



**HAL**  
open science

# Circulation et persistance de pathogènes nosocomiaux multirésistants et hautement résistants émergents dans l'environnement hospitalier : complexité des unités de transmission

Sophie Baranovsky

► **To cite this version:**

Sophie Baranovsky. Circulation et persistance de pathogènes nosocomiaux multirésistants et hautement résistants émergents dans l'environnement hospitalier : complexité des unités de transmission. *Maladies infectieuses*. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTG002 . tel-03118483

**HAL Id: tel-03118483**

**<https://theses.hal.science/tel-03118483v1>**

Submitted on 22 Jan 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ecologie de la santé

École doctorale Gaia

Unité de recherche « Pathogènes Hydriques  
Santé Environnements » UMR 5569

## Circulation et persistance de pathogènes nosocomiaux multirésistants et hautement résistants émergents dans l'environnement hospitalier: *complexité des unités de transmission*

Présentée par Sophie Baranovsky  
Le 20 janvier 2020

Sous la direction de Estelle Jumas-Bilak

Devant le jury composé de

Simon Le Hello, Professeur, Université de Caen Normandie  
Christiane Forestier, Professeur, Université de Clermont-Ferrand  
Jean-Ralph Zahar, Professeur, Université de Paris XIII  
Estelle Jumas-Bilak, Professeur, Université de Montpellier  
Sara Romano-Bertrand, Docteur, Université de Montpellier  
Christine Roques, Professeur, Université de Toulouse

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Co-encadrant de thèse  
Membre du jury



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Mme le Pr Estelle Jumas-Bilak, pour son chaleureux accueil dès mon arrivée à Montpellier, pour sa disponibilité, pour son soutien quotidien et pour le temps accordé à m'expliquer, m'aider et à corriger mon travail.

Je voudrais également remercier Mme le Dr Sara Romano-Bertrand, pour son aide amicale, bilingue et pour tous ses conseils judicieux.

Je tiens aussi à remercier Mme le Pr Christiane Forestier et Mr le Pr Jean-Ralph Zahar de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et Mme le Pr Christine Roques et Mr le Pr Simon Le Hello de me faire l'honneur de siéger dans ce jury.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe Physe pour leur chaleureux accueil, pour leur partage de connaissances, leur aide et leurs conseils qui me permettent aujourd'hui de présenter cette thèse.

Un grand merci aussi à tous les membres du département d'hygiène hospitalière du CHU de Montpellier pour m'avoir si vite intégrée à leur équipe et pour m'avoir appris leur métier d'hygiéniste durant mes 5 années d'internat.

# Circulation et persistance de pathogènes nosocomiaux multirésistants et hautement résistants émergents dans l'environnement hospitalier: *complexité des unités de transmission*

## **Résumé**

Les infections associées au soins (IAS) sont un problème majeur de santé publique qui participent à la menace mondiale de l'antibiorésistance qui devrait en 2050 causer 10 millions de décès par an et devenir la première cause de mortalité dans le monde. La forte consommation d'antibiotiques, la promiscuité et la vulnérabilité des patients font de l'hôpital un lieu privilégié pour la transmission de bactéries notamment résistantes aux antibiotiques, et pour les phénomènes épidémiques. Les surfaces de l'environnement hospitalier jouent un rôle mal évalué dans ces phénomènes, en servant d'éventuel réservoir et relais aux agents responsables d'IAS. Mieux connaître la diffusion des bactéries responsables d'IAS sur les surfaces de soins est l'objectif général de cette thèse.

Afin d'observer la circulation et la persistance, sur les surfaces hospitalières, des bacilles à gram négatif (BGN) responsables d'IAS, et de comprendre les mécanismes de diffusion et du succès épidémique de certaines espèces bactériennes et sous-populations bactériennes responsables d'IAS, des prélèvements intensifs de surfaces, au total 5329, ont été réalisés. Deux sources de contamination des surfaces de l'environnement hospitalier ont été considérées : l'origine hydrique avec *P. aeruginosa* comme chef de file, et l'origine humaine avec les bactéries productrices de carbapénèmases (BPC).

Ce travail nous a permis de collectionner 567 bactéries environnementales issues d'un échantillonnage de terrain. Pour chaque souche bactérienne, des données clinico-éco-épidémiologiques ont été recueillies. Cette collection de bactéries isolées en conditions réelles est le socle de cette thèse et constitue toute son originalité. Elle nous a permis de tracer, au plus près des conditions réelles, les routes de transmission des bactéries responsables d'IAS sur les surfaces de soins. Ainsi, nous avons pu identifier des réservoirs environnementaux de BGN et analyser la circulation entre l'eau du point d'eau, les surfaces de soins et les patients pour les bactéries d'origine hydrique, et entre les surfaces de soins et les patients pour les bactéries d'origine humaine. Lors de l'analyse de ces circulations sur les surfaces de soins, les différents niveaux de complexité de la diversité des populations et sous-populations bactériennes ont pu être intégrés. Considérer cette complexité dans sa globalité est une clef pour mieux comprendre le rôle de l'environnement de soins dans la transmission de bactéries responsables d'IAS et les phénomènes épidémiques. De plus ce travail, a démontré que l'environnement proche des patients était le reflet des bactéries colonisant/infectant les patients tout en apportant des informations supplémentaires sur sa diversité. Ainsi le patient au sein de son environnement apparaît comme une unité de transmission à considérer dans sa globalité pour évaluer le risque de transmission et de phénomènes épidémiques.

**Mots clefs** : Infections associées aux soins ; Bactéries pathogènes opportunistes ; Bactéries productrices de carbapénèmases ; Prévention et contrôle du risque infectieux ; Environnement hospitalier; Transmission.

Spread and persistence of multi-drug resistant and extremely-drug resistant nosocomial pathogens in hospital environment:  
*complexity of units of transmission*

**Abstract**

Healthcare-associated infections (HAI) are a major concern of Public Health because of their involvement in the global threat of antibiotic resistance, predicted to become the first cause of mortality in 2050 with about 10 million deaths a year. The high antibiotic consumption associated with both patients' promiscuity and vulnerability make hospital an ideal place for cross-transmission of bacteria, especially drug-resistant bacteria, and for outbreak occurrence. Surfaces within hospital environment can play an underestimated role in these phenomena because they are potential reservoir or relay for bacteria responsible of HAI. Better understand the diffusion of bacteria responsible of HAI onto hospital surfaces is the general aim of this thesis.

In order to observe the circulation and persistence of gram-negative bacteria (GNB) involved in HAI onto hospital surfaces, and understand mechanisms of diffusion and outbreak successes of certain bacterial species and sub-species, we performed intensive samplings of hospital environment, with a total of 5329 surfaces sampled. Two sources of contamination were considered: the hydric origin with *Pseudomonas aeruginosa* in leading position, and the human origin with carbapenemase-producing bacteria (CPB).

During this work, we collected 567 bacterial strains by sampling the hospital environment. For every bacteria strain, clinical, ecological and epidemiological data were gathered. The strains collection isolated in real conditions of hospital activities is the foundation of this thesis and constitutes its originality. It permitted to retrace, as close as possible to real-life conditions, the routes of transmission of bacteria responsible of HAI on hospital surfaces. This allowed us to identify environmental reservoirs of GNB and analyze the circulation of hydric bacteria between water and water point-of-use, surfaces and patients, as well as the circulation of human bacteria between patients and hospital surfaces. These analyses integrated different levels of complexity through the diversity of bacterial population and sub-populations. Considering this complexity as a whole is a key to better understand the involvement of hospital environment in the transmission of bacteria responsible of HAI. Furthermore, we demonstrated that the close environment of patients reflected the bacteria colonizing/infecting patients, while providing further information on its diversity. Thus, the patient within its close healthcare environment must be considered as a unit of transmission to be considered in its whole in order to evaluate the risk of transmission and the occurrence of outbreaks.

**Key-words** : Healthcare-associated infections; Opportunistic pathogenic bacteria; Carbapenemase-producing bacteria; Infection prevention and control; Hospital environment; Transmission.

# Table des matières

Introduction .....	12
Synthèse bibliographique.....	16
<b>I- Le risque infectieux nosocomial et sa maîtrise .....</b>	<b>17</b>
A- Les infections nosocomiales en France .....	17
B- Les bonnes pratiques de soins pour maîtriser le risque infectieux nosocomial .....	20
1- Les précautions standard ou universelles .....	20
2- Les précautions complémentaires .....	22
3- Soins à risques et bonnes pratiques .....	25
C- Risque nosocomial lié à l'environnement hospitalier et sa maîtrise .....	28
1- L'environnement hospitalier : un réservoir de bactéries.....	28
2- L'environnement hospitalier : une source d'épidémies .....	29
3- Transmission nosocomiale liée aux niches technologiques et à l'artificialisation des milieux .....	30
Article 1: Premises Plumbing and Wet Technological Niches as Sources of Healthcare-Associated Infections in Hospital .....	30
4- Les moyens de maîtrise du risque environnemental .....	31
5- La surveillance microbiologique de l'environnement hospitalier .....	33
D- Faits marquants sur l'épidémiologie des bacilles à Gram négatif-responsables d'IAS .....	36
1- Une dynamique : EBLSE versus SARM .....	36
2- Le nouvel ennemi : les bactéries productrices de carbapénèmases (BPC).....	39
3- L'émergence des Pathogènes Résistants Opportunistes de la Plomberie et des Réseaux d'Eaux (PROPREs) ou Opportunistic Premise Plumbing Pathogens (OPPP) .....	42
<b>II- Potentiels infectieux et épidémique des principales bactéries à Gram négatif responsables d'IAS .....</b>	<b>45</b>
A- Notion de structure de population et relation avec le potentiel infectieux et épidémique .....	45
B- Méthode d'étude de la structure de population au sein d'espèces bactériennes.....	46
1- Le MLST : MultiLocus Sequence Typing .....	46
2- Multiplex rep-PCR (MR-PCR) ou BRE-PCR .....	46
3- Electrophorèse en champ pulsé (ECP) .....	47
4- Séquençage de génome entier .....	47
C- Potentiels infectieux et épidémique des entérobactéries : <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> et <i>E. cloacae</i> .....	48
1- Diversité de la résistance aux ATB.....	49
2- Diversité de population d'entérobactéries et émergence de clones à haut risque épidémique .....	57
Diversité génétique des entérobactéries selon leur pathogénicité .....	57
Diversité du fond génétique des entérobactéries .....	59
3- Transmission des entérobactéries en milieu hospitalier .....	63
L'hospitalisation favorise l'infection par des entérobactéries résistantes aux antibiotiques.....	63
L'environnement hospitalier, un réservoir d'entérobactéries : source d'épidémies nosocomiales .....	64
La survie dans l'environnement et le succès de diffusion via l'environnement : <i>K. pneumoniae</i> et <i>E. cloacae</i> versus <i>E. coli</i> .....	65
L'entretien des surfaces pour limiter les réservoirs environnementaux hospitaliers d'EPC .....	66
D- Potentiels infectieux et épidémique d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	67
1- Résistance d' <i>A. baumannii</i> aux antibiotiques .....	67
Résistance naturelle aux antibiotiques d' <i>A. baumannii</i> .....	67
La résistance acquise aux antibiotiques chez <i>A. baumannii</i> .....	68
2- Résistance aux antiseptiques et aux biocides .....	72
3- Emergence de clones d' <i>A. baumannii</i> à haut risque épidémique et résistants .....	73

