



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.

**COMPARAISON ENTRE LE NOMBRE ET LA NATURE
DES *CLOSTRIDIUM* FÉCAUX ET D'AUTRES FACTEURS DE RISQUE
IMPLIQUÉS DANS LA PATHOLOGIE INTESTINALE
DES NOUVEAU-NÉS**

par **O. Fontaine (1), R. Ducluzeau (1), P. Raibaud (1),
C. Chabanet (1), M.R. Popoff (2), J. Badoual (3),
J.C. Gabilan (4) et A. Andremont (5)**

(1) *Laboratoire d'Ecologie Microbienne et Laboratoire de Biométrie,
INRA-CNRS 78350 Jouy-en-Josas,*

(2) *Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15,
(3) Service de Pédiatrie de l'Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, 75674 Paris Cedex 14,*

(4) *Service de Pédiatrie de l'Hôpital Antoine-Béclère, 92140 Clamart, et*

(5) *Service de Microbiologie médicale, Institut Gustave-Roussy,
Les Hautes Bruyères, 94805 Villejuif (France)*

SUMMARY

COMPARISON OF THE NUMBER AND NATURE OF FAECAL CLOSTRIDIA
WITH OTHER RISK FACTORS INVOLVED IN THE INTESTINAL PATHOLOGY OF
HUMAN NEWBORNS

One-hundred and fifteen infants aged 1 to 31 days from two intensive-care units were grouped into 6 classes according to clinical criteria (enterocolitis with or without anatomopathological examination and pneumatosis intestinalis, «haemorrhagic colitis», acute diarrhoea or absence of intestinal disorders). The total number of viable bacteria, the number of *Clostridium* and, in some cases, the presence of rota- and/or coronavirus were determined in their stools. The incidence of *Clostridium* in the stools of infants with enterocolitis (with or without pneumatosis intestinalis) or haemorrhagic colitis was not significantly different from that of infants without intestinal disorders, whereas stools of infants with acute diarrhoea less often contained *Clostridium* than those of other infants.

C. butyricum, *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. tertium*, and *C. sordellii* were identified. Correspondence analysis comparing the variable, «clinical pro-

file», with 23 other variables, suggested that the variables of gemellity, a birth-weight below 1900 g, a gestational age of less than 35 weeks, respiratory distress, umbilical catheterization and a *Clostridium* count above $10^7/g$ at the onset of clinical signs, i.e. between 8 to 12 days of age, were linked to the clinical profile of necrotizing enterocolitis with pneumatosis intestinalis. Conversely, the absence of gemellity, a high birthweight and gestational age, the absence of respiratory distress or umbilical catheterization, the onset of diarrhoea within 8 days, and the presence of rota- and/or coronavirus in the stools were linked with a clinical profile of acute diarrhoea.

KEY-WORDS: Diarrhoea, *Clostridium*, Newborn; Necrotizing enterocolitis, Haemorrhagic colitis, Correspondence analysis.

INTRODUCTION

L'entérocolite ulcéronécrosante (ECUN) du nouveau-né est l'urgence chirurgicale la plus fréquente et la plus grave dans les services de pédiatrie néonatale [11]. Cependant, d'autres troubles digestifs, de moindre gravité, peuvent aussi survenir : troubles du transit à type de subocclusion, rectorragies, diarrhées aiguës. Peu d'études ont porté sur la comparaison des populations de nouveau-nés atteints de ces diverses maladies. La plupart ont été consacrées à l'étiologie de l'ECUN : rôle des bactéries intestinales, entérobactéries et *Clostridium* principalement [1, 22]; rôle des virus : rotavirus [19], coronavirus [3]; rôle des facteurs non microbiens tel que le retentissement sur l'hémodynamique mésentérique, de la pathologie de la grossesse, de l'accouchement et de la période postnatale immédiate (entéropathie ischémique) [7, 25]; rôle de l'alimentation des nouveau-nés [6]; rôle de facteurs immunologiques [8]. Le but du présent travail a été de recueillir des données microbiologiques (nombre et nature des *Clostridium* fécaux, présence de virus) et des données cliniques chez des nouveau-nés souffrant, ou non, de troubles digestifs, afin de tenter de définir plus précisément les facteurs pouvant éventuellement constituer un critère de risque.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des échantillons analysés.

Le tableau I indique la répartition des nouveau-nés dont les selles ont été analysées, en fonction des unités d'hospitalisation d'origine et du diagnostic clinique formulé au moment du prélèvement de selles. La classe M01 souffrait d'ECUN, confirmée par examen anatomopathologique. La classe M02 présentait les signes caractéristiques d'ECUN, notamment la pneumatose radiologique (sans étude anatomopathologique). La classe M03 présentait une suspicion d'ECUN, avec notamment, à l'examen radiologique, une distension fixe d'anses intestinales pendant au moins 12 h,

TABLEAU I. — Répartition des nouveau-nés étudiés en six classes, en fonction du diagnostic clinique.

Provenance	M01	M02	M03	M04	M05	M06	Total
Hôpital Saint-Vincent de Paul	0	7	6	29	15	5	62
Hôpital Antoine Béclère	8	3	2	9	9	22	53
Total	8 (7)	10 (6)	8 (4)	38 (21)	24 (19)	27 (20)	115 (77)

M01 = ECUN avec examen anatomopathologique.

M02 = entérocolite avec pneumatose, sans examen anatomopathologique.

M03 = entérocolite sans pneumatose mais avec distension fixe (12 h).

M04 = «colite hémorragique».

M05 = diarrhée aiguë.

M06 = pas de troubles gastrointestinaux.

