

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2008

N°104

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR DE MEDECINE
Spécialité Pédiatrie

Par

Joséphine STROESSER

Née le 06 octobre 1979 à Strasbourg (67)

Présentée et soutenue publiquement le 3 mars 2008

DESCRIPTION DE LA FLORE BACTERIENNE DIGESTIVE

PER-OPERATOIRE NEONATALE :

RESULTATS INTERMEDIAIRES

Président : Monsieur le Professeur Jean-Christophe ROZE

Directeur de thèse : Madame le Docteur Gaëlle CAILLAUX

Table des matières

Table des matières	2
1 Introduction	3
2 Patients et méthode	4
2.1 Description de la population	4
2.1.1 Critères d'inclusion	4
2.1.2 Critères d'exclusion.....	4
2.2 Méthodes	4
2.2.1 Données concernant les enfants	4
2.2.2 Procédure médicale	5
2.2.3 Procédure bactériologique.....	5
2.2.3.1 Etude microbiologique	5
2.2.3.2 Etude en biologie moléculaire (figure 1).....	6
3 Résultats	8
3.1 Caractéristiques des patients	8
3.2 Résultats bactériologiques per-opératoires.....	10
3.2.1 Microbiologie (tableau 3).....	10
3.2.2 DHPLC.....	12
3.3 Bactériologie des selles (Tableau 4).....	12
3.4 Antibiogrammes	14
4 Discussion	15
5 Conclusion.....	18
Annexes	19
Abréviations	22
Bibliographie.....	23

1 Introduction

Les indications de chirurgie digestive en période néonatale sont rares ; elles comprennent les malformations digestives congénitales et les pathologies digestives acquises de type entérocolites ulcéro-nécrosantes (ECUN) ou de type mécanique (volvulus du grêles, hernie inguinale étranglée). Il n'existe actuellement aucune recommandation ni publication en matière d'antibioprophylaxie per-opératoire lors de ces interventions et la plupart du temps, des consensus établis chez l'adulte sont transposés chez le nouveau-né [1-3]. Alors que les connaissances sur la flore fécale néonatale se sont considérablement enrichies ces dernières années, la flore bactérienne retrouvée « in situ » lors de l'intervention chirurgicale demeure peu connue à ce jour [4-17]. Une connaissance de cette dernière nous paraît cependant indispensable pour adapter au mieux une antibioprophylaxie adéquate en fonction de la région du tube digestif opérée et de l'âge de l'enfant, la flore fécale ne représentant que la partie terminale du tube digestif. Les interventions avec ouverture du tube digestif en période néonatale constituent une occasion unique de décrire la flore bactérienne à chaque étage du tube digestif, tout en prenant en compte les conditions environnementales de l'enfant.

Notre travail rapporte les résultats intermédiaires d'une étude prospective ouverte en recherche biologique, budgétisée par un appel d'offre interne du CHU de Nantes. Son objectif principal est de décrire la flore bactérienne per-opératoire des nouveaux-nés opérés de leur tube digestif par cultures microbiologiques et en biologie moléculaire (technique de DHPLC : Denaturing High Performance Liquid Chromatography), selon leurs conditions environnementales.

Les objectifs secondaires étaient de décrire la flore fécale dans les suites d'une telle intervention et de vérifier l'intérêt de la méthode DHPLC pour l'étude de la flore bactériologique digestive chez le nouveau-né en la comparant la technique de référence qu'est la culture microbiologique.

2 Patients et méthode

Notre étude s'est déroulée au CHU de Nantes de février 2005 à octobre 2007 avec les services de chirurgie infantile, de réanimation néonatale et de néonatalogie ainsi que le laboratoire de bactériologie et l'équipe EA3826 de la faculté de médecine de Nantes.

2.1 Description de la population

2.1.1 Critères d'inclusion

Etaient concernés les enfants âgés de moins de 28 jours strictement et nécessitant une chirurgie avec ouverture du tube digestif. Ces nouveaux-nés ont été répartis en trois groupes de la façon suivante :

Groupe 1 : nouveaux-nés de moins de 48 heures

Groupe 2 : nouveaux-nés de plus de 48 heures n'ayant pas quitté l'hôpital depuis leur naissance (réanimation, néonatalogie, chirurgie infantile)

Groupe 3 : nouveaux-nés de plus de 48 heures restés dans leur milieu familial.

Le consentement signé des parents autorisant le prélèvement durant la chirurgie digestive ainsi que les prélèvements de selles ultérieurs devait être obtenu pour chaque enfant.

2.1.2 Critères d'exclusion

Les enfants étaient exclus de l'étude s'ils étaient âgés de plus de 28 jours, s'ils ne relevaient pas d'une intervention chirurgicale avec ouverture du tube digestif et en cas de refus parental.

2.2 Méthodes

2.2.1 Données concernant les enfants

Nous avons relevé l'âge de l'enfant lors de la chirurgie, son terme, son poids de naissance, son sexe, le mode d'accouchement, l'administration d'une antibiothérapie per-partum chez la mère ou pré-opératoire chez l'enfant, le type d'alimentation avant la chirurgie (lait maternel, lait industriel ou aucune), l'indication chirurgicale et l'étage opératoire.

2.2.2 Procédure médicale

Des kits de prélèvements bactériologiques étaient disponibles dans la salle de protocole du service de réanimation néonatale. Ils étaient joints au dossier d'anesthésie de l'enfant après inclusion de ce dernier par un médecin du service et obtention du consentement parental écrit. Les prélèvements de chaque nouveau-né a été identifié par les deux premières lettres de son nom et de son prénom

Les prélèvements per-opératoires étaient effectués par le chirurgien. Les prélèvements de microbiologie (liquide ou muqueuse digestive) aérobie et anaérobie étaient conservés à température ambiante et acheminés au laboratoire de bactériologie. Les prélèvements destinés à l'analyse en biologie moléculaire étaient congelés immédiatement puis acheminés au laboratoire de bactériologie et conservés à -80° .