4-Quelles sont les raisons du succès épidémique d' <i>A. baumannii</i> ? .....	75
Persistence d' <i>A. baumannii</i> sur les surfaces de l'hôpital .....	75
Diffusion d' <i>A. baumannii</i> sur les surfaces de l'hôpital .....	76
E- Potentiel infectieux et épidémique de <i>P. aeruginosa</i> .....	77
1-Résistance aux antibiotiques .....	77
2-Emergence mondiale de clones à haut risque épidémique .....	79
3- <i>P. aeruginosa</i> : une bactérie de l'environnement hospitalier .....	83
Transmission de souches d'origine hydrique à l'homme .....	84
Le réseau d'eau : réservoir de <i>P. aeruginosa</i> .....	85
Les points d'eau : un système sous forme de cycle propre-sale .....	86
Les surfaces hospitalières : réservoir /relais de transmission de <i>P. aeruginosa</i> .....	88
<b>Partie expérimentale .....</b>	<b>90</b>
<b>Partie I : Diffusion et persistance de bactéries d'origine hydrique sur les surfaces des unités de soins .....</b>	<b>93</b>
I) Contexte général et objectifs .....	94
II) Cartographie de la circulation des PROPRES dans un service avec des points d'eau protégés par des filtres antibactériens.....	96
Contexte du service d'hématologie et du CHU de Montpellier.....	96
Article 2 : Tracking the spread routes of opportunistic premise plumbing pathogens in a haematology unit with water points-of-use protected by antimicrobial filters.....	97
III) Cartographie de la circulation de <i>P. aeruginosa</i> dans un service à points d'eau non protégés .....	100
A) Contexte du service d'ORL au CHU de Montpellier .....	100
B) Stratégie d'étude .....	100
C) Matériel et méthodes .....	101
1-Prélèvement et analyse des échantillon d'eau et de surfaces .....	101
2-Origin et analyse des échantillons cliniques .....	101
3-Typage moléculaire.....	102
D) Recueil des données préliminaires à l'étude.....	102
1-Données sur la contamination de l'eau du service par <i>P. aeruginosa</i> .....	102
2-Données sur les infections et les portages à <i>P. aeruginosa</i> chez les patients .....	102
3-Cartographie des circuits secondaires de circulation de l'eau impliquant les surfaces de soins .....	103
E) Résultats .....	103
1-Structuration et dynamique des populations de <i>P. aeruginosa</i> dans le service .....	103
2-Traçage de la circulation de <i>P. aeruginosa</i> sur les surfaces de soins un jour donné.....	107
3-Circulation de <i>P. aeruginosa</i> dans l'environnement de soins en présence de patients porteurs.....	110
- Les patients contaminent-ils leur environnement ? .....	110
- Le succès de diffusion d'un génotype est-il prédictif du risque de contamination des patients ? .....	111
- Les patients contaminés pendant leur hospitalisation acquièrent-ils une souche de leur environnement de soins ? .....	112
F) Discussion .....	115
<b>Conclusion de la partie expérimentale 1 .....</b>	<b>123</b>
<b>Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins.....</b>	<b>124</b>
<b>Introduction et contexte général du CHU de Montpellier .....</b>	<b>125</b>

Stratégie générale d'étude.....	127
I) Influence des caractères cliniques des patients porteurs/infectés par des BPC dans la diffusion des BPC dans l'environnement de soins.....	134
A) Introduction .....	134
B) Matériel et méthodes .....	135
1-Détermination du taux de contamination des surfaces des chambres.....	135
2-Analyse statistique .....	136
C) Résultats.....	136
1-Détermination des groupes de patients.....	136
2-Analyse des caractéristiques des patients .....	137
D) Discussion .....	139
E) Conclusion .....	140
II) Réservoirs et modes de diffusion des populations de BPC autour des patients porteurs .....	141
Article 3 : Carbapenemase-producing bacteria in hospital rooms: diversity of spreading modes .....	141
III) Diffusion et transmission croisée des populations de BPC lors de situations épidémiques...177	
A) Considérer la diversité des BPC cliniques afin de mieux détecter les événements de transmissions croisées.....	177
Article 4 : Tracking carbapenemase-producing bacteria by molecular typing: Population diversity and sampling pitfall. ....	177
B) Evaluer l'impact de prélèvements intensifs des surfaces pour décrire les circuits de diffusion des BPC dans l'environnement : Exemple d'une épidémie de BPC. ....	178
Article 5: The diversity of carbapenemase-producing community should be considered to unravel complex routes of transmission during hospital outbreak .....	178
Conclusion de la partie expérimentale 2.....	215
Conclusion générale.....	216
Bibliographie .....	224

## Liste des illustrations

<b>Figure 1</b> : Prévalence des infections nosocomiales selon les principaux sites infectieux, résultats de la dernière enquête de prévalence des infections nosocomiales en France (prévalence % IC 95%) (SF2H 2018a).....	18
<b>Figure 2</b> : Part relative des microorganismes rapportés dans les infections nosocomiales (IN), selon leur résistance aux antibiotiques par rapport à la totalité des microorganismes responsables d'IN...	19
<b>Figure 3</b> : Affiche représentant les cinq indications à l'hygiène des mains selon l'OMS (WHO 2009) ..	21
<b>Figure 4</b> : Taux d'incidence/1000 patients d'E. coli BLSE, quadri-annuel de 2006 à 2010, de l'hôpital A et B, (Zahar et al. 2015). .....	25
<b>Figure 5</b> : Principales voies d'acquisition de microorganismes lors d'une intubation endotrachéale (A), lors d'un sondage vésical (B), et avec un cathéter vasculaire (C) (Espinasse et al. 2010) .....	27
<b>Figure 6</b> : Densités d'incidence par année des S. aureus résistants à la méticilline (SARM) et des entérobactéries productrices de $\beta$ -lactamases à spectre étendu (EBLSE) pour 1 000 journées d'hospitalisation de 2002 à 2016. (Nb ES= Nombre d'établissements de santé) (INVS 2018). .....	37
<b>Figure 7</b> : Figure représentant les différents modes de dissémination des Staphylococcus aureus résistants à la méticilline (SARM) et des entérobactéries productrices de $\beta$ -lactamases spectre étendu (EBLSE). Adaptée de Lucet et al. (2011).....	37
<b>Figure 8</b> : Proportion de isolats de K. pneumoniae résistant aux carbapénèmes par rapport à K. pneumoniae sensible, en Europe en 2007 et 2017, donnée de ECDC « European Centre for Disease Prevention and Control ». .....	41
<b>Figure 9</b> : Proportion de souches de K. pneumoniae résistantes aux carbapénèmes dans 5 pays européens durant les trois premières années des épidémies décrites dans le pays.....	41
<b>Figure 10</b> : Distribution mondiale des entérobactéries productrices de carbapénèmases selon la situation : endémique, cas épidémiques, cas sporadiques et selon leur gènes de résistance ( $bla_{IMP}$ , $bla_{KPC}$ , $bla_{NDM}$ , $bla_{OXA}$ , $bla_{VIM}$ ) (Logan et al. 2017). .....	56
<b>Figure 11</b> : Représentation de la diffusion mondiale des clones à haut risque épidémique de P. aeruginosa. ....	82
<b>Figure 12</b> : Cycle de transmission/ circulation de P. aeruginosa au sein d'un service de soins.....	84
<b>Figure 13</b> : Dendrogramme des différents génotypes définis par MR-PCR et isolés dans le service d'ORL. ....	106
<b>Figure 14</b> : Représentation de la circulation au sein du service d'ORL des différents génotypes de P. aeruginosa isolés dans l'environnement.....	109
<b>Figure 15</b> : Représentation de la circulation de P. aeruginosa entre l'eau du réseau, les patients et l'environnement de leur chambre .....	114
<b>Figure 16</b> : Nombre de bactéries productrices de carbapénèmases (BCP) isolées chez les patients hospitalisés au CHU de Montpellier de 2014 à 2018. ....	125
<b>Figure 17</b> : Nombre de BPC, selon leur type de résistance, isolées chez des patients hospitalisés au CHU de Montpellier de 2014 à 2018. ....	126
<b>Figure 18</b> : Moyenne en pourcentage du taux de contamination des surfaces de la chambre de patients porteurs/infectés par une BPC.....	137
<b>Figure 19</b> : Complément de l'article 5, courbe synoptique de l'épidémie.....	214

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Tableau listant les différents sites contaminés par <i>P. aeruginosa</i> et les différents génotypes de <i>P. aeruginosa</i> isolés sur ces sites. ....	119
<b>Tableau 2 :</b> Liste des patients inclus dans l'étude et données sur les prélèvements de surface réalisés dans leur chambre.....	129
<b>Tableau 3 :</b> Sites de prélèvements dans la chambre des patients .....	132
<b>Tableau 4 :</b> Caractéristiques cliniques et d'hospitalisation des patients porteurs/infectés par une BPC, regroupées selon leur capacité de diffusion dans l'environnement de soins. ....	138

