll BJ, Murray JC, Cotten CM, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight infants from singleton and multiple gestation births. *J Pediatr*. 2013;162(6):1120-1124.e1.
6. Sohn AH, Garrett DO, Sinkowitz-Cochran RL, Grohskopf LA, Levine GL, Stover BH et al. Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: Results from the first national point-prevalence survey. *J Pediatr*. 2001;139(6):821-7.
7. Távora ACVCF, Castro AB, Militão MAM, Girão JE, Ribeiro Kde C, Távora LG. Risk factors for nosocomial infection in a Brazilian neonatal intensive care unit. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(1):75-9.
8. Rønnestad A, Abrahamsen TG, Medbø S, Reigstad H, Lossius K, Kaaresen PI et al. Late-onset septicemia in a Norwegian national cohort of extremely premature infants receiving very early full human milk feeding. *Pediatrics*. 2005;115(3):e269-76.
9. Freeman J, Goldmann DA, Smith NE, Sidebottom DG, Epstein MF, Platt R. Association of intravenous lipid emulsion and coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care units. *N Engl J Med*. 1990;323(5):301-8.
10. Benjamin DK, Stoll BJ, Fanaroff AA, McDonald SA, Oh W, Higgins RD, et al. Neonatal candidiasis among extremely low birth weight infants: risk factors, mortality rates, and neurodevelopmental outcomes at 18 to 22 months. *Pediatrics*. 2006;117(1):84-92.
11. Levit O, Bhandari V, Li F-Y, Shabanova V, Gallagher PG, Bizzarro MJ. Clinical and laboratory factors that predict death in very low birth weight infants presenting with late-onset sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(2):143-6.

12. Cohen-Wolkowicz M, Moran C, Benjamin DK, Cotten CM, Clark RH, Benjamin DK Jr et al. Early and late onset sepsis in late preterm infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(12):1052–6.
13. Hornik CP, Fort P, Clark RH, Watt K, Benjamin DK Jr, Smith PB et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev*. 2012;88 Suppl 2:S69–74.
14. Isaacs D, Australasian Study Group For Neonatal Infections. A ten year, multicentre study of coagulase negative staphylococcal infections in Australasian neonatal units. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88(2):F89–93.
15. Shah J, Jefferies AL, Yoon EW, Lee SK, Shah PS. Risk Factors and Outcomes of Late-Onset Bacterial Sepsis in Preterm Neonates Born at < 32 Weeks' Gestation. *Am J Perinatol*. 2015;32(7):675–82.
16. Schlapbach LJ, Aebischer M, Adams M, Natalucci G, Bonhoeffer J, Latzin P et al. Impact of sepsis on neurodevelopmental outcome in a Swiss National Cohort of extremely premature infants. *Pediatrics*. 2011;128(2):e348–57.
17. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA*. 2004;292(19):2357–65.
18. Lee J, Dammann O. Perinatal infection, inflammation, and retinopathy of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2012;17(1):26–9.
19. Yannick Aujard. Méningites bactériennes du nouveau-né : aspects diagnostiques et thérapeutiques. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 1999;2(1):65-71.
20. Gray JE, Richardson DK, McCormick MC, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia among very low birth weight infants: relation to admission illness severity, resource use, and outcome. *Pediatrics*. 1995;95(2):225–30.
21. Payne NR, Carpenter JH, Badger GJ, Horbar JD, Rogowski J. Marginal increase in cost and excess length of stay associated with nosocomial bloodstream infections in surviving very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2004;114(2):348–55.
22. Hira V, Sluijter M, Goessens WHF, Ott A, de Groot R, Hermans PWM, et al. Coagulase-Negative Staphylococcal Skin Carriage among Neonatal Intensive Care Unit Personnel: from Population to Infection. *J Clin Microbiol*. 2010;48(11):3876.
23. Golan Y, Doron S, Sullivan B, Snyderman DR. Transmission of vancomycin-resistant enterococcus in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(6):566-7.
24. Vergnano S, Menson E, Kennea N, Embleton N, Russell AB, Watts T, et al. Neonatal infections in England: the NeonIN surveillance network. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2011;96(1):F9-14.
25. Patel D, Nimbalkar A, Sethi A, Kungwani A, Nimbalkar S. Blood culture isolates in neonatal sepsis and their sensitivity in Anand District of India. *Indian J Pediatr*. 2014;81(8):785-90.