Lorsque les enfants étaient hospitalisés de façon prolongée à la suite de l'intervention, des prélèvements hebdomadaires de selles étaient acheminés au laboratoire selon les mêmes procédures.

2.2.3 Procédure bactériologique

2.2.3.1 Etude microbiologique

Les germes recherchés ont été les suivants : Staphylococcus aureus, Staphylococcus coagulase négative, Entérocoques, Enterobactéries (E coli, Klebsielle, Serratia...) et anaérobies (Clostridia, Bacteroïdes, Bifidobacteria).

Un examen macroscopique suivi d'un examen direct a été réalisé sur les prélèvements après coloration de Gram, puis des milieux aérobies et anaérobies ont été ensemencés, après réalisation de plusieurs dilutions. Ils ont été incubés à l'étuve à 37°C en atmosphère aérobie et enrichie en CO_2 pour faciliter la culture des bactéries aéro-anaérobies facultatives.

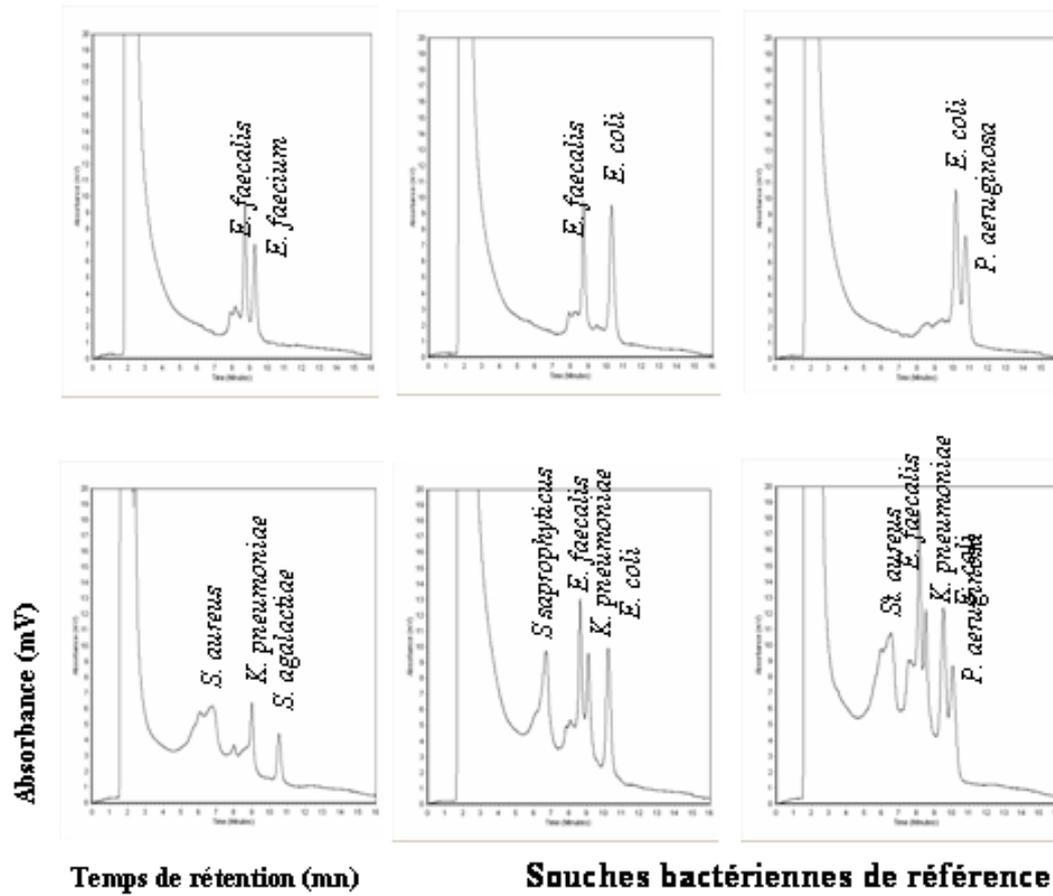
Les cultures aérobies ont été lues à 24 heures et 48 heures. Les cultures anaérobies ont été lues à 48 heures puis 5 jours puis 10 jours. Toutes les bactéries aérobies ont été identifiées

par le système VITEK 2 ; concernant les anaérobies, une galerie biochimique type API 20A était ensemencée. Enfin, des antibiogrammes ont été établis.

2.2.3.2 Etude en biologie moléculaire (figure 1)

Les techniques d'analyse en biologie moléculaire sont basées sur les propriétés dénaturantes de l'ADN et en particulier sur l'analyse de l'ADN ribosomal 16S. Les ADN ribosomaux comportent des régions hypervariables spécifiques d'une espèce. La DHPLC (Chromatographie liquide à haute pression en conditions dénaturantes) est une méthode qui donne un aperçu global de la méthylation d'une région. Après amplification, les produits de PCR sont dénaturés puis on laisse les brins se réappairier. La séparation de ces hybrides se fait ensuite dans une colonne de chromatographie en conditions dénaturantes. Les brins vont être relargués dans la colonne d'autant plus vite qu'ils sont moins stables, c'est-à-dire qu'ils sont peu méthylés (la liaison T-A possède deux ponts hydrogènes tandis que la liaison C-G en possède trois). A chaque libération devant le détecteur UV, on obtient un pic sur la courbe. Ces pics sont ensuite comparés à une base de donnée qui contient l'identification d'un grand nombre de génomes bactériens[18, 19]. Ainsi, le séquençage de l'ADNr permet d'aboutir à 1 diagnostic d'espèce. L'avantage de la DHPLC par rapport aux techniques de biologie moléculaire, est son caractère rapide et automatisable[19, 20].