## Liste des abréviations

BGN	Bacilles à Gram Négatif
BHRe	Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques émergentes
BLSE	$\beta$ -lactamase à spectre étendu
BMR	Bactéries multirésistantes aux antibiotiques
BPC	Bactéries productrices de carbapénamases
BPO	Bactéries pathogènes opportunistes
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CDC	Centre for Disease Prevention and Control
CLIN	Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CTA	Centrales de traitement d'air
CVP	Cathéter veineux périphérique
DHH	Département d'Hygiène Hospitalière
DM	Dispositifs médicaux
DSVA	Désinfection des surfaces par voie aérienne
EBLSE	Entérobactéries productrices de $\beta$ -lactamases à spectre étendu
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ECP	Electrophorèse en champs pulsé
EHR	Epidemic High-Risk
ES	Etablissement de santé
EPC	Entérobactéries productrices de carbapénèmases
HCSP	Haut Conseil de la Santé Publique
IAS	Infection Associée aux Soins
ISO	Infection du Site Opératoire
IC	Indice de confiance
IN	Infection Nosocomiale
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LEMH	Laboratoire d'écologie microbienne hospitalière
MR-PCR	Multiplex rep- Polymerase Chain Reaction
MLST	MultiLocus Sequence Typing
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPPPs	Opportunistic Premise Plumbing Pathogens
ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
PC	Précautions Complémentaires
PCC	Précautions Complémentaires Contact
PCR	Polymerase Chain Reaction
PROPREs	Pathogènes Résistants Opportunistes de la Plomberie et des Réseaux d'Eaux
PS	Précautions standard
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SF2H	Société Française d'Hygiène Hospitalière

SHA	Solutions Hydro-Alcooliques
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST	Sequence Type
UFC	Unité Formant Colonie
WGS	Whole Genome Sequencing

# Introduction

Au 19<sup>ème</sup> siècle, les pères fondateurs de la microbiologie comme Louis Pasteur, Emile Roux et Robert Koch ont décrit les micro-organismes, ce qui a permis par la suite de mieux comprendre le mode de transmission des maladies contagieuses. A la même époque, des précurseurs comme Ignaz Philipp Semmelweis et Joseph Lister ont ouvert la voie des grands principes de l'hygiène des soins médicaux avec respectivement l'hygiène des mains et le principe d'asepsie (Semmelweis 1861) (Lister 1867). La notion de transmission par contact et par l'environnement de soins était déjà présente à cette époque, car des hôpitaux avec des pavillons spécialisés ou des centres totalement dédiés à une maladie comme les sanatoriums furent construits afin d'isoler des malades contagieux.

Le 20<sup>ème</sup> siècle, ère de la vaccination, de l'antibiothérapie et des antiseptiques, voit la réduction considérable des infections contagieuses communautaires dans les pays développés. A l'hôpital, cette maîtrise des infections a contribué au développement de la chirurgie, des greffes, de l'oncologie, de la réanimation, de la néonatalogie en particulier, ce qui a permis de diminuer considérablement la mortalité et d'allonger l'espérance de vie. En contrepartie, l'hôpital accueille des patients fragiles et immunodéprimés devenant de plus en plus vulnérables aux infections. Le 20<sup>ème</sup> siècle est aussi marqué par l'émergence de l'antibiorésistance et la cascade « nouveaux antibiotiques/nouvelles résistances » : dès la sortie d'une nouvelle molécule sur le marché, les bactéries s'adaptent et une nouvelle résistance émerge. Ainsi en 1946, trois ans après l'introduction de la pénicilline, 14% de souches hospitalières étaient déjà résistantes. Et, dès les années 60, des épidémies nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistant aux pénicillines et à bacilles à coloration de Gram négatif (BGN) multirésistants aux antibiotiques surviennent à l'hôpital (OMS 2007).

La prise de conscience de l'émergence des infections nosocomiales (IN) conduit en 1970 à des recommandations et des protocoles rédigés initialement par le CDC aux USA (CDC, 1970). En France, le début de la lutte organisée contre les IN est marqué par le décret du 6 mai 1988, créant les « Comités de Lutte contre les Infections Nosocomiales » (CLIN) (Décret n°88-657 du 6 mai 1988 ). Depuis, une politique de santé s'est construite autour de la lutte contre les IN : des comités d'experts ont formulé plus d'une centaine de recommandations

et l'état a publié une dizaine de textes de lois ou de programmes nationaux (SF2H 2010) (DGOS 2019). En 2006, dans l'optique d'une prise en charge des patients tout au long de leur parcours de soins, le domaine des IN s'étend à l'extérieur de l'hôpital avec la nouvelle définition des infections associées aux soins (IAS). Une IAS est une infection qui survient au cours et au décours de la prise en charge (thérapeutique, diagnostique, préventive, palliative ou éducative) d'un patient. L'infection est absente et non en incubation avant sa prise en charge. Si l'IAS est acquise lors de l'hospitalisation du patient, il s'agit alors d'une infection nosocomiale (Santé Publique France 2018).

Selon les données de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) en 2015, à tout instant, plus de 1,4 million de personnes dans le monde souffrent d'infections contractées à l'hôpital. En France, selon la dernière enquête de prévalence de 2017, la prévalence des IN est de 5,21% et une entérobactérie, *Escherichia coli*, est la bactérie la plus fréquemment rapportée (SF2H 2018a). Depuis une 20<sup>aine</sup> d'années, on observe une diminution importante des IAS causées par *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) (diminution de 62 % entre 2002 et 2016) expliquée par la compliance des soignants aux mesures d'hygiène hospitalière et notamment à l'hygiène des mains. Mais parallèlement, on observe une augmentation des IAS à entérobactéries résistants aux  $\beta$ -lactamines par production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) (densité d'incidence des entérobactéries BLSE (EBLSE) multipliée par 5,4 de 2002 à 2016) (INVS 2018). Afin de faire face à ces BGN multirésistantes aux antibiotiques, de nouveaux antibiotiques, les carbapénèmes, ont été mis sur le marché et sont de plus en plus utilisés. Cette nouvelle pression de sélection a conduit à l'émergence de bactéries productrices de carbapénamases (BPC) qui sont considérées comme hautement résistantes émergentes (BHRe) et peuvent conduire à des échecs thérapeutiques (Friedman et al. 2017) (Friedrich 2019).

En plus des entérobactéries, deux autres BGN responsables d'IAS méritent l'attention : *Acinetobacter baumannii* avec des souches de plus en plus résistantes aux antibiotiques dont certaines sont productrices de carbapénémases et *Pseudomonas aeruginosa*, le 4<sup>ème</sup> agent responsable d'IN en France provoquant des infections graves (pneumopathies, bactériémies, chocs septiques) responsable d'une mortalité importante de plus de 30%. De plus *P. aeruginosa* présente une multirésistance aux antibiotiques par des mécanismes naturels et acquis (Gellen-Dautremer, 2010) (Ramírez-Estrada et al. 2016) (SF2H 2018a).

Le 21<sup>ème</sup> siècle sera marqué par l'antibiorésistance qui entraîne environ 700 000 morts par an et qui, selon des prévisions, devrait en causer 10 millions en 2050 si la dynamique actuelle n'est pas enrayerée, devenant ainsi la première cause de décès devant la mortalité par cancer et maladies cardiovasculaires (O'Neil, 2016). Afin de lutter efficacement contre l'antibiorésistance, l'OMS a préconisé une approche intitulée « One-Health » qui a pour objectif de coordonner les trois grands domaines: la santé humaine, la santé animale et la santé environnementale. Cette multidisciplinarité permet d'apporter une vision plus globale à l'émergence de l'antibiorésistance et d'intégrer le patient dans son environnement (Ryu et al. 2017). En 2017, l'OMS a publié une liste d'agents pathogènes prioritaires résistants aux antibiotiques, considérés comme les plus à risque pour l'homme. Cette liste est divisée en trois niveaux de priorité : critique, élevé, moyen. Les bactéries se situant en priorité n°1 « critique » sont :

- ✓ *A. baumannii*, résistant aux carbapénèmes
- ✓ *P. aeruginosa*, résistant aux carbapénèmes
- ✓ *Enterobacteriaceae*, résistant aux carbapénèmes, producteur de BLSE »

(OMS 2017a).

L'émergence de ces bactéries est en partie due à leurs caractères intrinsèques, comme leur capacité à acquérir de nouveaux mécanismes de résistance, ou leurs caractères adaptatifs qui font de certaines sous-populations des lignées particulièrement pathogènes et/ou épidémiogènes en milieu de soins.

La forte consommation d'antibiotiques, l'environnement de soins, la promiscuité et la vulnérabilité des patients font de l'hôpital un lieu privilégié pour la transmission de bactéries notamment résistantes aux antibiotiques, et pour les phénomènes épidémiques. Les IAS participent d'ores et déjà à la menace mondiale majeure de santé publique que représente la résistance aux anti-infectieux.

A l'hôpital, il est classiquement admis que les agents infectieux peuvent être transmis entre deux patients, entre les patients et les soignants, entre les patients et les visiteurs ou entre les soignants et les visiteurs, par contact direct ou par contact indirect via une transmission croisée manuportée ou via l'environnement hospitalier.

L'environnement hospitalier va nous intéresser particulièrement dans ce travail. Son étude concerne un domaine très vaste, il s'intéresse à tout ce qui n'est pas humain (patient /soignant/visiteur). L'environnement de soins est classiquement et artificiellement divisé en trois entités: les surfaces, l'air et l'eau. Il s'agit en fait de tous les éléments qui entrent en contact avec les patients, les soignants, les visiteurs et qui permettent le fonctionnement d'une structure de soins tels que les dispositifs médicaux, le matériel biomédical, le linge, l'alimentation... Cet environnement peut être très commun comme un siphon par exemple, ou très sophistiqué/technologique comme certains robots de dernière génération. L'environnement hospitalier est contaminé par des microorganismes d'origine environnementale ou humaine provenant des patients, des soignants ou des visiteurs. Ainsi, l'environnement hospitalier est de plus en plus décrit comme réservoir/relais de transmission de pathogènes et source de phénomènes épidémiques (Clarivet et *al.* 2016) (Umezawa et *al.* 2015). Toutefois, la diffusion des bactéries dans l'environnement hospitalier est complexe, du fait que l'hôpital est un habitat artificiel très diversifié, accueillant dans une certaine proximité des patients ayant des vulnérabilités différentes.

La diffusion et la persistance des d'agents d'IAS dans l'environnement de soins étant à ce jour peu décrites, leurs rôles dans la transmission des IAS et dans le succès épidémique reste une question ouverte encore controversée. L'objectif principal de ce travail était d'apporter des éléments pour mieux comprendre les transmissions des BGN agents d'IAS via l'environnement hospitalier. Pour cela, nous proposons i) d'observer les circuits et les pratiques de soins pouvant entraîner une contamination de l'environnement ; ii) d'étudier sur le terrain et expérimentalement la persistance et la diffusion des BGN hydriques et humaines dans l'environnement hospitalier ; iii) d'étudier la diversité génétique des BGN agents d'IAS dans l'environnement de soins et chez le patient hospitalisé dans cet environnement afin de caractériser d'éventuelles sous-populations présentant un succès épidémique important en milieu hospitalier (Clark et *al.* 2015) (Abdouchakour et *al.* 2018).