Les chiffres représentent le nombre d'enfants par classe (entre parenthèses : nombre de nouveau-nés retenus pour l'analyse des correspondances).

mais sans pneumatose. La classe M04 souffrait de troubles digestifs groupés sous le terme de «colites hémorragiques» (rectorragies sans diarrhée ou subocclusion et sans anomalie radiologique abdominale décelable). La classe M05 présentait une diarrhée aiguë. La classe M06 était constituée de nouveau-nés hospitalisés dans les mêmes unités pour des affections diverses à l'exclusion des troubles digestifs. Cent quinze nouveau-nés ont été étudiés, dont 20 (4 dans la classe M01, 2 dans la classe M02, 4 dans la classe M03, 4 dans la classe M04, 4 dans la classe M05 et 2 dans la classe M06) avaient été traités par antibiotiques le jour précédent celui du prélèvement de selles, le plus souvent avec une association de pénicilline semi-synthétique (ampicilline) et d'aminoside (gentamicine). Un seul (classe M05) avait été nourri au sein. La plupart avaient reçu du lait : lait maternel tiré, lait de femme frais ou lyophilisé, lait maternisé. D'autres avaient reçu des substituts de lait ou des régimes synthétiques par voie orale. Treize enfants avaient reçu une alimentation parentérale (1 dans la classe M01, 4 dans la classe M02, 2 dans la classe M03, 3 dans la classe M04, 3 dans la classe M05). L'âge des nouveau-nés lors de l'apparition des premiers signes cliniques, ou lors de l'examen bactériologique de selles pour la classe M06, est indiqué dans le tableau II. Aucune épidémie n'a été constatée durant la période d'étude.

TABLEAU II. — Age des nouveau-nés lors de l'apparition des premiers signes cliniques.

Age (jours)	M01	M02	M03	M04	M05	M06
1 - 5	1	5	0	6	11	3
6 - 9	1	0	2	8	6	6
10 - 12	4	1	3	9	2	4
13 - 19	1	1	1	10	2	7
20 - 31	1	3	2	5	3	7

Les chiffres des colonnes M01 à M06 indiquent le nombre de nouveau-nés ; en M06 : nouveau-nés témoins (sans troubles digestifs).

Techniques microbiologiques.

Après leur émission, les selles ont été conservées à 4°C pendant quelques heures, au plus 24 h, dans la couche du nouveau-né. Une gamme de dilutions décimales a été préparée, et 1 ml des dilutions adéquates a été ensemencé en anaérobiose, en tubes de 8 × 400 mm [17] dans les deux milieux non sélectifs suivants : milieu B' [20] et milieu D [17]. Ces milieux ont été incubés à 37°C pendant 7 jours, et les colonies ont été dénombrées le 2^e et le 7^e jour. Un examen au microscope optique (Zeiss) a été effectué, sur la dilution à 1/100 des selles, au contraste de phase avec un objectif de 100 à immersion. La présence de spores incluses dans les bactilles a été notée. Les colonies présumées de *Clostridium* (colonies lenticulaires se développant en 48 h dans le milieu B' avec présence de gaz dans le tube et colonies irrégulières ou lenticulo-irrégulières de taille variable se développant après 48 h dans les milieux B' et D) ont été soit observées au microscope pour la confirmation du diagnostic, soit ensemencées après chauffage à 70°C pendant 10 min en ampoule scellée dans le milieu B' contenant 0,03 % de taurocholate de sodium (Calbiochem) comme facteur de germination et 0,5 % de gélose, au lieu de 1,5 %. Les cultures ont été ensuite ensemencées par dilution dans le milieu D, et un clone isolé a été repiqué pour identification. Au total, 122 souches clonées ont été identifiées selon les techniques décrites par Sebald et Brefort [21]. L'antibiotype de 93 souches a été déterminé par la méthode des disques avec 12 antibiotiques : pénicilline, ampicilline, carbénicilline, tétracycline, érythromycine, rifampicine, clindamycine, kanamycine, métronidazole, acide nalidixique, céfoxidine et chloramphénicol. Le nombre total de bactéries cultivables retenu a été celui qui correspondait au nombre le plus élevé de colonies dans l'un ou l'autre des deux milieux B' et D. Les rotavirus ont été recherchés dans les selles de 87 nouveau-nés par la méthode ELISA [4]. Un examen au microscope électronique a été pratiqué sur 59 selles, à l'hôpital St-Vincent-de-Paul, pour la détection de la présence éventuelle de rotavirus et de coronavirus.

Techniques de recherche de substances toxiques.

Le test épicutané [5] utilisant la peau de lapin albinos « New-Zeland » a été utilisé pour la recherche d'un facteur de perméabilité dans la dilution à 1/100 des selles congelées, et les cultures de cellules VERO pour la recherche d'une cytotoxine dans les cultures de *C. difficile*. Les toxines létales éventuellement présentes dans les filtrats de culture de *Clostridium perfringens*, *C. sordellii* et *C. difficile* ont été recherchées par injection intrapéritonéale de 0,5 ml d'un surnageant de culture de 18 h en bouillon TYG (IPP), à des souris mâles albinos de 18-20 g. La présence éventuelle d'une substance toxique dans les parois de *C. butyricum* a été recherchée selon la technique de Popoff et Sebald [16].

Analyses statistiques.

Le test du chi² a été utilisé lorsqu'il s'agissait de savoir si l'effectif des nouveau-nés dans les différentes classes était lié ou non à un critère donné. Pour les valeurs numériques continues : Apgar, âge gestationnel, poids à la naissance, la moyenne et l'intervalle de confiance par classe de diagnostic ont été calculés au seuil de 5 %. Une analyse des correspondances selon la méthode préconisée par Jacob et coll. [10] a été effectuée à partir du tableau de contingence croisant les 6 modalités de la variable M (M01 à M06) correspondant au diagnostic clinique et 23 autres variables, dont les modalités varient de 2 à 7 (fig. 1). Ce tableau de contingence a été établi à partir de données recueillies chez 77 nouveau-nés (tableau I) pour lesquels toutes les variables avaient été définies.

RÉSULTATS

Nombre de bactéries cultivables et de *Clostridium*, et diagnostic clinique.