Figure 1 : Denaturing High Pressure Liquid Chromatography (dPHLC)



3 Résultats

3.1 Caractéristiques des patients

48 nouveau-nés ont été inclus. L'âge gestationnel médian était de 36 SA (25-41), le PN médian était de 2560, 53% des enfants étaient nés par voie basse. 34% des enfants avaient reçu des ATB avant leur intervention chirurgicale

Le tableau 1 récapitule les caractéristiques principales des nouveaux-nés. Les données complètes sont détaillées dans l'annexe 1.

Caractéristique	Effectif (n=48)	%
Médiane AG (SA)	36 (25-41)	
Médiane poids (g)	2560 (610-4375)	
Médiane âge opératoire	2 (0-28)	
Sexe masculin	33	70
Groupe 1	25	53
Groupe 2	20	43
Groupe 3	2	4
Atb perpartum	16	34
Voie basse	25	53
Alimentation avant chir	23	49
- dont lait maternel	8	35
- dont lait artificiel	10	43
Atb avant la chir	30	34
Etage sus-mésocolique	10	21

Tableau 1 : Principales caractéristiques des nouveaux-nés opérés

Le tableau 2 résume les indications chirurgicales. Les données détaillées sont présentées dans l'annexe 2.

Indication chirurgicale	Effectif (n=48)	%
Malformation anorectale	9	19
Entérocolite ulcéro-nécrosante	8	19
Atrésie œsophage (types 3 et 1)	6	12
Hirschsprung	6	12
Atrésie/sténose duodénale	5	10
Péritonite (méconiale, infectieuse)	4	8
Perforation digestive isolée	3	6
Volvulus intestinal	3	6
Hernie diaphragmatique (appendicectomie)	2	4
Atrésie jéjunale	1	2
Ileus méconial (mucoviscidose)	1	2

Tableau 2 : Indications chirurgicales

3.2 Résultats bactériologiques per-opératoires

3.2.1 Microbiologie (tableau 3)

25 enfants ont été inclus dans le groupe 1. L'analyse des prélèvements per-opératoires a montré que parmi les nouveaux-nés de moins de 48 heures, 24% (6/25) avaient un prélèvement per-opératoire positif en microbiologie. Les prélèvements sus-mésocoliques étaient stériles dans 89% des cas. Les prélèvements sous-mésocoliques étaient positifs dans 31% des cas. Parmi les bactéries isolées, 45% étaient des Staphylocoques à coagulase négative, 33% des entérocoques et 22% étaient des entérobactéries. Parmi tous les enfants du groupe 1, 13/25 (52%) avaient reçu une antibiothérapie préopératoire (céfotaxime, gentamycine ± amoxicilline).

20 enfants ont été inclus dans le groupe 2. 57% des nouveaux-nés de plus de 48 heures et hospitalisés, avaient des prélèvements per-opératoires positifs. Un seul enfant de ce groupe a eu une intervention sus-mésocolique, ses prélèvements per-opératoires étaient stériles. A l'étage sous-mésocolique, les germes prédominants étaient les bacilles Gram négatif (BGN) dans 48.2% des cas (dont 32.5% d'Enterobacter et 37.5% d'Escherichia coli) et 37% de cocci Gram positif (dont 71.4% Staphylocoques à coagulase négative et 28.5% Entérocoques) et enfin 21% de bactéries anaérobies. 85,7% (18/21) des enfants de ce groupe avaient reçu des antibiotiques en périodes pré-opératoire.

Seuls deux enfants opérés à plus de 48 heures de vie étaient rentrés dans leur milieu familial avant l'intervention (groupe 3).

Nom	Groupe	Microbiologie	DHPLC
AN-PI	1	Staph épi	Staph epidermidis
AR-QU	2	0	Staph sp
AR-LE	2	0	Non disponible
AU-AN	1	Strepto mitis/sanguis/oralis	Non disponible
BA-ME	1	0	plat
BE-SA	1	E. faecalis	Non disponible
BE-SO	2	Staph warneri, E. coli	Staph sp, E. coli
BE-CL	3	E. cloacae, E. faecalis, E. faecium	Enterobacter sp, Enterobacter faecalis
BE-RA	2	0	E coli K12
BE-SU	2	Bifidobact. Spp	Non disponible
BL-KI	1	S. epidermidis, S. capitis	Staph epi, Staph sp
CE-HA	1	0	Non disponible
CH-QU	1	0	plat
CH-SA	1	0	Staph aureus
DE-LA	1	E. coli, Staph warneri	Enterobacter cloacae, E. coli
DE-MAE	1	0	pas d'identif ^o
DE-MAL	2	Citrobacter	Non disponible
DU-GA	1	0	Non disponible
GA-AL	1	0	Non disponible
GU-NA	1	0	Morganella morganii, Pseudomonas sp
GU-TI	2	0	plat
GU-MA	2	0	Staph aureus + 2 plat
HE-TH	2	P. aeruginosa	Pseudomonas sp
LA-MA	1	0	plat
LA-ME	1	0	plat
LA-TA	3	E cloacae, Staph aureus, Enterococcus sp	Staph aureus, Ruminococcus, Clostridium difficile
LE-LE	2	Staph epidermidis, Staph warneri	Staph sp
LE-ET	1	Staph warneri, Staph epidermidis	plat
LE-MA	1	0	Non disponible
LE-AN	1	0	E coli, Enterobacter cloacae
LH-TH	2	0	Staph epi (selles)
ND-MI	2	E. Coli, E. faecalis, Bacteroides	Non disponible
PA-MA	2	B. distasonis	Clostridium paraputrificum, E coli, Staph aureus, Halfnia alvei
PA-KY	1	0	Pseudomonas aeruginosa, Morganella
PA-DY	1	0	Staph sp, Staph aureus, Staph haemolyticus, Pseudomonas sp
PH-PI	2	0	Bifidobacterium sp
PH-PI	2	E. coli + lactobacillus	Bifidobacterium sp, Staph epi
PI-NO	1	0	plat
PO-KA	2	P. mirabilis + E. coli	plat
PO-EM	1	0	Non disponible
PO-CH	1	0	Staph epidermidis
PO-MA	2	0	Non disponible
RE-NO	1	0	Non disponible
RI-MA	2	0	Non disponible
TA-LO	1	0	Achromobacter xylosoxidans
TH-AL	2	0	Non disponible
TR-GE	2	Morganella morganii	Morganella morganii
VA-MO	2	S. hominis, BGN, E. faecalis	Clostridium difficile, Enterobacter cloacae