Avant de développer la partie expérimentale qui répond à ces objectifs, une synthèse bibliographique présentera les principaux aspects du risque infectieux nosocomial et les moyens actuels de maîtrise puis l'état des connaissances sur les espèces et les populations de BGN responsables d'IAS et leur épidémiologie.

# Synthèse bibliographique

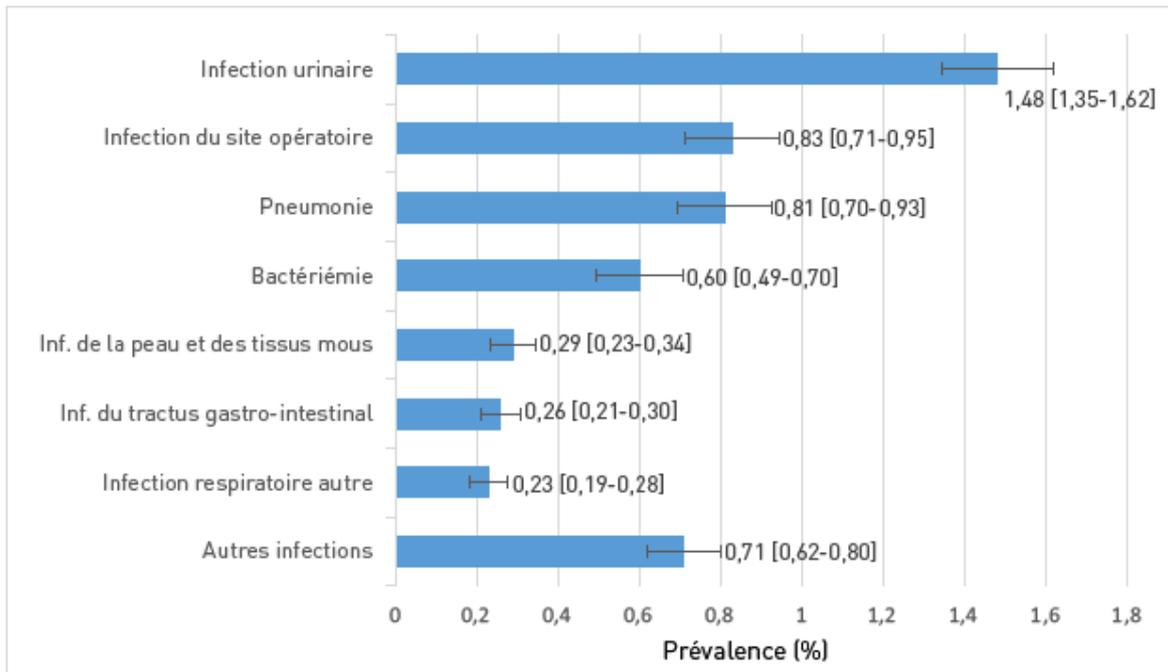
## I- Le risque infectieux nosocomial et sa maîtrise

### A- Les infections nosocomiales en France

La politique française de santé publique est organisée autour de la prévention des IAS depuis 30 ans. Plusieurs facteurs ont engendré la mise en place de mesures spécifiques comme un taux important d'infections nosocomiales (IN), et l'implication des associations de patients (Cour des comptes 2019). La prévalence des IN en France a diminué en passant de 6,9% en 2001 à 4,97% en 2006 puis s'est stabilisée autour de 5% depuis 2006. La dernière enquête française sur la prévalence des IN montre qu'elle est de 5,21% en 2017 (SF2H 2018a), alors que l'enquête menée la même année par le ECDC « European Centre for Disease Prevention and Control », montrait qu'elle est de 5,8% en France en 2017, soit légèrement au-dessus de la moyenne européenne, qui est de 5,5%. Cette prévalence en Europe varie de 2,9% pour la Lituanie à 10% pour la Grèce (ECDC 2019). En France, les IN concernent 750 000 cas par an, causant 4000 décès par an chez des patients dont le pronostic vital n'était pas engagé avant l'épisode infectieux. De plus, ces infections engendrent un rallongement de la durée d'hospitalisation, et des complications médicales et psychologiques pour les patients (Inserm 2015).

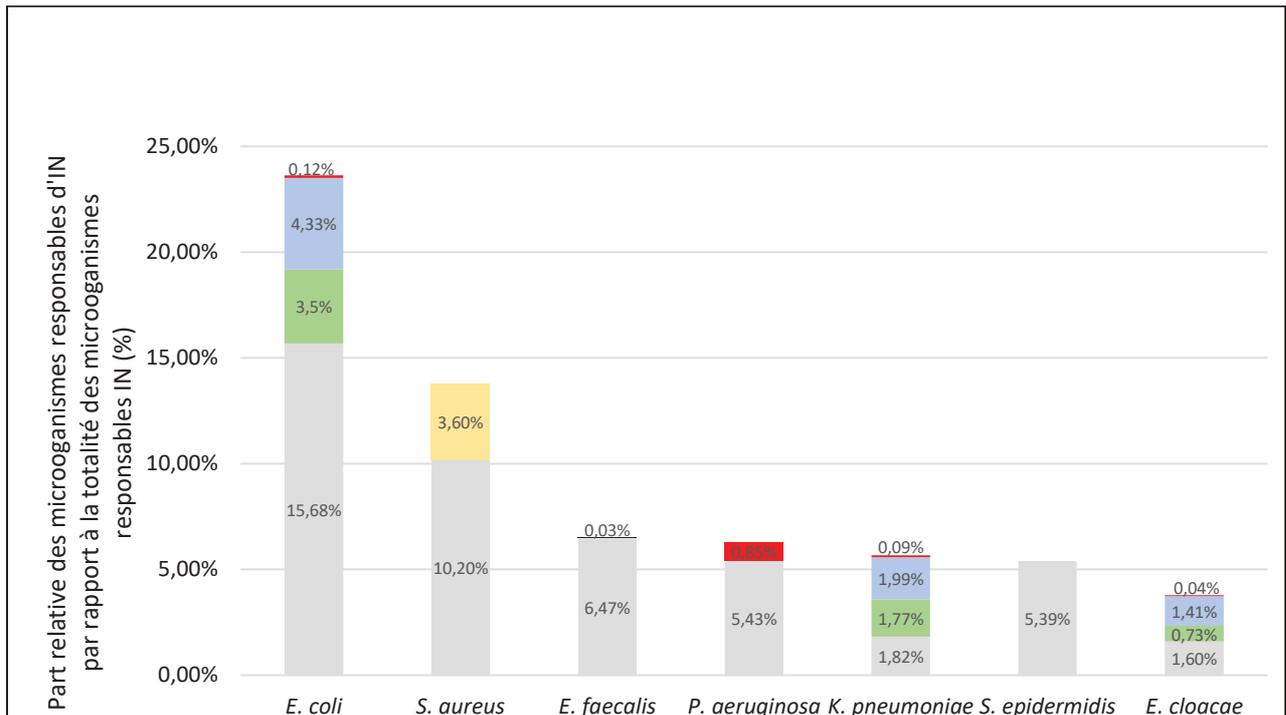
Les IN peuvent être d'origine endogène, le patient s'infecte alors avec les bactéries qu'il porte dans ses microbiotes. Deux phénomènes sont à l'origine de l'infection, le recours à un acte invasif comme un acte chirurgical, une endoscopie, la mise sous ventilation mécanique, la pose de cathéter... et l'état d'immunodépression des patients suite au stress de l'hospitalisation, aux soins, aux traitements médicamenteux, à leur pathologie... Les infections peuvent aussi être d'origine exogène, le patient s'infecte suite au contact direct ou indirect avec un autre patient, un soignant, un visiteur ou suite à l'exposition à un réservoir environnemental contaminé : eau, air, surfaces, niches technologiques, objets polymanipulés...

Les quatre infections nosocomiales majoritaires sont les infections urinaires dont la part relative est de 28,47 % (IC 95 % [26,50-30,53]), les infections du site opératoire (15,92 % [14,32-17,66]), les pneumonies (15,63 % [13,96-17,46]) et les bactériémies (11,43 % [10,01-13,03]) (Figure 1) (SF2H 2018a).



**Figure 1** : Prévalence des infections nosocomiales selon les principaux sites infectieux, résultats de la dernière enquête de prévalence des infections nosocomiales en France (prévalence % IC 95%) (SF2H 2018a).

Les microorganismes les plus impliqués dans les IN, selon la dernière enquête nationale de prévalence des IN, sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* et *Enterobacter cloacae*. La part relative de leur implication dans les IN et leur résistance aux antibiotiques sont représentées dans la figure 2.



**Figure 2 :** Part relative des microorganismes rapportés dans les infections nosocomiales (IN), selon leur résistance aux antibiotiques par rapport à la totalité des microorganismes responsables d'IN.

Sont représentés en gris le taux de souches pour lesquelles aucune résistance n'a été identifiée, en bleu celles résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, en vert celles productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, en rouge celles résistantes aux carbapénèmes, en jaune celles résistantes à la mupirocine, en noir celles résistantes à la vancomycine. (Figure adaptée de l'enquête nationale de prévalence des IN de 2017, SF2H 2018a).

Plusieurs études ont tenté de déterminer la part évitable et la part non évitable des IN. Ce taux varie et peut aller jusqu'à 70% d'IN évitables selon les pays et les spécialités (Haley et al. 1985) (Umscheid et al. 2011). En France, il est admis que 30% des IN seraient évitables par des programmes de prévention et la mise en place d'actions. Ce taux est en accord avec l'examen des dossiers réalisé par l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris qui, lors de l'analyse des dossiers médicaux en cas de litiges, évalue les fautes de l'hôpital et donc la part évitable des IN entre 15 % et 24,5% (Cour des comptes 2019).

Ces IN ont un coût économique qui, selon le rapport de l'Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé (Opeps), entraînerait un surcoût de 3 500 à 8 000 euros par infection soit 2,4 à 6 milliards d'euros dépensés pour ces IN (Vasselle, 2006).

Si l'on se tient à la définition des IAS qui prend en compte la globalité du parcours de soins d'un patient, la prévalence et le coût des IAS ne peuvent pas être calculés car la prévalence des infections liées aux soins de ville n'est pas connue et il n'existe pas d'enquête à grande échelle dans le secteur médico-social (Cour des comptes 2019). Afin de lutter contre ces IAS,

une réglementation et des recommandations sont émises à différentes strates par les autorités compétentes internationales ou nationales et les sociétés savantes internationales ou nationales sur les bonnes pratiques de soins et sur la maîtrise de l'environnement de soins.