Le tableau III montre qu'il n'y a pas de différence significative quant au nombre total de bactéries cultivables et au nombre de *Clostridium* (quel que soit le niveau de population considéré) pour les effectifs de nouveau-nés ayant eu une stase intestinale (M01, M02, M03) et pour ceux de nouveau-nés sans trouble digestif (M06). En revanche, chez les nouveau-nés atteints de diarrhée aiguë (M05), on a observé un nombre de bactéries cultivables $> 10^{10}/\text{g}$ de selles, significativement moins souvent que chez les enfants de l'ensemble des classes M01, M02 et M03, et la présence de *Clostridium* significativement moins souvent que chez tous les autres nouveau-nés (tableau III). Si l'on considère les effectifs de nouveau-nés hébergeant un nombre élevé de *Clostridium*, ils sont significativement plus faibles dans la classe M05 que dans l'ensemble des classes M01, M02 et M03 et plus élevés dans cet ensemble que dans la classe M04 (colites hémorragiques) (tableau III).

TABLEAU III. — Répartition des effectifs de nouveau-nés en fonction du nombre total de bactéries et du nombre de *Clostridium* par g de selles, et du diagnostic clinique.

Nombre	M01 + M02 + M03	M04	M05	M06
Total	$< 10^{10}$ $\geq 10^{10}$	10 (b) 16	22 16	19 (b) 5 17 10
<i>Clostridium</i>	$< 10^2$ $\geq 10^2$	4 (a) 22	7 (b) 31	17 (a, b, c) 7 7 (c) 20
<i>Clostridium</i>	$< 10^7$ $\geq 10^7$	9 (a, b) 17	23 (b) 15	18 (a) 6 14 13

Il y a une différence significative dans la répartition des effectifs entre les classes lorsque la même lettre figure en exposant. La lettre (a) indique une différence au seuil de 1%, les lettres (b) et (c), au seuil de 5%.

Le tableau IV indique qu'un traitement par les antibiotiques effectué juste avant le prélèvement de selles ne peut pas être considéré, dans ces essais, comme un facteur susceptible de masquer d'une façon significative la présence de *Clostridium* dans les selles.

Dans 82 % des selles, nous avons observé une concordance entre le nombre de *Clostridium* dénombrés et la présence ou l'absence de spores dans des bacilles à l'examen direct de la dilution à 1/100. Dans 8 % des selles, les

TABLEAU IV. — Effet d'une antibiothérapie prescrite juste avant le prélèvement de selles sur le nombre de *Clostridium*/g de selles.

Nb de <i>Clostridium</i> /g de selles	Antibiothérapie	
	+	-
< 10^2	9	26
$\geq 10^2$	11	69

Les chiffres des colonnes 2 et 3 représentent l'effectif.

spores n'ont pas été détectées à l'examen direct, alors que le nombre de *Clostridium* était $> 10^7/g$; dans 10 % des cas, des spores terminales, subterminales ou centrales étaient visibles alors que le nombre de *Clostridium* cultivés était $< 10^7/g$ (3 fois dans la classe M06, 2 fois dans la classe M05, 4 fois dans la classe M04 et 2 fois dans la classe M03).

Nature des *Clostridium* et diagnostic clinique.

Le tableau V indique la fréquence d'isolement des différents *Clostridium* dans les selles de nouveau-nés des différentes classes. Pour *C. butyricum*, l'espèce la plus fréquemment identifiée, il n'y a pas de différence significative entre la fréquence d'isolement chez les nouveau-nés de l'ensemble des classes M01, M02 et M03, chez ceux de la classe M04 et chez ceux de la classe M06. Neuf selles seulement, sur les 67 où l'on a identifié les différentes souches clonées, contenaient 2 espèces ou plus de *Clostridium* différentes : *C. butyricum* et *C. perfringens* dans 2 selles (M01 et M05), *C. difficile*, *C. perfringens* et *C. sordellii* dans 2 selles (M05 et M06), *C. butyricum*, *C. tertium*, *C. sordelli* et *C. difficile* dans 2 selles (M03) et les 5 espèces identifiées dans 3 selles (M04).

TABLEAU V. — Répartition des effectifs de nouveau-nés où l'on a dénombré plus de 10^2 *Clostridium*/g de selles, en fonction des espèces identifiées et du diagnostic clinique.

	M01	M02	M03	M04	M05	M06
<i>C. butyricum</i>	2/7	2/6	4/7	14/26	2/6	6/15
<i>C. difficile</i>	1/7	3/6	3/7	8/26	2/6	1/15
<i>C. perfringens</i>	4/7	1/6	0/7	2/26	2/6	5/15
<i>C. tertium</i>	0/7	0/6	1/7	2/26	1/6	2/15
<i>C. sordellii</i>	1/7	0/6	1/7	3/26	0/6	2/15

Le pourcentage de souches sensibles aux antibiotiques étudiés varie selon les espèces (tableau VI). En outre, le nombre d'antibiotypes déterminé est considérable : 14 pour les 43 souches de *C. butyricum*, 8 pour les 12 souches de *C. tertium*, 7 pour les 31 souches de *C. difficile*, et 3 pour les 5 souches de *C. sordelli*. Deux souches de *C. perfringens* ont été aussi testées : elles étaient sensibles à tous les antibiotiques sauf à la kanamycine et au métronidazole pour l'une, et à la kanamycine pour l'autre.

TABLEAU VI. — Sensibilité aux antibiotiques des 91 souches de *Clostridium* testées (% des souches sensibles).