26. Jyothi P, Basavaraj MC, Basavaraj PV. Bacteriological profile of neonatal septicemia and antibiotic susceptibility pattern of the isolates. *J Nat Sci Biol Med.* 2013;4(2):306-9.
27. FMPMC-PS - Bactériologie - Niveau DCEM1-Staphylocoques. [En ligne]. 2003. [consulté le 14 octobre 2018]. Disponible : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.3.html>
28. ANSES. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques. [En ligne]. 2011.[consulté le 16 octobre 2018]. Disponible : <https://www.anses.fr/fr/content/fiche-de-description-de-danger-biologique-transmissible-par-les-aliments-staphylococcus-0>
29. Verdier I, Lina G, Gillet Y, Vandenesch F. *Staphylococcus* [En ligne]. [consulté le 16 octobre 2018]. Disponible : <http://www.microbes-edu.org/etudiant/staph.html>
30. BOYCE T.G. Intoxication alimentaire à staphylocoque - Troubles digestifs [En ligne]. *Manuels MSD pour le grand public.* 2017. [consulté le 16 octobre 2018]. Disponible : <https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/troubles-digestifs/gastro-ent%C3%A9rite/intoxication-alimentaire-%C3%A0-staphylocoque>
31. CIRI. Pathogénie des staphylocoques. [En ligne]. 2013. [Consulté le 1 novembre 2018]. Disponible : <http://ciri.inserm.fr/les-equipes/toutes-nos-equipes/pathogenese-des-infections-a-staphylocoques/themes-de-recherche/>
32. Gerard M. Prise en charge ambulatoire du *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline (MRSA) d'origine communautaire en Belgique. *Rev Med Brux.* 2016;6.
33. Laurent F. L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* et ses pièges. [En ligne]. 2012. [consulté le 7 novembre 2019]. Disponible : https://collegebvh.org/system/files/fichiers/document/fichiers/laurent_ok.pdf.
34. Kloos WE, Schleifer KH. Isolation and characterization of staphylococci from human skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1975;25(1):62-79.
35. Bannerman TL, Kloos WE. *Staphylococcus capitis* subsp. *ureolyticus* subsp. nov. from human skin. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1991;41(1):144-7.
36. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):870-926.
37. Petti CA, Simmon KE, Miro JM, Hoen B, Marco F, Chu VH, et al. Genotypic diversity of coagulase-negative Staphylococci causing endocarditis: a global perspective. *J Clin Microbiol.* 2008;46(5):1780-4.
38. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG, Bayer AS, et al. Clinical presentation, etiology and outcome of infective endocarditis in the 21st Century: the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort study. *Arch Intern Med.* 2009;169(5):463-73.

39. García de la Mària C, Cervera C, Pericàs JM, Castañeda X, Armero Y, Soy D, et al. Epidemiology and prognosis of coagulase-negative staphylococcal endocarditis: impact of vancomycin minimum inhibitory concentration. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0125818.
40. Raad I, Kassar R, Ghannam D, Chaftari AM, Hachem R, Jiang Y. Management of the catheter in documented catheter-related coagulase-negative staphylococcal bacteremia: remove or retain? *Clin Infect Dis*. 2009;49(8):1187-94.
41. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39(3):309-17.
42. Coello R, Charlett A, Ward V, Wilson J, Pearson A, Sedgwick J, et al. Device-related sources of bacteraemia in English hospitals--opportunities for the prevention of hospital-acquired bacteraemia. *J Hosp Infect*. 2003;53(1):46-57.
43. Seifert H, Cornely O, Seggewiss K, Decker M, Stefanik D, Wisplinghoff H, et al. Bloodstream infection in neutropenic cancer patients related to short-term nontunnelled catheters determined by quantitative blood cultures, differential time to positivity, and molecular epidemiological typing with pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):118-23.
44. Dobbins BM, Kite P, Kindon A, McMahon MJ, Wilcox MH. DNA fingerprinting analysis of coagulase negative staphylococci implicated in catheter related bloodstream infections. *J Clin Pathol*. 2002;55(11):824-8.
45. Tevell S, Hellmark B, Nilsson-Augustinsson Å, Söderquist B. *Staphylococcus capitis* isolated from prosthetic joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(1):115-22.
46. Gazeau P, Noury J-B, Binard A, Tandé D, Cornec D. *Staphylococcus capitis* chronic non-destructive septic arthritis without orthopedic implant. *Med Mal Infect*. 2016;46(6):329-30.
47. Fukuda S, Wada K, Yasuda K, Iwasa J, Yamaguchi S. Acute osteomyelitis of the acetabulum induced by *Staphylococcus capitis* in a young athlete. *Pediatr Rep*. 2010;2(1).
48. Hyo Y, Yamada S, Harada T. Characteristic cell wall ultrastructure of a macrolide-resistant *Staphylococcus capitis* strain isolated from a patient with chronic sinusitis. *Med Mol Morphol*. 2008;41(3):160-4.
49. Oud L. Community-acquired meningitis due to *Staphylococcus capitis* in the absence of neurologic trauma, surgery, or implants. *Heart Lung*. 2011;40(5):467-71.
50. Walther-Wenke G, Schrezenmeier H, Deitenbeck R, Geis G, Burkhart J, Höchsmann B, et al. Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical follow-up. *Ann Hematol*. 2010;89(1):83-91.
51. Wang SM, Liu CC, Tseng HW, Yang YJ, Lin CH, Huang AH, et al. *Staphylococcus capitis* bacteremia of very low birth weight premature infants at neonatal intensive care