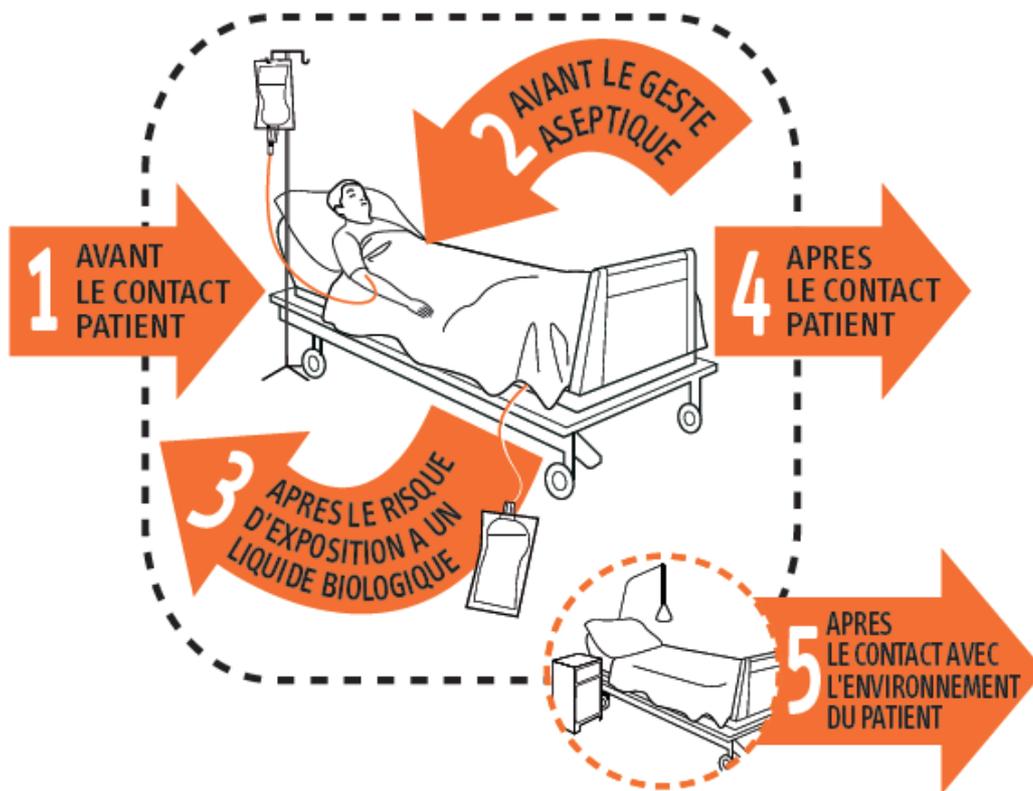
## **B- Les bonnes pratiques de soins pour maîtriser le risque infectieux nosocomial**

### **1- Les précautions standard ou universelles**

Les hôpitaux mettent en place des moyens préventifs pour lutter contre les IAS. Les précautions standard (PS) sont le socle de ces moyens préventifs. Les PS en hygiène hospitalière doivent être utilisées par tous et pour tous afin éviter la transmission de microorganismes sachant que ces derniers, qu'ils soient infectieux ou appartenant aux microbiotes des patients, ne sont jamais exhaustivement connus en pratique courante de soins (WHO 2009). En France, depuis juin 2017, de nouvelles recommandations sur les PS sont édictées. Les PS sont maintenant définies en 7 axes: 1) le champ d'application et la stratégie de mise en œuvre avec, par exemple, la rédaction de protocole et la formation du personnel ; 2) la compliance à l'hygiène des mains, dont les différentes indications sont représentées dans la figure 3 ; 3) l'utilisation d'équipements de protection individuelle pour les soignants comme par exemple le port de tablier à usage unique lors de soins exposant à un risque de projection de liquide biologique; 4) l'hygiène respiratoire avec par exemple le port de masque lors de présence de symptômes respiratoires; 5) la prévention des accidents d'exposition au sang; 6) la gestion des excréta; 7) la gestion de l'environnement (SF2H 2017). Ces PS reconnues comme efficaces sont mises en place dans tous les pays développés (Habboush et Guzman 2018). Malgré la formation du personnel soignant et de nombreuses campagnes de sensibilisation aux pratiques d'hygiène, ces PS restent insuffisamment appliquées comme le démontre la trop faible consommation des solutions hydro-alcooliques (SHA). Ainsi en 2016, 50% des établissements de santé (ES) ont utilisé une quantité de SHA inférieure aux 2/3 de leur objectif de consommation personnalisée (Cour des comptes 2019). Selon le dernier bilan de Lutte contre les infections nosocomiales (LIN) du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Montpellier, la consommation de SHA pour l'établissement ne

représente que 85,5% de l'objectif recommandé pour l'établissement (communication personnelle du Département d'Hygiène Hospitalière, 2018).

# Les 5 indications à L'HYGIENE DES MAINS



<b>1</b> AVANT LE CONTACT PATIENT	<b>QUAND ?</b> Le professionnel pratique l'hygiène des mains lorsqu'il s'approche du patient pour le toucher <b>POURQUOI ?</b> Pour protéger le patient des germes transportés par les mains du professionnel
<b>2</b> AVANT LE GESTE ASEPTIQUE	<b>QUAND ?</b> Le professionnel pratique l'hygiène des mains immédiatement avant d'exécuter un geste aseptique <b>POURQUOI ?</b> Pour protéger le patient de l'inoculation de germes y compris ceux provenant de son propre corps
<b>3</b> APRES LE RISQUE D'EXPOSITION A UN LIQUIDE BIOLOGIQUE	<b>QUAND ?</b> Le professionnel pratique l'hygiène des mains immédiatement après avoir été exposé potentiellement ou effectivement à un liquide biologique <b>POURQUOI ?</b> Pour protéger le professionnel et l'environnement de soins des germes
<b>4</b> APRES LE CONTACT PATIENT	<b>QUAND ?</b> Le professionnel pratique l'hygiène des mains lorsqu'il quitte le patient après l'avoir touché <b>POURQUOI ?</b> Pour protéger le professionnel et l'environnement de soins des germes
<b>5</b> APRES LE CONTACT AVEC L'ENVIRONNEMENT DU PATIENT	<b>QUAND ?</b> Le professionnel pratique l'hygiène des mains lorsqu'il quitte l'environnement du patient après avoir touché des surfaces et objets - même sans avoir touché le patient <b>POURQUOI ?</b> Pour protéger le professionnel et l'environnement de soins des germes

**WORLD ALLIANCE**  
for **PATIENT SAFETY**

L'OMS remercie les Hôpitaux Universitaires de Genève (HUG), en particulier les collaborateurs du service de Prévention et Contrôle de l'Infection, pour leur participation active au développement de ce matériel.  
Octobre 2006, version 1.

 **Organisation mondiale de la Santé**

Toutes les précautions ont été prises par l'OMS pour vérifier les informations contenues dans la présente publication. Toutefois, le document est diffusé sans garantie, explicite ou implicite, d'aucune sorte. L'interprétation et l'utilisation des données sont de la responsabilité du lecteur. L'OMS ne saurait en aucun cas être tenue pour responsable des dommages qui pourraient en résulter.

Image: marcello/contrasto

**Figure 3:** Affiche représentant les cinq indications à l'hygiène des mains selon l'OMS (WHO 2009)

L'intérêt de l'hygiène des mains a été prouvé dès le 19<sup>ème</sup> siècle par Semmelweis à Vienne qui observe que le taux de mortalité par fièvre puerpérale des femmes accouchant dans un 1<sup>er</sup> service où travaillent des étudiants en médecine et des sages-femmes est de 17%, alors que dans le 2<sup>ème</sup> service où travaillent uniquement des sages-femmes, ce taux n'est que de 2%. Les étudiants en médecine passant directement de la salle d'autopsie à la salle d'accouchement, Semmelweis leur impose le lavage de mains avec une solution d'hypochlorite de Calcium, d'abord à l'entrée du service d'obstétrique, puis entre 2 accouchements et fait ainsi chuter le taux de décès par fièvre puerpérale à 1% (Semmelweis 1861). Ces travaux font polémique à l'époque mais, de nos jours, ils restent un exemple flagrant de l'intérêt de l'hygiène des mains contre la transmission de microorganismes. L'étude de Pittet et *al.* (2000) est un autre exemple, contemporain cette fois, de l'hygiène des mains comme moyen de lutte contre les infections nosocomiales. Ainsi, l'augmentation de la compliance à l'hygiène des mains est liée à une diminution du taux d'infections nosocomiales, la compliance à l'hygiène passant de 47,6% en 1994 à 62,2% en 1998, alors que le taux d'infections nosocomiales passe de 18 cas à 10 pour 100 admissions (Pittet et *al.* 2000).

## 2-Les précautions complémentaires

Lorsqu'un patient est porteur ou infecté par un microorganisme connu à fort risque de transmission à un autre patient, des précautions complémentaires (PC) sont recommandées :

- Lorsque les microorganismes se transmettent par gouttelette, comme l'agent de grippe ou le méningocoque, des PC « gouttelette » sont mises en place avec le port de masque chirurgical par les soignants et les patients.
- Lorsque les microorganismes se transmettent par l'air, comme les agents de la tuberculose, de la rougeole, ou de la varicelle, des PC « air » sont mises en place avec le port d'un appareil de protection respiratoire par les soignants et le port de masque chirurgical par les patients (SF2H 2009) (SF2H 2010) (Tacconelli et *al.* 2014).

→ Lorsque les microorganismes se transmettent par contact, des PC « contact » doivent être instaurées et des consignes sont recommandées selon les bactéries et leurs résistances (Tacconelli et *al.* 2014).

→ Pour les bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR), définies comme résistantes à au moins une molécule de trois familles différentes d'antibiotiques comme les EBLSE (Sievert et *al.* 2010), ces précautions incluent la mise en chambre individuelle du patient, un accès contrôlé avec une signalisation sur la porte d'entrée de la chambre, la limitation des transferts, l'évacuation du linge et des déchets en double emballage, le port d'un tablier à usage unique pour les soignants lors de contact direct avec le patient ou son environnement proche, l'utilisation de matériel dédié au patient comme par exemple les tensiomètres, l'éducation du patient et des visiteurs à l'hygiène des mains et à l'utilisation de la SHA, et l'entretien de l'environnement (SF2H 2009) (SF2H 2010) (Tacconelli et *al.* 2014).