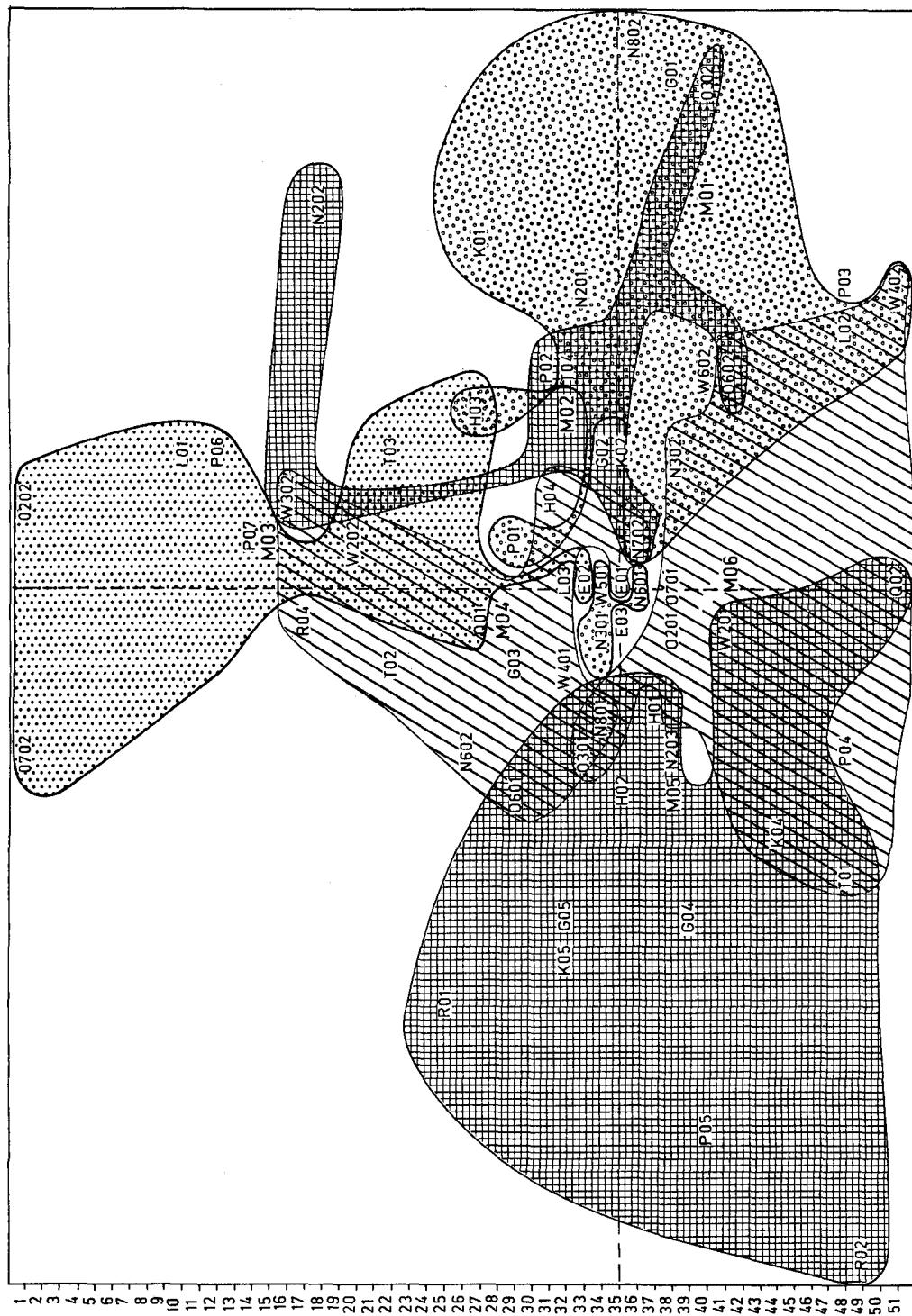
	P	AM	CB	FOX	K	E	CM	C	TE	RA	NA	MTR
<i>C. butyricum</i> n = 43	25	25	25	91	14	98	95	100	100	93	89	93
<i>C. tertium</i> n = 12	100	83	100	100	0	83	100	92	100	75	58	58
<i>C. difficile</i> n = 31	100	100	100	55	0	97	87	100	100	93	0	93
<i>C. sordelli</i> n = 5	100	100	100	80	0	80	80	100	100	NT	0	80
Total n = 91	65	63	65	80	6	94	92	99	100	91	50	88

P = pénicilline; AM = ampicilline; CB = carbénicilline; FOX = céfoxitine; K = kanamycine; E = érythromycine; CM = clindamycine; C = chloramphénicol; TE = tétracycline; RA = rifampicine; NA = acide nalidixique; MTR = métronidazole.

NT = non testé.

Détection de substances toxiques ou de souches de *Clostridium* toxinogènes et diagnostic clinique.

Dans aucune des 107 selles testées, on n'a décelé de facteur de perméabilité. Une souche de *C. difficile* sur les 13 testées a été cytotoxique en culture ; elle provenait d'un nouveau-né de la classe M03, alors que les souches négatives provenaient de nouveau-nés des classes M01 (1), M02 (3), M03 (3) et M04 (5). Deux extraits phénoliques de *C. butyricum* sur les 9 testés ont été cytotoxiques ; les 2 souches positives provenaient de 2 nouveau-nés des classes M03 et M04, et les 7 négatives, de nouveau-nés des classes M03 (2), M04 (3), M05 (1) et M06 (1). Les filtrats de bouillon de culture de 11 souches de *Clostridium* sur les 14 étudiées (3 *C. perfringens*, 9 *C. sordelli* et 2 *C. difficile*) ont été létaux pour la souris ; les souches positives provenaient de nouveau-nés des classes M01 (2), M03 (1), M04 (3) et M06 (1), et les 3 négatives (1 *C. sordelli* et 2 *C. difficile* non cytotoxiques), de nouveau-nés des classes M03 (1), M04 (1) et M06 (1).



Facteurs liés au diagnostic clinique d'après l'analyse des correspondances.

Les résultats que l'on peut tirer de l'analyse des correspondances, qu'il illustre la figure 1, sont les suivants.