Tableau 3 : Bactéries isolées dans les prélèvements per-opérateurs en microbiologie classique et en DHPLC.

3.2.2 DHPLC

68.7% des prélèvements per-opératoires ont été analysée en DHPLC (33/48). Pour 42% d'entre eux (14/33), il y avait une concordance des résultats avec l'analyse microbiologique classique. Dans 39.3% des cas (13/33), la DHPLC a permis l'identification de bactéries supplémentaires, à savoir majoritairement des BGN et des Staphylocoques mais aussi des germes difficilement cultivables comme les Clostridia. Dans 6% des cas (2/33), la DHPLC était moins performante que la culture et dans 12% des cas (4/33), les résultats étaient discordants.

3.3 Bactériologie des selles (Tableau 4)

Les cultures microbiologiques retrouvent 61,5% de cocci Gram positif dont 68,5% de Staphylocoques à coagulase négative, 30,8% de bacilles à Gram négatif et 7,7% d'anaérobies (Clostridia).

La DHPLC retrouve elle aussi une majorité de cocci Gram positif (75%) mais avec 55,5% de *Staphylococcus aureus*, 16,6% de bacilles à Gram négatif et 8,3% d'anaérobies (*Bifidobacterium*).

La DHPLC confirme la microbiologie en mettant en évidence des selles majoritairement composés de staphylocoques.

Nom	Culture 1	DHPLC 1	Culture 2	DHPLC 2	Culture 3	DHPLC 3	Culture 4
AN-PI	S. hominis, S. epidermidis	S. epidermidis	K. pneumoniae, S. epidermidis, Enterococcus faecalis	plat			
CH- QU	3 colonies microbiennes	Klebsiella pneumoniae	S. haemolyticus	ND	K. oxytoca, S. hominis	plat	
DU- GA	S. epidermidis, S. aureus, S. haemolyticus	S.aureus	ND	ND			K.oxytoca, Clostridium perfringens
GU- MA	ND	ND	K. oxytoca, Clostridium sp	S. aureus	S. epidermidis	S. aureus	
LA- MA	S. haemolyticus, Gemella morbillorum, Streptococcus mitis	S. aureus, Streptocoque sp	Enterococcus faecalis, Enterobacter cloacae	plat			
PA- MA	S. haemolyticus, Klebsiella pneumoniae	S. aureus, S. haemolyticus					
TR-GE	Morganella morganii	S. epidermidis, Morganella morganii, Bifidobacterium longum					

Tableau 4 : Résultats des analyses de selles en microbiologie et en DHPLC.

3.4 Antibiogrammes

Les souches de Staphylocoques à coagulase négative présentait des profils d'antibiogrammes habituels :

En ce qui concerne les Staphylocoques epidermidis :

- ✓ 100% étaient résistants à l'oxacilline
- ✓ 87.5% étaient résistants à l'érythromycine
- ✓ 12.5% étaient résistants aux aminosides
- ✓ tous étaient sensibles aux quinolones

En ce qui concerne les Staphylocoques hominis :

- ✓ 50% étaient résistants à l'oxacilline
- ✓ 66.6% étaient résistants à l'érythromycine
- ✓ 50% étaient résistants aux aminosides
- ✓ 16.6% étaient résistants aux quinolones

En ce qui concerne les Staphylocoques haemolyticus, ils étaient tous résistants à l'oxacilline, à l'érythromycine et aux aminosides.

De façon plus globale, 86.9% des Staphylocoques à coagulase négative étaient résistants à l'oxacilline.

4 Discussion

Notre étude a montré que : les nouveaux-nés de moins de 48 heures avaient un prélèvement per-opératoire stérile dans la plupart des cas et ce, d'autant plus que l'étage était sus-mésocolique (89%). En revanche, les nouveaux-nés de plus de 48 heures, avaient souvent un prélèvement per-opératoire positif (57%), alors que 85.7% avaient reçu une antibiothérapie. Chez ces derniers, les bactéries les plus souvent retrouvés étaient des bacilles Gram négatif (42%), des cocci Gram positif (37%) et des bactéries anaérobies (21%). Une seule étude, à notre connaissance, a jusqu'à présent étudié la flore intestinale néonatale per-opératoire [21]. Dans cette étude, les prélèvements réalisés chez des nouveaux-nés de moins de 24 heures étaient tous stériles. En terme de chronologie de colonisation, nos résultats sont superposables : en effet, Peng retrouvait 27% des prélèvements positifs entre 24 et 48 heures et 66.7% de prélèvements positifs au-delà de 48 heures de vie.