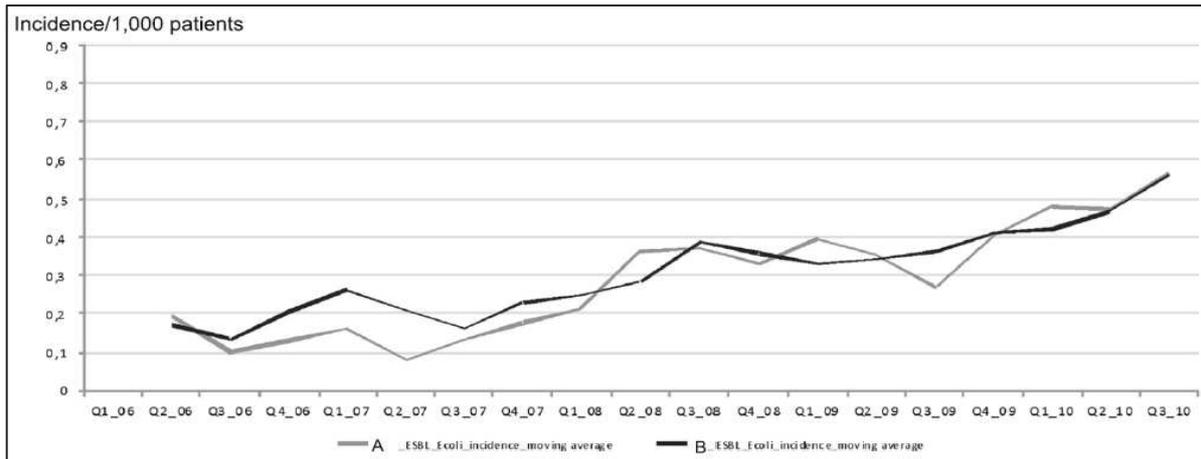
→ Pour les bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe) telles que les entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) et *Enterococcus faecium* résistants aux glycopeptides (ERG), des précautions complémentaires contact renforcées sont nécessaires. En plus des précautions contact classiques, des mesures d'hygiène hospitalière particulières sont mises en place dont le dépistage des patients hospitalisés de l'étranger. Ces patients étant considérés comme les plus à risque d'être porteurs de BHRe, un cohorting avec une équipe dédiée aux patients porteurs ou infectés par une BHRe, avec un dépistage des patients contacts est organisé. Ces derniers sont pris en charge par la même équipe de soignants que les patients porteurs/infectés par une BHRe et les cas sont signalés aux autorités de santé : Agence régionale de santé (ARS) (HCSP 2013) (Lepelletier et *al.* 2015) (French et *al.* 2017).

Afin de s'assurer du succès de ces précautions, Birgand et *al.* 2015, ont mis en lumière le rôle essentiel du « leadership » (de personnes motivées et motivantes) dans la coordination des actions au niveau local, national et international avec une approche pluridisciplinaire et

notamment la collaboration des services de bactériologie médicale, de médecine infectieuse et de prévention du risque infectieux (Birgand et al. 2015).

Plusieurs études ont pu démontrer l'efficacité des précautions complémentaires contact (PCC), qui ont permis de diminuer la transmission de bactéries comme *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline (Hassoun et al. 2017) ou les entérocoques résistants à la vancomycine (Mutters et al. 2013). La mise en place de PCC a aussi permis de résoudre des épidémies à *K. pneumoniae* BLSE (Lucet et al. 1999).

Mais, l'émergence des *E. coli* BLSE depuis une 15<sup>aine</sup> année pose la question de l'efficacité des PCC comme barrière à la diffusion de cette bactérie. Pour répondre à cette question, Zahar et al. (2015), ont comparé le taux d'incidence des entérobactéries BLSE (EBLSE) et d'*E. coli* BLSE de deux hôpitaux parisiens, pendant une période de 5 ans à partir de 2006. Lors de l'hospitalisation d'un patient porteur ou infecté par un *E. coli* BLSE, dans le premier hôpital (A), seules les précautions standard (PS) sont respectées alors que dans le second (B) en plus des PS, des précautions complémentaires contact (PCC) sont mises en place. Pour chaque établissement, le dépistage des patients est réalisé de la même façon, la compliance aux PS et l'activité médicale sont similaires. Durant la période de l'étude, le taux d'incidence d'ESBL a augmenté pour les deux hôpitaux, mais ce taux d'incidence est plus élevé pour l'hôpital A, où seules les PS sont respectées (de 0.41 à 1.87/1000 patients-jours dans l'hôpital A et de 0.54 à 1.31/1000 patients-jours dans l'hôpital B). Cette différence est due à une proportion plus importante de *K. pneumoniae* BLSE isolées sur l'ensemble de la période pour l'hôpital A (37.5 %), que pour l'hôpital B (27.5 %), ( $p=0,73$ ). Concernant *E. coli* BLSE, le taux d'incidence entre les deux hôpitaux n'est statistiquement pas différent ( $p=0,05$ ) (0.14/1000 à 0.41/1000 pour l'hôpital A et de 0.20/1000 à 0.40/1000 pour l'hôpital B) (Figure 4).



**Figure 4 :** Taux d'incidence/1000 patients d'*E. coli* BLSE, quadri-annuel de 2006 à 2010, de l'hôpital A et B, (Zahar et al. 2015).

La proportion de *E. coli* BLSE isolée pendant la période d'étude est statistiquement semblable entre les deux hôpitaux, avec un taux de 38.7 % pour l'hôpital A et de 44.6 % pour l'hôpital B ( $p=0,003$ ) (Zahar et al. 2015). Cette étude révèle que les PCC en plus des PS ont un impact sur le taux d'incidence des *K. pneumoniae* BLSE mais pas sur les *E. coli* BLSE. Donc la mise en place des PCC, pour lutter contre les infections, a une efficacité différente selon l'espèce bactérienne considérée. Cette étude montre bien que l'utilité des PCC ne semble pas être universelle pour tous les microorganismes transmis par contact. Les pratiques professionnelles en hygiène ont un impact sur les taux d'IAS mais une meilleure compréhension des mécanismes de transmission des bactéries permettrait de mieux comprendre et prévenir la diffusion des IAS.

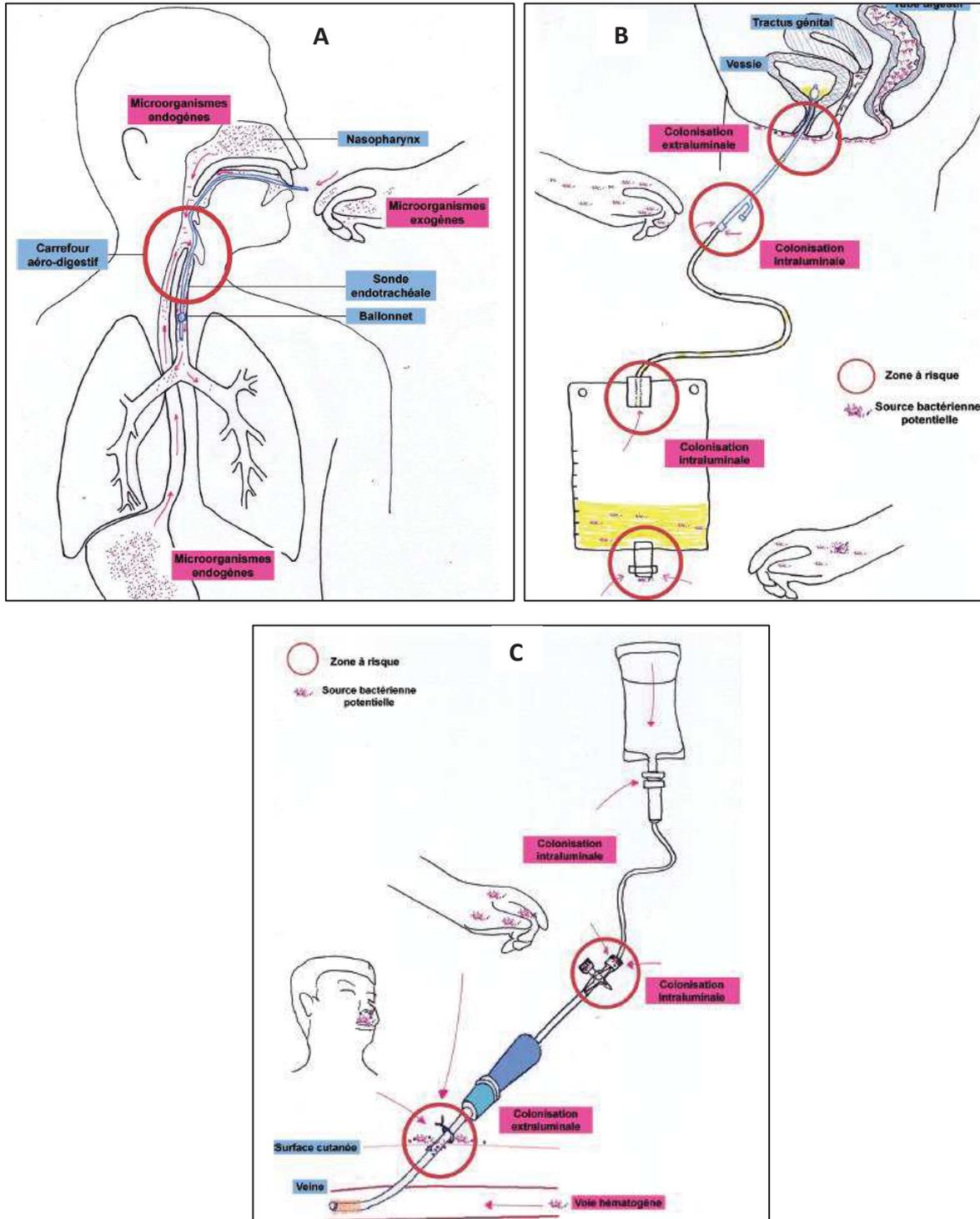
### 3- Soins à risques et bonnes pratiques

Les patients les plus vulnérables sont les plus à même de contracter une IAS (Wang et al. 2017a). La majorité de ces patients sont hospitalisés dans des services de réanimation (prévalence d'IN de 27,31%) ou des services de chirurgie (prévalence d'IN de 7,89%) (SF2H 2018a). Les soins dispensés à ces patients impliquent l'utilisation de nombreux dispositifs médicaux (DM). La pose et le maintien des DM comme des sondes urinaires, des cathéters veineux, des canules d'intubations... sont des facteurs de risque d'acquisition d'IN. Par exemple, la récente revue de littérature de Mermel et al. (2017) a estimé que les cathéters veineux périphériques (CVP) étaient responsables de 22% des bactériémies sur cathéters, entraînant dans 0,18% des cas une bactériémie (Mermel et al. 2017). Ces DM peuvent ainsi être la porte d'entrée de microorganismes et/ou des sites où se maintiennent les

microorganismes notamment sous forme de biofilm (Ebrey et *al.* 2004). Ces IN liées aux DM suivent la même physiopathologie : l'infection peut être d'origine endogène ou exogène. Cette origine exogène est liée directement à la contamination via la manipulation du DM.