Les principaux facteurs de risque liés au diagnostic d'ECUN (classe M01) sont : une naissance gémellaire (jumeaux de même sexe), un âge gestationnel

FIG. 1. — *Représentation des variables projetées sur l'axe 1 (axe horizontal) et l'axe 2 (vertical) et délimitation de 6 aires entourant chacune des 6 modalités de la variable M (M01 à M06) et de l'aire englobant les variables indépendantes, en fonction du tableau de contingence établi à partir des données recueillies chez 77 nouveau-nés.*

Pour délimiter les 7 aires, on a tenu compte de la position des variables sur l'axe 3, ce qui explique que certaines variables puissent paraître éloignées de la variable M bien qu'incluses dans son aire. Le système des 3 axes permet de prendre en compte 78 % de l'information. Le 1^{er} axe s'exprime par l'équation $F1 = 623 M01 + 344 M02 + 158 M03 - 13 M04 - 356 M05 - 1 M06$; il fait apparaître une opposition entre M01 et M05. Le 2^e s'exprime par l'équation $F2 = 173 M01 + 61 M02 - 661 M03 - 196 M04 + 76 M05 + 187 M06$; il fait apparaître une opposition entre M03 et M04 d'un côté et M06 de l'autre. Le 3^e axe s'exprime par l'équation $F3 = 340 M01 - 450 M02 + 319 M03 - 127 M04 + 116 M05 - 25 M06$; il fait apparaître une opposition entre M01 et M02 essentiellement, mais aussi entre M01 et M03 d'un côté et M02 et M04 de l'autre.

La définition des variables autres que M et de leurs modalités est la suivante :

- E = origine géographique du nouveau-né; E01 = caucasien; E02 = issu du bassin méditerranéen; E03 = africain;
- G = âge gestationnel à la naissance (en semaines); G01 = < 31; G02 = 31-34; G03 = 35; G04 = 36-38; G05 = 39-42;
- H = âge au début de la maladie (ou jour du prélèvement pour les enfants sans troubles digestifs); H01 = < 4 j; H02 = 4-7 j; H03 = 8-11 j; H04 = 12-17 j; H05 = 18-31 j;
- K = poids à la naissance en grammes; K01 = < 1560; K02 = 1561-1900; K03 = 1901-2540; K04 = 2541-3140; K05 = 3141-4010;
- L = APGAR 1 min après la naissance; L01 = ≤ 2; L02 = > 2, ≤ 5; L03 = > 5, ≤ 8; L04 = > 8, ≤ 10;
- T = nombre de *Clostridium* par g de selles; T01 = < 10²; T02 = ≥ 10², < 10⁶; T03 = ≥ 10⁶, < 10⁷; T04 = ≥ 10⁷;
- N2 = nombre d'enfants à la naissance; N201 = jumeaux de même sexe; N202 = jumeaux de sexe différent; N203 = pas de naissance gémellaire;
- N3 = souffrance fœtale: N301 = non; N302 = oui;
- N6 = infection maternelle pendant la grossesse: N601 = non; N602 = oui;
- N7 = césarienne: N701 = non; N702 = oui;
- N8 = intubation en salle de travail: N801 = non; N802 = oui;
- O2 = exsanguinotransfusion: O201 = non; O202 = oui;
- O3 = cathéter ombilical: O301 = non; O302 = oui;
- O6 = détresse respiratoire: O601 = non; O602 = oui;
- O7 = ventilation assistée: O701 = non; O702 = oui;
- P = alimentation du nouveau-né au moment du prélèvement; P01 = lait de sa mère tiré; P02 = lait de femme frais; P03 = lait de femme lyophilisé; P04 = lait maternisé; P05 = substituts de lait; P06 = régime synthétique; P07 = alimentation parentérale;
- W2 = présence de *C. butyricum* dans les selles: W201 = non; W202 = oui;
- W3 = présence de *C. difficile* dans les selles: W301 = non; W302 = oui;
- W4 = présence de *C. perfringens* dans les selles: W401 = non; W402 = oui;
- W5 = présence de *C. tertium* dans les selles: W501 = non; W502 = oui;
- W6 = présence de *C. sordellii* dans les selles: W601 = non; W602 = oui;
- Q = test ELISA pour la recherche de rotavirus: Q01 = négatif; Q02 = positif;
- R = recherche de virus en microscopie électronique: R01 = rotavirus; R02 = coronavirus; R03 = rota- et coronavirus; R04 = recherche négative.

Certaines variables sont absentes de la figure parce qu'elles se superposent à des variables représentées. Il s'agit de N701 et N301 (en 34), K03 et K02 (en 35), L04 et H01 (en 37), W301 et O201 (en 38), W502 et N203 (en 38), H05 et M06 (en 41), R03 et R02 (en 49), et W601 et N301 (en 34).

inférieur à 31 semaines, un poids de naissance inférieur à 1560 g, une intubation en salle de travail, la pose d'un cathéter ombilical, une détresse respiratoire, un nombre de *Clostridium* fécaux supérieur à $10^7/g$ et, dans une moindre mesure, une souffrance fœtale et la présence dans les selles de *C. perfringens*. Aucun de ces facteurs n'est lié au diagnostic de diarrhée aiguë (classe M05). La présence de virus détectée au microscope électronique est le principal facteur de risque lié à ce diagnostic. Ceux liés au diagnostic d'ECUN sans examen anatomopathologique (classe M02) sont ceux de la classe M01, mais on peut trouver dans la classe M02 des jumeaux de sexe différent, et des enfants moins prématurés (âge gestationnel compris entre 31 et 34 semaines) et dont le poids de naissance est plus élevé (compris entre 1560 et 1900 g). Le faible effectif (4 nouveau-nés seulement) de la classe M03 (anses intestinales fixes sans pneumatose) rend aléatoire l'interprétation de l'analyse des correspondances. Enfin, les principaux facteurs de risque liés au diagnostic de colite hémorragique (classe M04) sont : une césarienne, une infection maternelle pendant la grossesse, un âge gestationnel de 35 semaines et la présence de *Clostridium*, notamment de *C. butyricum* et de *C. difficile*, dans les selles (10^2 à $10^6/g$).

Les figures 2 a, b et c illustrent les données recueillies chez les 115 nouveau-nés étudiés. La figure 2a montre que la moyenne d'âge gestationnel de la classe M01 est significativement inférieure à celle des 5 autres classes, et que la moyenne de la classe M05 est significativement supérieure à celle des classes M01 et M02. De même (fig. 2b), la moyenne des poids de naissance de la classe M01 est significativement inférieure à celle des classes M04, M05 et M06, et la moyenne de la classe M05 est significativement supérieure à celle des classes M01, M02, M04 et M06. En revanche (fig. 2c), l'APGAR n'est pas significativement différent d'une classe à l'autre.