Concernant les nouveau-nés de plus de 48 heures, comme dans notre étude, les germes les plus souvent retrouvés étaient des bacilles Gram négatif. Notre étude retrouvait cependant une proportion moins importante de bacilles Gram négatif que celle de Peng. Cela peut s'expliquer par des différences dans l'environnement et l'utilisation des antibiotiques. En effet, Alderberth et ses collaborateurs ont montré dans une étude publiée en 2006 que la colonisation colique des nourrissons évolue non seulement au cours du temps mais aussi plus globalement au cours des décennies, avec une diminution des bactéries Gram négatif au profit des bactéries à Gram positif [22].

Le but de cette étude est, à terme, de proposer des schémas d'antibioprophylaxie adaptés à la flore observée chez ces nouveaux-nés opérés du tube digestif. Les seules études disponibles jusqu'à présent chez l'enfant concernent l'appendicectomie et la sténose du pylore. Ainsi chez l'enfant bénéficiant d'une appendicectomie, l'antibioprophylaxie a fait la preuve de son efficacité en diminuant le taux de septicémie post-opératoire. De même, Nour et ses collaborateurs ont pu montrer chez de jeunes nourrissons opérés d'une sténose du pylore l'intérêt d'une antibioprophylaxie par céfuroxime [23]. Dans les autres cas, l'antibioprophylaxie actuellement utilisée est transposée des recommandations adultes, faute de données pédiatriques et encore moins néonatales [1, 3, 24]. En effet, des recommandations ont été publiées chez l'adulte concernant aussi bien la chirurgie gastro-duodénale (utilisation d'une céphalosporine de première génération, la céfazoline) que colo-rectale (utilisations d'une céphalosporine de deuxième génération la céfoxitine -Mefoxin®) [1]. Les résultats de cette étude, s'ils se confirment après l'inclusion des 90 nouveaux-nés prévus, nous amènent à

penser qu'il pourrait être licite de proposer une antibioprophylaxie à spectre réduit voire de ne pas en proposer du tout chez les nouveaux-nés âgés de moins de 48h heures, et ce d'autant plus que le site opératoire se situe au niveau supra-mésocolique.

Dans notre étude, les nouveaux-nés de plus de 48 heures hospitalisés (groupe 2) n'ont pas reçu d'antibioprophylaxie, dans la mesure où ils étaient déjà traités avant et pendant l'intervention chirurgicale par une antibiothérapie curative à large spectre associant en général céphalosporine de troisième génération, aminoside et glycopeptide. Une antibioprophylaxie du type de celle proposée chez l'adulte ne nous paraîtrait pas licite dans ce contexte de large couverture antibiotique et de présence potentielle de germes résistants à la méticilline (90% des staphylocoques coagulase négative) [25, 26]. Pourtant, la présence de bactéries dans les prélèvements per-opératoires de ces enfants et ce malgré une antibiothérapie à large spectre soulève la question de l'intensification de celle-ci. Concernant, les nouveau-nés de plus de 48 heures, restés dans leur milieu familial, les micro-organismes retrouvés étaient des cocci Gram positif et des bacilles Gram négatif, cependant le faible effectif de ce sous groupe (n=2) ne nous permet pas de conclure.

Notre étude a montré que, dans la plupart des cas, les micro-organismes isolés en culture sont les mêmes que ceux identifiés par la DHPLC. Celle-ci s'avère être une méthode plus sensible que la culture puisque dans notre étude, dans 40% des cas, la DHPLC a apporté des résultats supplémentaires. Cette technique est désormais validée chez l'adulte pour l'étude des populations microbiennes [19] puis plus particulièrement pour l'étude du microbiote digestif chez des patients adultes hospitalisés en onco-hématologie [20]. Cependant, cette technique n'a encore été qu'exceptionnellement utilisée chez l'enfant, et plus encore chez le nouveau-né et le prématuré. Or, en néonatalogie, cette technique nous semble utile et complémentaire de la microbiologie, car c'est une méthode d'analyse rapide et reproductible. D'autre part, elle semble être plus performante pour détecter des germes difficiles à cultiver (anaérobies) [10, 27-30]. Enfin, Shi et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence, grâce à la DHPLC, des gènes de résistance pour la streptomycine sur des souches de *Mycobacterium tuberculosis* [31]. Les limites de cette technique sont les erreurs de lecture sur des bactéries très proches sur le plan phylogénétique et l'absence de données quantitatives. Toutefois des dosages semi-quantitatifs devraient être possibles dans un futur proche, avec une quantification de l'ADN microbien [19].

La flore fécale des nouveaux-nés de notre étude se caractérisait par sa pauvreté et son caractère stéréotypé. Il y avait une nette prédominance de Staphylocoques à coagulase négative (44.8%) et très peu de bactéries anaérobies, contrairement à ce que l'on trouve chez les nouveaux-nés à terme sains [4, 11, 17, 32]. Gewolb a démontré que chez l'enfant prématuré, l'implantation de la flore anaérobie est retardée et ce d'autant plus que l'âge gestationnel est faible : dans cette étude portant sur 29 grands prématurés, un seul enfant était colonisé par des bifidobactéries à 30 jours de vie (de même dans notre étude) [33]. Les prématurés sont colonisés avec la flore de leur environnement : entérocoques et staphylocoques. Ces bactéries sont de plus souvent résistantes aux antibiotiques usuels du fait de la pression de sélection qui règne dans les services de néonatalogie et de réanimation [17]. D'autre part, nous avons isolé très peu de bifidobactéries, ce qui peut être expliqué d'une part par le faible âge gestationnel de beaucoup de nouveaux-nés [34] et d'autre part par les antibiothérapies à large spectre reçues [35]. Notre étude permet de montrer que la flore intestinale des nouveaux-nés opérés de leur tube digestif, qu'ils soient prématurés ou à terme, est différente d'une part de la flore fécale des nouveaux-nés indemne de toute pathologie et d'autre part de leur propre flore fécale. Il nous paraît donc important de ne pas se baser uniquement sur des études analysant la flore fécale pour décrire la flore intestinale et en particulier pour décider d'un protocole d'antibioprophylaxie per-opératoire.