- units: clinical significance and antimicrobial susceptibility. *J Microbiol Immunol Infect*. 1999;32(1):26-32.
52. Van Der Zwet WC, Debets-Ossenkopp YJ, Reinders E, Kapi M, Savelkoul PHM, Van Elburg RM, et al. Nosocomial Spread of a *Staphylococcus capitis* Strain with Heteroresistance to Vancomycin in a Neonatal Intensive Care Unit. *J Clin Microbiol*. 2002;40(7):2520-5
 53. Bradford R, Manan RA, Daley AJ, Pearce C, Ramalingam A, D’Mello D, et al. Coagulase-negative staphylococci in very-low-birth-weight infants: inability of genetic markers to distinguish invasive strains from blood culture contaminants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25(5):283-90.
 54. D’mello D, Daley AJ, Rahman MS, Qu Y, Garland S, Pearce C, et al. Vancomycin Heteroresistance in Bloodstream Isolates of *Staphylococcus capitis*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(9):3124-6
 55. Rasigade J-P, Raulin O, Picaud J-C, Tellini C, Bes M, Grando J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus capitis* with reduced vancomycin susceptibility causes late-onset sepsis in intensive care neonates. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31548.
 56. Butin M, Rasigade J-P, Martins-Simões P, Meugnier H, Lemriss H, Goering RV, et al. Wide geographical dissemination of the multiresistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A clone in neonatal intensive-care units. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(1):46-52.
 57. Butin M, Dumont Y, Rasigade JP, Martins Simoes P, Hoden L, Picaud JC et al. Chromogenic detection procedure for the multidrug-resistant, neonatal sepsis-associated clone *Staphylococcus capitis* NRCS-A. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;90(2):81-82.
 58. Butin M. Clone de *Staphylococcus capitis* NRCS-A multirésistant et endémique : une illustration de la problématique des infections néonatales tardives à Staphylocoque à coagulase négative [Thèse d’exercice]. Lyon, France: Université Claude Bernard; 2015.
 59. Pilippon A. Les entérobactéries. [En ligne]. 2001. [Consulté le 23 novembre 2018]. Disponible : <http://www.microbes-edu.org/etudiant/entero.html>
 60. FMPMC-PS - Bactériologie - Niveau DCEM1-Entérobactéries et autres bacilles à gram négatif non exigeants. [En ligne]. 2003. [Consulté le 25 novembre 218]. Disponible : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.7.html>
 61. Khayar Y. Comportement des enterobacteries isolees des urines vis-a-vis de l’amoxicilline – acide clavulanique l’imipeneme et l’ertapeneme [Thèse d'exercice]. Rabat, Maroc : Université Mohammed V; 2011
 62. Thermo Scientific. Quick and easy screening direct from clinical samples in just 24 hours-Brilliance ESBL. [En ligne]. 2013 [Consulté le 25 novembre 2018]. Disponible : <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/brochures/Thermo-Scientific-Brilliance-ESBL-Sell-Sheet-EU-EN-PO5302A-low-res.pdf>.
 63. Mamod A. Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3ème génération : quelles alternatives aux carbapénèmes ? Etude prospective de la sensibilité in vitro du céfépim,

du mécillinaam et de la témocilline au CHU de Poitiers [Thèse d'exercice]. Poitiers, France : Université de Poitiers ; 2016

64. Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé. Santé Publique France ; 2013. 181p. Disponible : <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques/documents/rapport-synthese/enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-france-mai-juin-2012.-r>.
65. HPCI. Bactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (ESBL ou BLSE). [En ligne]. 2018 [Consulté le 2 décembre 2018]. Disponible sur: <https://www.hpci.ch/prevention/bases-theoriques/microorganismes-et-pathologies/bact%C3%A9ries-productrices-de-b%C3%A9ta-lactamases>
66. ac-montpellier. Phénotypes de résistance des entérobactéries aux bêta-lactamines. [En ligne]. 2016 [consulté le 1 décembre 2018]. Disponible : [_http://disciplines.ac-montpellier.fr/biotechnologies/sites/sti3/files/microbiologie/phenotype_resistance_entero_b_lactamines_2016.pdf](http://disciplines.ac-montpellier.fr/biotechnologies/sites/sti3/files/microbiologie/phenotype_resistance_entero_b_lactamines_2016.pdf)
67. HPCI. Entérobactéries productrices de carbapénémase (CRE ou EPC). [En ligne]. 2018. [Consulté le 2 décembre 2018]. Disponible sur: <https://www.hpci.ch/prevention/bases-theoriques/microorganismes-et-pathologies/ent%C3%A9robact%C3%A9ries-avec-carbap%C3%A9n%C3%A9mase-cre-ou>
68. Biran V, Soude S, Aujard Y. Particularités des infections nosocomiales chez l'enfant fragile. Spécificités en néonatalogie. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 2012;15(1):41-5.
69. Biran V, Gaudin A, Mariani-Kurdjian P, Doit C, Bingen E, Aujard Y. Infections néonatales tardives à entérobactéries multirésistantes. *Archives de Pédiatrie*. 2010;17:S150-3
70. Butin M, Martins-Simões P, Meugnier H, Picaud J-C, Pichon B, Kearns A, et al. Infections néonatales à *S. capitis* : endémie mondiale du clone NRCS-A. Poster présenté à: RICAI 2015; 2015 déc; RICAI 2015.
71. Dumont Y. Clone de *Staphylococcus capitis* NRCS-A responsable d'infection néonatale tardive: exploration de la contamination environnementale et analyse génomique [Thèse d'exercice]. Lyon, France : Université Claude Bernard; 2017.
72. Martins-Simões P, Rasigade J-P, Lemriss H, Butin M, Ginevra C, Lemriss S, et al. Characterization of a novel composite staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec-SCCcad/ars/cop) in the neonatal sepsis-associated *Staphylococcus capitis* pulsotype NRCS-A. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(12):6354-7.
73. Butin M, Martins-Simões P, Picaud JC, Kearns A, Claris O, Vandenesch F, et al. Adaptation to vancomycin pressure of multiresistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A involved in neonatal sepsis. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(11):3027-31.

74. Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):5-14.
75. Fujimura S, Kato S, Hashimoto M, Takeda H, Maki F, Watanabe A. Survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from neonates and the environment in the NICU. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2004;10(2):131-2.
76. Cheng VCC, Wong S-C, Cao H, Chen JHK, So SYC, Wong SCY, et al. Whole-genome sequencing data-based modeling for the investigation of an outbreak of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(3):563-73.
77. Carter GP, Ussher JE, Da Silva AG, Baines SL, Heffernan H, Riley TV, et al. Genomic Analysis of Multiresistant *Staphylococcus capitis* Associated with Neonatal Sepsis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(11).
78. Cadot L, Bruguière H, Jumas-Bilak E, Didelot MN, Masnou A, de Barry G et al. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak reveals incubators as pathogen reservoir in neonatal care center. *Eur J pediatr* 2019 ;178(4):505-513
79. Lepointeur M, Royer G, Bourrel AS, Romain O, Duport C, Doucet-Populaire F, et al. Prevalence of resistance to antiseptics and mupirocin among invasive coagulase-negative staphylococci from very preterm neonates in NICU: the creeping threat? *J Hosp Infect*. 2013;83(4):333-6.
80. Ory J, Cazaban M, Richaud-Morel B, Maio MD, Dunyach-Remy C, Pantel A, et al. Successful implementation of infection control measure in a neonatal intensive care unit to combat the spread of pathogenic multidrug resistant *Staphylococcus capitis*. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):1-6.
81. V. Dicko-Traore F, Gire C, Brevaut Malaty V, Busutill M, Monnier A-S, Brunel V. Évaluation des connaissances et des pratiques d'hygiène des mains au niveau de l'unité de néonatalogie et soins intensifs du service de médecine infantile et néonatalogie de l'hôpital Nord, Marseille. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*. 2011;24(4):172-7.
82. Danino D, Melamed R, Sterer B, Porat N, Hazan G et al. Mother-to-child transmission of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *The Journal of Hospital Infection*. 2018; 100(1):40-6
83. Gransden WR, Webster M, French GL, Phillips I. An outbreak of *Serratia marcescens* transmitted by contaminated breast pumps in a special care baby unit. *J Hosp Infect*. 1986;7(2):149-54.
84. Gaillot O, Maruéjols C, Abachin E, Lecuru F, Arlet G, Simonet M, et al. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J Clin Microbiol*. 1998;36(5):1357-60.
85. Velazco E, Nieves B, Araque M, Calderas Z. Epidemiología de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus aureus* en una unidad de alto riesgo neonatal. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2002;20(7):321-5.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Serment des Pharmaciens Au moment d'être reçu Docteur en Pharmacie,



En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- De coopérer avec les autres professionnels de santé*

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date :

Signature de l'étudiant et du Président du jury

ISPB FACULTE DE PHARMACIE



L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

BAGHADI Dalila

Etude de la contamination bactérienne environnementale au sein du service de réanimation néonatale de l'Hôpital de la Croix-Rousse de Lyon

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2019, 59 p.

En 2015, les décès liés aux complications de la prématurité représentaient plus d'un million des naissances par an dans le monde. Parmi elles, plus d'un tiers des prématurés de faible poids de naissance (inférieur à 1500g) ont présenté une infection néonatale tardive (infection se développant après 72 heures de vie). Plusieurs études ont rapporté que l'environnement des services de réanimation néonatale était impliqué dans la survenue de ces infections. Notre étude portait sur les trois types bactériens principalement incriminés : les staphylocoques à coagulase négative (dont le clone *S. capitis* NRCS-A), *S. aureus*, et les entérobactéries.

Des prélèvements environnementaux réalisés au service de réanimation néonatale de l'hôpital de la Croix-Rousse, ont révélé une colonisation par *S. aureus* essentiellement au niveau du matériel éloigné des alvéoles de soin suggérant une contamination via les soignants par manuportage. Les *S. capitis* NRCS-A isolés à proximité des couveuses, laissaient suggérer que les prématurés en seraient les réservoirs. Des couveuses choisies aléatoirement ont ensuite été prélevées avant et après leur décontamination et ont révélé une contamination à *S. capitis* NRCS-A dans les deux situations, mettant en évidence une insuffisance des techniques d'entretien utilisées. Une dernière série de prélèvement menée en salle de décontamination sur les objets et surfaces manipulés par le personnel en charge de l'entretien des couveuses n'a pas permis d'affirmer avec certitude que le personnel d'entretien des couveuses était responsable de leur recontamination précoce. Par ailleurs, la capacité de persistance du clone *S. capitis* NRCS-A *in vitro* sur surface inerte a été démontrée, expliquant en partie sa présence fréquente dans plusieurs services de réanimation néonatale à travers le monde.

Il y a donc, au sein du service, une nécessité urgente de réactualiser les règles d'hygiène, d'étendre les connaissances à propos des bactéries responsables d'infections néonatales tardives et d'optimiser les mesures de lutte contre les infections nosocomiales.

MOTS CLES

- réanimation néonatale ; *Staphylococcus aureus* ; *Staphylococcus capitis* NRCS-A ; contamination environnementale ; manuportage

JURY

M. LAURENT Frédéric, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Mme BUTIN Marine, Maitre de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier

Mme TRISTAN Anne, Maitre de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier

Mme KOLENDA Camille, Assistant Hospitalier Universitaire

DATE DE SOUTENANCE

27 janvier 2020

ADRESSE DE L'AUTEUR

60 Rue Bir Hakeim – 69330 Meyzieu