ECUN et alimentation parentérale.

Quatre des 5 nouveau-nés des classes M01 et M02 qui n'avaient pas reçu d'alimentation entérale lors de l'apparition des premiers signes cliniques étaient âgés de 2 à 4 jours seulement. Chez 3 d'entre eux, on n'a dénombré aucun *Clostridium*. Parmi ceux-là, l'un, qui n'a pas survécu à son ECUN, hébergeait dans ses selles 5×10^9 *Klebsiella*, et chez un autre on a diagnostiqué une septicémie à *Klebsiella*. Un quatrième nouveau-né hébergeait *C. perfringens* en nombre élevé dans ses selles.

DISCUSSION

L'analyse des correspondances suggère qu'un prématuré d'une mère multipare, de faibles poids et âge gestationnel, souffrant de détresse respiratoire, sur lequel on a posé un cathéter ombilical et qui présente dans ses selles un nombre élevé de *Clostridium*, a plus de risques que les autres nouveau-nés

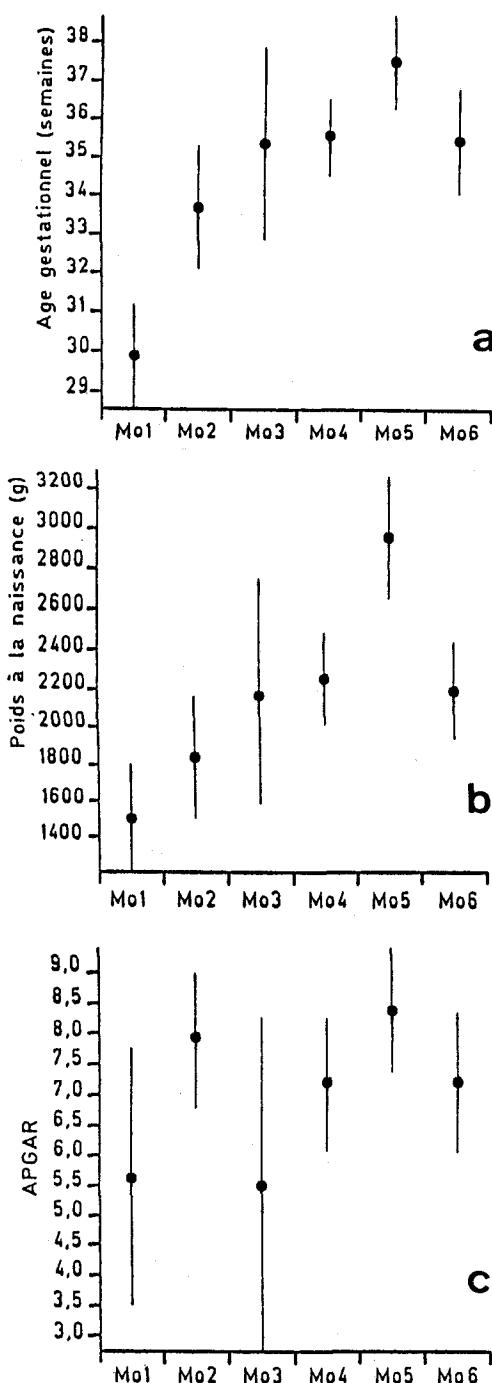


FIG. 2. — Moyennes et intervalles de confiance (au seuil 5 %) des 3 variables continues : âge gestationnel en semaine (a), poids à la naissance en g (b) et APGAR (c) calculés à partir des données recueillies chez 115 nouveau-nés.

d'être atteint d'une ECUN. Ce résultat confirme de nombreuses données de la littérature, notamment celles de Yu et coll. [25], mais ne confirme pas l'hypothèse d'une origine virale retenue par certains [3, 19]. On voit aussi que l'analyse des correspondances oppose nettement les classes de nouveau-nés atteints d'ECUN à celle des nouveau-nés atteints de diarrhée aiguë; cette dernière regroupe, en effet, des nouveau-nés âgés de moins de 8 jours, nés à terme ou presque avec un poids élevé, sans troubles respiratoires ni cathétérisme, dont les selles sont dépourvues de *Clostridium* mais contiennent des virus (rotavirus et/ou coronavirus). Dans ce cas, un rôle primordial pourrait être attribué aux virus de l'intestin et l'accélération du transit intestinal pourrait expliquer (1) l'absence fréquente de *Clostridium* dans leurs selles et (2) le fait que leurs selles contiennent fréquemment moins de 10^{10} bactéries/g.