5 Conclusion

Compte tenu de la présence de cocci Gram positif, de bacilles Gram négatif et d'anaérobies dans les prélèvements per-opératoire de ces nouveau-nés, le schéma d'antibioprophylaxie proposé pourrait être, pour les nouveau-nés de moins de 48 heures : étage sus-mésocolique : pas d'antibioprophylaxie, étage sous-mésocolique : céphalosporine de deuxième génération. Pour les nouveau-nés de plus de 48 heures, une dose de charge de vancomycine associé à une injection de ceftazidime et de métronidazole avant l'incision.

D'autre part, notre étude a montré que, la DHPLC est un outil complémentaire de la microbiologie et est utile en néonatalogie et enfin que le profil bactériologique des selles de ces nouveaux-nés ne peut être utilisé pour déterminer une antibioprophylaxie per-opératoire.

Ces résultats préliminaires devront être confirmés par l'analyse des 90 nouveau-nés, prévus dans l'étude.

Annexes

Nom	Sexe	Groupe	AG (SA)	Poids	Atb perpartum	Accouchement	Alim ^o avt chir	Atb avt chir
AN-PI	M	1	35	2000	Non	Césarienne	LA	Non
AR-QU	M	2	26	890	Oui	Césarienne	Non	Oui
AR-LE	F	2	29	1040	Non	Césarienne	Non	Oui
AU-AN	M	1	38	2420	Non	Césarienne	Non	Non
BA-ME	F	1	37	2820	Oui	Césarienne	Non	Oui
BE-SA	F	1	34	2550	Oui	Voie basse	Non	Oui
BE-SO	F	1	36	3270	Non	Voie basse	Non	Non
BE-CL	M	2	39	NC	Oui	Césarienne	Oui	Oui
BE-RA	M	2	40	4100	Non	Césarienne	Oui	Oui
BE-SU	M	2	NC	3970	NC	NC	NC	Oui
BL-KI	M	2	26	845	Oui	Voie basse	Non	Oui
CE-HA	F	1	38	2905	Non	Césarienne	Non	Non
CH-QU	M	1	36	2650	Non	Césarienne	Non	Oui
CH-SA	M	1	37	2575	Non	Césarienne	LA	Oui
DE-LA	F	1	39	3900	Non	Voie basse	LM	Non
DE-MAE	M	1	41	3185	Oui	Césarienne	Non	Oui
DE-MAL	M	2	39	4375	Non	Voie basse	LA	Non
DU-GA	M	1	35	1950	Oui	Césarienne	Non	Oui
GA-AL	M	1	NC	NC	Oui	Césarienne	LM	Non
GU-NA	M	1	39	3210	Oui	Voie basse	Non	Oui
GU-TI	F	2	27	880	Non	Césarienne	LM	Oui
GU-MA	M	2	31	1520	Non	Césarienne	LA	Oui
HE-TH	M	2	32	1170	Oui	Césarienne	Oui	Oui
LA-MA	M	1	42	3810	Non	Césarienne	Non	Oui
LA-ME	F	1	33	2100	Non	Voie basse	Non	Oui
LA-TA	M	2	41	3720	NC	NC	LA	NC
LE-LE	M	2	27	900	Oui	Voie basse	Non	Oui
LE-ET	M	1	36	2900	NC	Voie basse	NC	NC
LE-MA	M	1	40	NC	NC	Voie basse	LM	Non
LE-AN	M	1	36	3250	Non	Voie basse	Non	Non
LH-TH	M	2	38	3600	Oui	Voie basse	Non	Oui
ND-MI	M	2	39	3180	Non	Voie basse	LM	Oui
PA-MA	F	2	32	1585	Oui	Voie basse	LA	Oui
PA-KY	M	1	31	3250	Non	Voie basse	Non	Non
PA-DY	M	1	34	2400	Oui	Voie basse	Non	Oui
PH-PI	M	2	T	3900	Non	Voie basse	LA	Non
PH-PI	M	2	T	3900	Non	Voie basse	LA	Oui
PI-NO	M	1	33	1690	Non	Voie basse	Oui	Oui
PO-KA	F	2	T	3200	Non	Voie basse	LA	Non
PO-EM	F	1	40	2550	Non	Césarienne	LA	Non
PO-CH	F	1	34	2100	Non	Voie basse	Non	Non
PO-MA	F	2	25	770	Non	Césarienne	LM	Oui
RE-NO	M	1	37	2420	Non	Voie basse	Non	Non
RI-MA	M	2	25	610	Oui	Voie basse	LM	Oui
TA-LO	F	1	33	1830	NC	Voie basse	Non	Oui
TH-AL	M	2	30	1240	NC	Voie basse	LM	Oui
TR-GE	M	2	33	1470	Oui	Césarienne	Oui	Oui
VA-MO	M	2	40	3550	Non	Césarienne	LA	Non