Les différentes voies de contamination susceptibles d'entraîner une IAS lors de l'utilisation de DM sont schématisées dans la figure 5 (Espinasse et *al.* 2010).

Afin de limiter les IN liées aux pratiques de soins, des mesures peuvent être mises en place sous forme de « bundle » correspondant un ensemble de pratiques adoptées lors de la prise en charge d'un patient pour limiter le risque d'IAS. Ces pratiques sont basées sur des recommandations scientifiques et leur mise en œuvre permet de réduire le risque d'IAS. Parmi ces mesures, on retrouve par exemple pour la prévention des infections liées aux cathéters : l'éducation des soignants, la durée de maintien du cathéter (Mestre et *al.* 2013) ; ou pour la prévention des pneumopathies : l'élévation de la tête du lit, les bains de bouche à la chlorhexidine ... (Rello et *al.* 2010) (Alecrim et *al.* 2019).



**Figure 5:** Principales voies d'acquisition de microorganismes lors d'une intubation endotrachéale (A), lors d'un sondage vésical (B), et avec un cathéter vasculaire (C) (Espinasse et al. 2010)

## C- Risque nosocomial lié à l'environnement hospitalier et sa maîtrise

L'importance de la contamination de l'environnement dans le risque infectieux a été mise en lumière dès 1867 par Joseph Lister au bloc opératoire. En effet, J. Lister est captivé par les travaux de Louis Pasteur sur la fermentation de la bière et du vin. Il suspecte la présence de microorganismes dans les plaies opératoires en faisant l'observation que les fractures fermées s'infectent peu et cicatrisent bien alors que les fractures ouvertes gangrènent et sont souvent d'évolution fatale pour les patients. Il propose alors de disperser autour de la table opératoire des aérosols d'eau phéniquée, qui entraînent l'asepsie de l'air et auront non seulement un impact préventif mais aussi curatif sur les infections de plaies opératoires (Pitt et al. 2012) (Lister 1867).

### 1- L'environnement hospitalier : un réservoir de bactéries

Actuellement, la part de l'environnement comme réservoir (habitat où se multiplient et persistent les microorganismes) ou relais de la transmission d'IAS est de plus en plus étudiée (Weber et al. 2010) (de Oliveira et Damasceno 2010) (Kanamori et al. 2017) (Decraene et al. 2018). Selon le type d'habitat et l'espèce bactérienne, la persistance dans l'environnement hospitalier peut être très longue, allant jusqu'à plus de 30 mois pour *Klebsiella* spp. sur des surfaces sèches (Kramer et al. 2006). Cette revue de la littérature de Kramer et al. 2006, est une méta-analyse non standardisée et se base sur plusieurs études réalisées de façon totalement différentes. Certaines ont déterminé la survie des microorganismes *in vitro*, d'autres se basent sur des observations aléatoires lors d'épidémies d'origine environnementale. Afin d'avoir une idée juste de la durée de survie des microorganismes, il serait intéressant de réaliser une étude complète, *in vitro* sur différents matériaux et de mesurer la survie des bactéries dans l'environnement de façon standardisée.

Il a été démontré que l'hospitalisation d'un patient dans une chambre précédemment occupée par un autre patient porteur ou infecté par une bactérie multi-résistante (BMR) était un facteur de risque d'acquisition de cette BMR (Ajao et al. 2013) (Nseir et al. 2011). Il s'agit là de la preuve indirecte de la persistance des agents d'IAS dans l'environnement hospitalier. Ce risque varie d'une espèce à l'autre, par exemple il est de 4,53 pour les *A. baumannii* (risque le plus élevé) et de 2,3 pour *P. aeruginosa* (Mitchell et al. 2015) (Cohen et al. 2017) (Wu et al. 2019a). Pour les EBLSE, il y a un risque 1,39 fois plus important pour un

patient d'acquérir la bactérie lorsqu'il est hospitalisé dans une chambre précédemment occupée par un patient porteur de cette bactérie. Dans 18% des cas, le patient a acquis la même souche (comparaison réalisée par typage moléculaire) que celle colonisant le patient ayant précédemment occupé sa chambre (Ajao et al. 2013).

Des BGN résistants aux antibiotiques comme des BMR ou BHRé ont été isolés sur des surfaces humides et sèches de l'environnement hospitalier et identifiés comme un réservoir de la transmission de pathogènes (Pantel et al. 2016) (Clarivet et al. 2016) (De Geyter et al. 2017) (Regev-Yochay et al. 2018). Le risque d'acquisition d'IAS pour les patients est plus important lorsque des surfaces proches sont contaminées (Lerner et al. 2013) (Parer et al. 2012).

## 2-L'environnement hospitalier : une source d'épidémies

Des phénomènes épidémiques ont été décrits suite à la persistance de ces bactéries dans des réservoirs environnementaux correspondant à des surfaces sèches ou humides tels que des siphons (Clarivet et al. 2016), des robinets (Umezawa et al. 2015), des objets relais, comme par exemple des distributeurs de savon doux (Archibald et al. 1997) ou du matériel médical comme des capteurs de saturation pulsée en oxygène (SpO2) (Parer et al. 2012), des matelas à air (Asai et al. 2014), des incubateurs (Cadot et al. 2019) ou des endoscopes (Ross et al. 2015) (Kanamori et al. 2017) (Sorbets et al. 2019). Ainsi un quart des épidémies aurait une origine environnementale, comme le démontre l'étude de Vonberg et al. (2011) qui a analysé la base de données « Worldwide Database for Nosocomial Outbreaks ». Cette base de données regroupe uniquement des articles publiés qui décrivent des phénomènes épidémiques qui ont eu lieu à l'hôpital. Ils ont analysé l'origine de 2 322 épidémies nosocomiales et les ont classées en 8 catégories d'origines différentes : le patient, l'environnement, le personnel médical, les dispositifs médicaux, les médicaments, la nourriture, les objets relais dédiés aux soins des patients et l'origine non connue. Les épidémies d'origine environnementale regroupent 3 catégories : l'environnement (11,7% des épidémies), les dispositifs médicaux (9,2%) et les objets relais dédiés aux soins des patients (1,6%). Ainsi dans 22,5 % des cas, l'environnement a été identifié comme la source de l'épidémie (Vonberg et al. 2011).

### 3- Transmission nosocomiale liée aux niches technologiques et à l'artificialisation des milieux

La médecine n'a cessé de progresser, en partie grâce à la technologie. Cette dernière, qui va du service d'approvisionnement en eau sécurisé, au traitement d'air, à l'entretien des surfaces et aux dispositifs médicaux de plus en plus sophistiqués, engendre de nouveaux réservoirs où des microorganismes peuvent proliférer, persister et évoluer jusqu'à présenter un risque infectieux.

Une revue de la littérature, présentée dans l'**article 1**, décrit ce phénomène et les questions que l'hôpital devrait se poser avant tous travaux ou toute acquisition d'une nouvelle technologie afin de maîtriser le risque infectieux.

**Article 1: Premises Plumbing and Wet Technological Niches as Sources of Healthcare-Associated Infections in Hospital**  
Baranovsky S. , Licznar-Fajardo P. , Jumas-Bilak E. and Romano-Bertrand S.  
*EC Microbiology*, Apr 2017;7.6: 192-197.

## Premises Plumbing and Wet Technological Niches as Sources of Healthcare-Associated Infections in Hospital

Sophie Baranovsky<sup>1,2</sup>, Patricia Licznar-Fajardo<sup>1,2</sup>, Estelle Jumas-Bilak<sup>1,2</sup> and Sara Romano-Bertrand<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Healthcare Infection Prevention Department, University Hospital of Montpellier, 80 Avenue Augustin Fliche, Montpellier, France

<sup>2</sup>Research Team "Hydric Pathogens, Health and Environments" UMR5569, University of Montpellier, 15 Avenue Charles Flahault, Montpellier, France

\*Corresponding Author: Sara Romano-Bertrand, Research Team "Hydric Pathogens, Health and Environments" UMR5569, University of Montpellier, 15 Avenue Charles Flahault, Montpellier, France.

Received: April 13, 2017; Published: April 24, 2017

### Abstract

This short review points the importance of the hospital environment and particularly the technological niches more and more present in hospital wards as sources of healthcare-associated infections. The evolution of the medicine thanks to new technologies and medical devices permits to save more patient's lives but the counterpart is the creation of new niches that favor the emergence, the persistence and the transmission of pathogens. Thus, before building new wards and acquiring new medical devices at hospital, we must interrogate the associated infectious risk and provide protocols to control it.

**Keywords:** Healthcare-Associated Infection; Multi-Drug Resistant Bacteria; Water Networks; *Pseudomonas Aeruginosa*; Technological Niches

### Abbreviations

HAI: Healthcare-Associated Infections; MDR: Multi-Drug Resistant; OPPPs: Opportunistic Premise Plumbing Pathogens; SSI: Surgical Site Infection; XDR: Extensively-Drug Resistant

### Introduction

In hospital, care environment has markedly changed during the last decades. The buildings, wards and medical devices tend to become high-tech systems, more and more effective to improve the lives' saving. The prevention of Healthcare-associated infections (HAI) should evolve accordingly. Among the major bacteria involved in HAI, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*, and *Acinetobacter baumannii* are human-associated bacteria that become pathogens under certain conditions. Other major HAI agents are *Pseudomonas aeruginosa* and its relatives such as *Stenotrophomonas maltophilia*. Their genuine habitat is aquatic environment and when they transiently colonize patients, they can cause serious HAIs. *Legionella pneumophila* and non-tuberculous mycobacteria are environmental specialists, which occasionally cause HAIs directly from environment without previous patient's microbiota colonization.