Lorsqu'on compare les effectifs de nouveau-nés en fonction du nombre de *Clostridium* et du diagnostic clinique, ceux des nouveau-nés atteints d'ECUN ne se distinguent pas significativement de ceux des nouveau-nés qui ne souffrent d'aucun trouble intestinal. C'est ce qu'ont observé Westra-Meyer et coll. [24]. Ces auteurs et d'autres [1] pensent, d'autre part, que la présence en nombre élevé ($> 10^9/g$) de *Klebsiella* dans les selles constitue un facteur de risque important. Les observations que nous avons faites chez 2 nouveau-nés alimentés par voie parentérale confirment les soupçons qui s'attachent à ce genre bactérien. Les espèces de *Clostridium* que nous avons isolées sont celles isolées par d'autres [2, 9, 15, 22], à l'exception de *C. sordellii* qui ne semble pas avoir été cité dans la littérature. Notons que les *Clostridium* dominants n'ont pas été cultivés dans 10 % des selles, soit que leurs spores aient besoin d'un facteur de germination absent des milieux B' et D, soit que leurs cellules végétatives n'y croissent pas. Mais aucune de ces selles ne provenait de nouveau-nés des classes M01 et M02. Aucune espèce de *Clostridium* n'a été isolée à une fréquence plus grande que les autres chez les nouveau-nés atteints d'ECUN. Ce fait apporte un argument supplémentaire à l'hypothèse que l'ECUN n'est pas, dans tous les cas, une maladie déclenchée par une espèce unique de *Clostridium*, produisant une toxine connue dans l'intestin, laquelle pourrait être tenue pour responsable des altérations de la paroi intestinale. Toutefois, on peut concevoir que certaines souches bactériennes — *Clostridium*, *Klebsiella* — jouent un rôle important lorsqu'elles sont associées à d'autres facteurs de risque, notamment une perturbation de la motilité de l'intestin grêle, aboutissant à une stase plus ou moins longue du bol alimentaire et donc à une «métabolisation» bactérienne à ce niveau. Cette stase est observée dans le cas des diagnostics M01, M02 et M03. Le fait que l'arrêt de l'alimentation par voie orale est considéré par tous les pédiatres comme une nécessité chez les nouveau-nés présentant les premiers signes d'une ECUN, est en faveur de cette hypothèse. Toutefois, nous avons observé 5 cas d'enterocolite avec pneumatose chez des nouveau-nés en alimentation parentérale. Mais ce type d'alimentation ne supprime pas pour autant le développement bactérien dans l'intestin. Pour diminuer les risques inhérents aux bactéries intestinales, on pourrait envisager une décontamination par antibiothérapie. Mais le nombre élevé d'antibiotypes différents observé pour le seul genre *Clostridium* suggère qu'elle serait difficile à obtenir. On obtiendrait fort proba-

blement une meilleure prévention chez les nouveau-nés à risque en les plaçant, dès la naissance, dans des isolateurs analogues à ceux conçus pour le transport de nouveau-nés [23]. Cet isolement du nouveau-né aurait l'avantage de permettre la maîtrise de la colonisation bactérienne de l'intestin, soit par élimination, grâce à une décontamination à la naissance [13] ou à une antibiothérapie appropriée, dirigée contre les seules souches bactériennes introduites avec le nouveau-né dans l'isolateur [18], soit par contrôle à l'aide d'un ensemencement de souches bactériennes capables d'exercer un effet antagoniste contre les souches susceptibles de devenir pathogènes chez le prématuré à risque, par exemple *Klebsiella* ou *Clostridium*. Il est en effet très plausible que les premières bactéries qui s'installent ne soient pas potentiellement pathogènes pour le prématuré, puisque souvent, et en particulier dans cette étude, les troubles intestinaux autres que les diarrhées aiguës apparaissent après la première semaine de vie. Ce mode de prévention, déjà suggéré par Lawrence et coll. [14], est considéré comme inapplicable par Kosloke [12], qui traduit sans doute l'opinion de la majorité des pédiatres. Pourtant, les améliorations techniques apportées à la construction des isolateurs devraient être prises en compte. En remplaçant l'utérus maternel par une enveloppe imperméable aux agents microbiens, on pourrait espérer une meilleure réparation des lésions éventuelles de la paroi intestinale, la mise en place d'un transit intestinal normal et l'installation, au moment voulu, d'une flore intestinale appropriée.

RÉSUMÉ

Cent quinze nouveau-nés, âgés de 31 jours au plus et hospitalisés dans deux unités de soins intensifs, ont été groupés en 6 classes d'après le diagnostic clinique (entérocolite avec ou sans examen anatomopathologique et avec ou sans pneumatose radiologique, « colites hémorragiques », diarrhée aiguë, absence de troubles digestifs). Le nombre total de bactéries cultivables et le nombre de *Clostridium* ont été déterminés dans leurs selles. Dans certaines selles, on a également recherché la présence de rota- et/ou de coronavirus. Les effectifs de nouveau-nés souffrant d'entérocolites, avec ou sans pneumatose, ou de colites hémorragiques dont les selles contiennent des *Clostridium* ne sont pas significativement différents de ceux des nouveau-nés sans trouble digestif, alors que les selles de nouveau-nés atteints de diarrhée aiguë contiennent moins fréquemment des *Clostridium* que celles des autres nouveau-nés. Les *Clostridium* identifiés appartiennent aux espèces *C. butyricum*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. tertium* et *C. sordellii*. L'analyse des correspondances comparant la variable classe de diagnostic à 23 autres variables suggère que les variables suivantes : gémellité, poids de naissance < 1900 g, âge gestationnel < 35 semaines, détresse respiratoire, pose d'un cathéter ombilical et nombre de *Clostridium* > 10⁷/g de selle à l'apparition des signes cliniques, soit entre le 8^e et le 12^e jour de vie, sont liées au diagnostic d'entérocolite avec pneumatose. A l'opposé, l'absence de gémellité, un poids de naissance et un âge gestationnel élevés, l'absence de troubles respiratoires, de cathé-

térisme ombilical et de *Clostridium* fécaux, l'apparition des premiers signes cliniques à un âge inférieur à 8 jours, mais la présence de rota- et/ou de coronavirus dans les selles, sont liés au diagnostic de diarrhée aiguë.