Annexe 1 : Principales caractéristiques des nouveaux-nés inclus

Nom	Indic° chir	Etage opératoire	âge au prélév PO	Localisation
AN-PI	Malf° ano-rectale	Sous-mésocolique	2	rectum
AR-QU	ECUN	Sous-mésocolique	11	iléon
AR-LE	Atrésie œsophage 1	Supra-mésocolique	7	estomac
AU-AN	Atrésie œsophage 3	Supra-mésocolique	0	collection profonde
BA-ME	Imperforation anale	Sous-mésocolique	0	rectum
BE-SA	Péritonite méconiale	Sous-mésocolique	1	liquide périt
BE-SO	Atrésie jéjunale	Sous-mésocolique	1	jéjunum
BE-CL	Péritonite (HIG)	Sous-mésocolique	23	intestin grêle
BE-RA	Volvulus du grêle	Sous-mésocolique	15	iléon
BE-SU	Péritonite méconiale	Sous-mésocolique	4	liquide périt
BL-KI	Perforation colique	Supra-mésocolique	21	colon
CE-HA	Atrésie duodénale	Supra-mésocolique	1	duodénum
CH-QU	Atrésie duodénale	Supra-mésocolique	1	duodénum
CH-SA	Volvulus grêle	Sous-mésocolique	0	liquide périt
DE-LA	Malf° ano-rectale	Sous-mésocolique	1	rectum
DE-MAE	Atrésie œsophage 3	Supra-mésocolique	1	œsophage
DE-MAL	Hirschsprung	Sous-mésocolique	9	rectum
DU-GA	Atrésie œsophage 3	Supra-mésocolique	1	œsophage
GA-AL	Malf° ano-rectale	Sous-mésocolique	1	côlon
GU-NA	Imperforation anale	Sous-mésocolique	0	côlon
GU-TI	ECUN	Sous-mésocolique	27	iléon
GU-MA	ECUN	Sous-mésocolique	19	jéjunum + iléon + côlon
HE-TH	Perforation iléale	Sous-mésocolique	5	iléon
LA-MA	Atrésie œsophage 3	Supra-mésocolique	1	œsophage
LA-ME	Hernie diaphragmatique	Sous-mésocolique	2	appendice
LA-TA	Hirschsprung	Sous-mésocolique	28	rectum
LE-LE	ECUN	Sous-mésocolique	27	intestin grêle
LE-ET	Imperforation anale	Sous-mésocolique	1	rectum
LE-MA	Malf° ano-rectale	Sous-mésocolique	2	côlon
LE-AN	Imperforation anale	Sous-mésocolique	1	rectum
LH-TH	Hernie diaphragmatique	Sous-mésocolique	5	appendice
ND-MI	Hirschsprung total	Sous-mésocolique	4	liquide périt
PA-MA	Perforation colique	Sous-mésocolique	13	côlon
PA-KY	Imperforation anale	Sous-mésocolique	1	rectum
PA-DY	Volvulus sur entérocolite	Sous-mésocolique	2	iléon
PH-PI	Hirschsprung	Sous-mésocolique	9	côlon
PH-PI	Péritonite (perfor°)	Sous-mésocolique	14	rectum + côlon
PI-NO	Atrésie duodénale	Sous-mésocolique	0	duodénum
PO-KA	Hirschsprung	Sous-mésocolique	14	côlon + rectum
PO-EM	Ileus méconial	Sous-mésocolique	2	selles (bouchon)
PO-CH	Atrésie duodénale	Supra-mésocolique	0	duodénum
PO-MA	ECUN	Sous-mésocolique	25	iléon
RE-NO	Atrésie œsophage 3	Supra-mésocolique	0	œsophage
RI-MA	ECUN	Sous-mésocolique	28	iléon
TA-LO	Sténose duodénale	Supra-mésocolique	0	duodénum
TH-AL	ECUN	Sous-mésocolique	5	iléon
TR-GE	Volvulus du grêle	Sous-mésocolique	21	appendice
VA-MO	Hirschsprung	Sous-mésocolique	10	côlon + rectum