MOTS-CLÉS: Nouveau-né, *Clostridium*, Diarrhée; Analyse des correspondances, Entérite ulcéronécrosante, Colite hémorragique.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement Mr G. Gorthier pour les conseils qu'il nous a prodigués pour mettre en œuvre le test ELISA, M^{me} De Manneville pour l'aide précieuse qu'elle nous a apportée dans l'analyse des selles de plusieurs nouveau-nés, MM. Chany et Lebon, pour les analyses de selles en microscopie électronique, et tous les membres des équipes des unités de soins intensifs à l'Hôpital St-Vincent-de-Paul et à l'Hôpital Antoine Béclère, sans lesquels ce travail n'aurait pu être mené à bien.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BELL, J.M., SHACKELFORD, P., FEIGIN, R.D., TERNBURG, J.L. & BROTHERTON, T., Epidemiologic and bacteriologic evaluation of neonatal necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.*, 1979, **14**, 1-4.
- [2] CASHORE, W.J., PETER, G., LAUERMANN, M., STONESTREET, B.S. & OH, W., Clostridia colonization and clostridial toxin in neonatal necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr.*, 1981, **98**, 308-311.
- [3] CHANY, G., MOSCOVICI, O., LEBON, P. & ROUSSET, S., Association of coronavirus infection with neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*, 1982, **69**, 209-218.
- [4] CORTHIER, G., Detection of rotavirus immune complexes: relationship between rotavirus antibodies and rotavirus antigens in faeces. *J. Virol. Methods*, 1981, **3**, 277-282.
- [5] CRAIG, J.P., A permeability factor (toxin) found in cholera stools and culture filtrates and its neutralization by convalescent cholera sera. *Nature (Lond.)*, 1965, **207**, 614-616.
- [6] EYAL, F., SAGI, E., ARAD, I. & AVITAL, A., Necrotizing enterocolitis in the very low birth weight infant: expressed breast milk feeding compared with parenteral feeding. *Arch. Dis. Childh.*, 1982, **57**, 274-276.
- [7] GAYNES, R.P., PALMER, S., MARTONE, W.J., HOLT, C.L., BUCHTER, D.S., FRAWLEY, L.W., PERLINO, C. & KANTO, W.P., The role of host factors in an outbreak of necrotizing enterocolitis. *Amer. J. Dis. Child.*, 1984, **138**, 1118-1120.
- [8] GRAY, E.S., LLOYD, D.J., MILLER, S.S., DAVIDSON, A.J., BALCH, N.J. & HORNE, C.H., Evidence for an immune complex vasculitis in neonatal necrotising enterocolitis. *J. clin. Path.*, 1981, **34**, 759-763.
- [9] HOWARD, F.M., FLYNN, D., BRADLEY, J.M., NOONE, P. & SZAWATKOWSKI, M., Outbreak of necrotising enterocolitis caused by *Clostridium butyricum*. *Lancet*, 1977, **II**, 1099-1102.
- [10] JACOB, C., ROUX, C., SPITZ, F. & TOMASSONE, R., Analysis of the ecological niche of four species of the genus *Phylloscopus*. *J. Envir. Manag.*, 1977, **5**, 103-113.
- [11] KLEIGMAN, R.M. & FANAROFF, A.A., Necrotizing enterocolitis. *New Engl. J. Med.*, 1984, **310**, 1093-1103.

- [12] KOSLOSKE, A.M., Pathogenesis and prevention of necrotizing enterocolitis: a hypothesis based on personal observation and a review of the literature. *Pediatrics*, 1984, **74**, 1086-1092.
- [13] LAUVERGEON, B. & HAJERI, H., Accouchements stériles. *Rev. franç. Gynéc.*, 1975, **70**, 557-562.
- [14] LAWRENCE, G., BATES, J. & GAUL, A., Pathogenesis of neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*, 1982, **I**, 137-139.
- [15] PEDERSEN, P.V., HANSEN, F.H. & CHRISTIANSEN, E.D., Necrotising enterocolitis of the newborn. Is it gas-gangrene of the bowel? *Lancet*, 1976, **II**, 715-716.
- [16] POPOFF, M.R. & SEBALD, M., Mise en évidence chez *Clostridium butyricum* d'un facteur thermostable responsable du pouvoir pathogène expérimental. *C.R. Acad. Sci. (Paris) (Sér. D)*, 1981, **292**, 763-766.
- [17] RAIBAUD, P., DICKINSON, A.B., SACQUET, E., CHARLIER, H. & MOCQUOT, G., La microflore du tube digestif du rat. — I. Techniques d'étude et milieux de culture proposés. *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, **110**, 568-590.
- [18] RAIBAUD, P., DUCLUZEAU, R., MULLER, M.C., GHNASSIA, J.C., VERON, M. & GRISCELLI, C., Evolution de la flore bactérienne fécale d'un enfant « hétéroxénique » élevé dans un isolateur et essai de décontamination par antibiothérapie. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1975, **126 B**, 357-366.
- [19] ROTBART, H.A., LEVIN, M.J., YOLKEN, R.H., MANCHESTER, D.K. & JANTZEN, J., An outbreak of rotavirus associated neonatal necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr.*, 1983, **103**, 454-459.
- [20] SACQUET, E., RAIBAUD, P. & GARNIER, H., Etude comparée de la microflore de l'estomac, de l'intestin grêle et du caecum du rat « holoxénique » (conventionnel), et de ses modifications à la suite de diverses interventions chirurgicales : anse aveugle jéjunale, déviations biliaires. *Ann. Inst. Pasteur*, 1971, **120**, 501-524.
- [21] SEBALD, M. & BREFORT, G., Recherche et identification des anaérobies en bactériologie courante. *Rev. Prat.*, 1977, **27**, 107-118.
- [22] SMITH, M.F., BORIELLO, S.P., CLAYDEN, G.S. & CASEWELL, M.W., Clinical and bacteriological findings in necrotising enterocolitis: a controlled study. *J. Infect.*, 1980, **2**, 23-31.
- [23] TONELLLOT, J.L., BENATIA, P., BLANC, J.F., GARCIA, F., GIPPET, J., JEANJEAN, G., KASSIM, S., MILLE, C., SERRE, L. & VALAT, J., Nouvel isolateur de transport pédiatrique à atmosphère bactériologiquement contrôlée. *Revue des SAMU*, 1982, **5**, 202-209.
- [24] WESTRA-MEIJER, C.M.M., DEGENER, J.E., DZOLJIC-DANILOVIC, G., MICHEL, M.F. & METTAU, J.W., Quantitative study of the aerobic and anaerobic faecal flora in neonatal necrotising enterocolitis. *Arch. Dis. Childh.*, 1983, **58**, 523-528.
- [25] YU, V.Y.H., JOSEPH, R., BAJUK, B., ORGILL, A. & ASTBURY, J., Perinatal risk factors for necrotising enterocolitis. *Arch. Dis. Childh.*, 1984, **59**, 430-434.