Annexe 2 : Caractéristiques chirurgicales

Abréviations

AG : âge gestationnel

Alim° : alimentation

Atb : antibiotiques

BGN : Bacille à Gram négatif

Chir : chirurgie

Coll : collection

DHPLC : Denaturing High Performance Liquid Chromatography

E. cloacae : Enterobacter cloacae

E. coli : Escherichia coli

E. faecalis : Enterococcus faecalis

E. faecium : Enterococcus faecium

ECUN : Entérocolite ulcéro-nécrosante

K. oxytoca : Klebsiella oxytoca

K. pneumoniae : Klebsiella pneumoniae

Malf° : malformation

NC : non connu

P. mirabilis : Proteus mirabilis

Périt : péritonéal

S. épi : Staphylococcus epidermidis

S. ou Staph : Staphylococcus

SA : semaines d'aménorrhée

Strepto : Streptococcus

Bibliographie

1. Woods, R.K. and E.P. Dellinger, *Current guidelines for antibiotic prophylaxis of surgical wounds*. Am Fam Physician, 1998. **57**(11): p. 2731-40.
2. Lambert, W.G. and B.M. Mullinger, *Single-dose cefuroxime in the prophylaxis of abdominal wound sepsis*. Curr Med Res Opin, 1980. **6**(6): p. 404-6.
3. Pickering, L.K., *Committee on infectious diseases american academy of pediatrics. Antimicrobial prophylaxis in pediatric surgical patient*. In Red Book. 2006 824-838. 824-838.
4. Butel, M.J., *La flore du prématuré in L'intestin du prématuré; 16ème séminaire Guigoz; Groupe d'étude en néonatalogie*. 111-130.
5. Balmer, S.E. and B.A. Wharton, *Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula*. Arch Dis Child, 1989. **64**(12): p. 1672-7.
6. Benno, Y., K. Sawada, and T. Mitsuoka, *The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants*. Microbiol Immunol, 1984. **28**(9): p. 975-86.
7. Fanaro, S., et al., *Intestinal microflora in early infancy: composition and development*. Acta Paediatr Suppl, 2003. **91**(441): p. 48-55.
8. Fryklund, B., et al., *Importance of the environment and the faecal flora of infants, nursing staff and parents as sources of gram-negative bacteria colonizing newborns in three neonatal wards*. Infection, 1992. **20**(5): p. 253-7.
9. Langhendries, J.P., et al., *[Intestinal flora in the neonate: impact on morbidity and therapeutic perspectives]*. Arch Pediatr, 1998. **5**(6): p. 644-53.
10. Lundequist, B., C.E. Nord, and J. Winberg, *The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks*. Acta Paediatr Scand, 1985. **74**(1): p. 45-51.
11. Mackie, R.I., A. Sghir, and H.R. Gaskins, *Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract*. Am J Clin Nutr, 1999. **69**(5): p. 1035S-1045S.
12. Rotimi, V.O., S.A. Olowe, and I. Ahmed, *The development of bacterial flora of premature neonates*. J Hyg (Lond), 1985. **94**(3): p. 309-18.

13. Rotimi, V.O. and B.I. Duerden, *The development of the bacterial flora in normal neonates*. J Med Microbiol, 1981. **14**(1): p. 51-62.
14. Stark, P.L. and A. Lee, *The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life*. J Med Microbiol, 1982. **15**(2): p. 189-203.
15. Stark, P.L., A. Lee, and B.D. Parsonage, *Colonization of the large bowel by Clostridium difficile in healthy infants: quantitative study*. Infect Immun, 1982. **35**(3): p. 895-9.
16. Gronlund, M.M., et al., *Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1999. **28**(1): p. 19-25.
17. Penders, J., et al., *Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy*. Pediatrics, 2006. **118**(2): p. 511-21.
18. <http://cvirtuel.cochin.univ-paris5.fr/empreinte/Chapitre 6/Chap06 05.htm>.
19. Barlaan, E.A., et al., *Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography*. J Microbiol Methods, 2005. **61**(3): p. 399-412.
20. Goldenberg, O., et al., *Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography*. J Microbiol Methods, 2007. **68**(1): p. 94-105.
21. Peng, H. and H. Chen, *Colonization of intestinal bacteria in ill neonates*. Pediatr Surg Int, 1998. **13**(8): p. 572-5.
22. Adlerberth, I., et al., *Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle?* Pediatr Res, 2006. **59**(1): p. 96-101.
23. Nour, S., et al., *Antibiotic prophylaxis for infantile pyloromyotomy*. J R Coll Surg Edinb, 1996. **41**(3): p. 178-80.
24. Gorecki, W., et al., *A prospective comparison of antibiotic usage in pediatric surgical patients: the safety, advantage, and effectiveness of the Surgical Infection Society guidelines versus a common practice*. J Pediatr Surg, 2002. **37**(10): p. 1430-4.
25. Udo, E.E., L.E. Jacob, and T.D. Chugh, *Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from a Kuwait hospital*. Microb Drug Resist, 1995. **1**(4): p. 315-20.
26. Koksai, F., H. Yasar, and M. Samasti, *Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey*. Microbiol Res, 2007.

27. Park, H.K., et al., *Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut*. J Microbiol, 2005. **43**(4): p. 345-53.
28. Favier, C.F., et al., *Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(1): p. 219-26.
29. de la Cochetiere, M.F., et al., *Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of Clostridium*. Pediatr Res, 2004. **56**(3): p. 366-70.
30. Godon, J.J., et al., *Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(7): p. 2802-13.
31. Shi, R., et al., *Detection of streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing*. Microbes Infect, 2007. **9**(14-15): p. 1538-44.
32. Long, S.S. and R.M. Swenson, *Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants*. J Pediatr, 1977. **91**(2): p. 298-301.
33. Gewolb, I.H., et al., *Stool microflora in extremely low birthweight infants*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1999. **80**(3): p. F167-73.
34. Butel, M.J., et al., *Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2007. **44**(5): p. 577-82.
35. Westerbeek, E.A., et al., *The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: a review of the literature*. Clin Nutr, 2006. **25**(3): p. 361-8.

NOM : STROESSER

PRENOM : Joséphine

Titre de Thèse :

Description de la flore bactérienne digestive per-opératoire néonatale : résultats intermédiaires

RESUME

La colonisation microbienne du tube digestif en période néonatale peut être étudiée à l'occasion d'interventions chirurgicales digestives. Ainsi, notre étude montre que les prélèvements réalisés avant 48 heures de vie sont dans leur grande majorité stériles alors qu'après 48 heures, ils sont positifs dans plus de la moitié des cas et composés principalement de Staphylocoques à coagulase négative, d'entérocoques et des bacilles Gram négatif. Ces résultats microbiologiques ont été confirmés par l'analyse en DHPLC. De plus, nous montrons que la flore fécale de chaque nouveau-né est différente de sa flore per-opératoire et ne peut donc être utilisée pour déterminer une antibioprofylaxie en chirurgie digestive. Enfin, notre travail propose des schémas d'antibioprofylaxie per-opératoire qui devront être confirmés à la fin de l'étude (90 nouveau-nés).

MOTS-CLEFS

Colonisation bactérienne - nouveau-né - prématuré - chirurgie digestive - per-opératoire - DHPLC