HAIs are frequently severe (bacteraemia, surgical site infections (SSI) or pneumonia) and lead to heavy treatments due to the frequent occurrence of multidrug resistant (MDR) and extensively-drug resistant (XDR) bacteria in HAIs. HAI agents are able to epidemic spread sometimes causing major hospital outbreaks. Therefore, prevention and control of HAI remain major concerns in the worldwide healthcare policies. After decades of *S. aureus* threat, this bacterium is controlled when preventive measures mostly based on standard hygiene precautions, hand hygiene in front line, are applied [1]. By contrast, MDR and XDR *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* emerge currently in hospital context and are responsible of long-time and large-expended outbreaks. Most of these bacteria inhabit (for *P. aeruginosa*) or can persist (for *Enterobacteriaceae* and *A. baumannii*) in the hospital environments, mainly in aquatic and moist environment [2-5].

**Citation:** Sophie Baranovsky, et al. "Premises Plumbing and Wet Technological Niches as Sources of Healthcare-Associated Infections in Hospital". *EC Microbiology* 7.6 (2017): 192-197.

Beside standard hygiene precautions, the environment should be considered as an amplificatory reservoir fully involved in the epidemiological cycle of HAI outbreaks [6-8]. This minireview aims to present some apposite examples giving insights into the role of premises plumbing and wet technological niches as reservoir and source of HAIs.

### **Opportunistic premises plumbing pathogens in hospital water networks**

Increasing complexity of water networks in hospital buildings creates niches for Opportunistic Premises Plumbing Pathogens (OPPPs) such as *P. aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, or non-tuberculous mycobacteria. OPPPs of water network are at the origin of severe infection and outbreaks like peripheral venous catheter and bloodstream *P. aeruginosa* infection [9,10], *Mycobacterium avium* pulmonary disease [11], or outbreak of Legionnaires' disease [12]. Indeed, lot of water treatment systems such as water softeners, osmose-systems, biocide injectors and filtration systems disrupt the water flow and favor biofilm formation that can cause the retrograde contamination of the water network. It is also the case for changes in ward usage that can lead to pipes containing dead waters. Plumbing systems at water point-of-use such as electronic sensor taps, or faucet aerators, also constitute niches for OPPPs [5,13-16]. To prevent HAI, it is recommended to limit technological niches by the construction of simple networks that allows water flowing as freely as possible and to circularize pipes in small closed systems in order to facilitate biocide decontamination. Complex faucets with electronic sensors should be avoided and replaced by simpler systems such as elbow or knee operated faucet [13]. Facing persistent water network contamination, antimicrobial filter placed onto faucets or showers is necessary to control the water quality and to prevent water-borne HAI [9,17,18].

### **Medical devices as reservoir for pathogenic bacteria responsible for HAIs**

The control of microorganisms in hospital environment enforces the survey of technological niches mostly when associated to water, and the prevention of the formation of biofilm, which is a major reservoir for pathogenic bacteria. Beside critical and semi-critical medical devices that enter in sterile tissues or in contact with mucosa such as endoscopes, lot of machines containing water lines or reservoir are placed near the patients and are considered as non-critical devices according to the Spaulding classification [19]. For instances, heater-cooler units for extra-corporal circulation, dialysis machines, dental units and various systems need water for their use or their disinfection. These water-containing non-critical devices form technological niches particularly problematic to manage because they are usually composed of complex systems of tubes and tanks, favoring the biofilm formation and not easy-to-access for their disinfection [20,21]. If the water is contaminated, the transmission of bacteria can occur by direct contact or by aerosolization. Several studies report cardiac SSIs and outbreaks of SSIs, caused by *Mycobacterium chimaera*, related to contaminated heater-cooler units for extra-corporal circulation [22-24]. The dental care unit waterlines are reported as technological niches, because of their complexity leading to the biofilm formation and constituting a reservoir for OPPPs such as *P. aeruginosa* and *Achromobacter* sp., [25] *Legionella* sp. and non-tuberculosis mycobacteria [26,27].

Different HAIs due to technological niches led to the improvement of the disinfection process and the microbiological control of devices. For instance, the revision of the management of heater-cooler units for extra-corporal circulation led to an increased frequency of water change and decontamination according to an improved protocol based on the use of recommended biocides as well as the implementation of monthly microbiological controls of the tank water.

### **Role of hospital moist and wet surfaces in HAIs**

Bacteria can persist during months on inanimate surfaces which can be considered as a reservoir for outbreaks of HAI [28]. The persistence of the bacteria onto surfaces depends on the type of surface and the bacterial species and it can be very long, from 1 day to 4.5 years [28]. Moreover, several parameters including humid conditions, low temperature and high inoculum promote the persistence of bacteria [29]. The hospital environment is mostly contaminated by pathogenic bacteria and several studies show that resistant bacteria preferentially contaminate the surfaces surrounding the patient, which are touched by the patient or care workers. These surfaces became moist or humid due to the skin maceration like the bed and mattress surfaces, the oxygen masks, the SpO<sub>2</sub> sensors [30-34].

The risk of acquiring bacteria is higher when a patient is admitted into a room previously occupied by an infected patient [35-37]. For example, blaOXA-51-like- and blaOXA-66 *A. baumannii* ST208 contaminated an air fluidized bed during 1.5 year and was responsible of an outbreak of seven patients [38]. Reservoirs of glycopeptide-intermediate *S. aureus* in SpO<sub>2</sub> sensors sustained a 5-months outbreak that has been controlled by improving the decontamination of the SpO<sub>2</sub> sensors [34]. Others studies report that persistence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* until one year within U-bend led to the transmission among patients of these XDR bacteria. The simple change of the U-bend led to the outbreak control [4,38-40].

### Conclusion

This review points the importance of infectious risk assessment and microbiological control of the hospital environment. The technological niches associated to complex and invasive cares need a particular intention because they constitute potential reservoirs for pathogens responsible for HAIs and HAIs outbreaks.

When a new ward is built, several points about the premises plumbing should be questioned: Does the new water network create complex technological niches? Will each water points-of-use be necessary and used regularly? Are water treatment systems needed? Which points should be checked and at which frequency?

When the hospital buys a new medical device, the infectious risk linked to the new device must be evaluated in order to provide immediately human and technical resources for their surveillance, maintenance, decontamination and microbiological controls as well as precisely written up-to-date protocols. This is particularly true for non-critical medical devices, which are not submitted to strict regulations. The main questions in front of a new non-critical medical device entering a hospital are: Does the device contain water or have an irrigation system? Are main parts of the device suitable for disinfection? How to process the disinfection? What are the appropriated frequencies and methods for decontamination and microbiological control?

### Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

### Bibliography

1. Pittet D., *et al.* "Effectiveness of a Hospital-Wide Programme to Improve Compliance with Hand Hygiene. Infection Control Programme". *Lancet (London, England)* 356.9238 (2000): 1307-1312.
2. Bédard Emilie., *et al.* "Pseudomonas Aeruginosa in Premise Plumbing of Large Buildings". *MicrobiologyOpen* 5.6 (2016): 937-956.
3. Zhou ZhaoYan., *et al.* "Sources of Sporadic Pseudomonas Aeruginosa Colonizations/Infections in Surgical ICUs: Association with Contaminated Sink Trap". *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy* 22.7 (2016): 450-455.
4. De Geyter Deborah., *et al.* "The Sink as a Potential Source of Transmission of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in the Intensive Care Unit". *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 6 (2017): 24.
5. Umezawa Kazuo., *et al.* "Outbreak of Drug-Resistant Acinetobacter Baumannii ST219 Caused by Oral Care Using Tap Water from Contaminated Hand Hygiene Sinks as a Reservoir". *American Journal of Infection Control* 43.11 (2015): 1249-1251.
6. Boyce John M. "Environmental Contamination Makes an Important Contribution to Hospital Infection". *The Journal of Hospital Infection* 65.2 (2007): 50-54.
7. Weber David J., *et al.* "The Role of the Surface Environment in Healthcare-Associated Infections". *Current Opinion in Infectious Diseases* 26.4 (2013): 338-344.

8. de Oliveira, *et al.* "[Surfaces of the hospital environment as possible deposits of resistant bacteria: a review]". *Revista Da Escola De Enfermagem Da U S P* 44.4 (2010): 1118-1123.
9. Romano Sara, *et al.* "Peripheral Venous Catheter and Bloodstream Infection Caused by *Pseudomonas Aeruginosa* after a Contaminated Preoperative Shower". *Infection Control and Hospital Epidemiology* 34.5 (2013): 544-546.
10. Loveday HP, *et al.* "Association between Healthcare Water Systems and *Pseudomonas Aeruginosa* Infections: A Rapid Systematic Review". *The Journal of Hospital Infection* 86.1 (2014): 7-15.
11. Falkinham Joseph O., *et al.* "Mycobacterium Avium in a Shower Linked to Pulmonary Disease". *Journal of Water and Health* 6.2 (2008): 209-213.
12. Francois Watkins Louise K, *et al.* "Lessons From an Outbreak of Legionnaires" Disease on a Hematology-Oncology Unit". *Infection Control and Hospital Epidemiology* 38.3 (2017): 306-313.
13. Yapicioglu Hacer, *et al.* "Pseudomonas Aeruginosa Infections due to Electronic Faucets in a Neonatal Intensive Care Unit". *Journal of Paediatrics and Child Health* 48.5 (2012): 430-434.
14. Walker JT, *et al.* "Investigation of Healthcare-Acquired Infections Associated with *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms in Taps in Neonatal Units in Northern Ireland". *Journal of Hospital Infection* 86.1 (2014): 16-23.
15. Rogues AM, *et al.* "Contribution of Tap Water to Patient Colonisation with *Pseudomonas Aeruginosa* in a Medical Intensive Care Unit". *The Journal of Hospital Infection* 67.1 (2007): 72-78.
16. Weber DJ, *et al.* "Faucet Aerators: A Source of Patient Colonization with *Stenotrophomonas Maltophilia*". *American Journal of Infection Control* 27.1 (1999): 59-63.
17. Aumeran C, *et al.* "Pseudomonas Aeruginosa and Pseudomonas Putida Outbreak Associated with Contaminated Water Outlets in an Oncohaematology Paediatric Unit". *The Journal of Hospital Infection* 65.1 (2007): 47-53.
18. Teare L and S Millership. "Legionella Pneumophila Serogroup 1 in a Birthing Pool". *The Journal of Hospital Infection* 82.1 (2012): 58-60.
19. McDonnell G and P Burke. "Disinfection: Is It Time to Reconsider Spaulding?" *The Journal of Hospital Infection* 78.3 (2011): 163-170.
20. Guimarães Thaís, *et al.* "Pseudooutbreak of Rapidly Growing Mycobacteria due to *Mycobacterium Abscessus* Subsp *Bolletii* in a Digestive and Respiratory Endoscopy Unit Caused by the Same Clone as that of a Countrywide Outbreak". *American Journal of Infection Control* 44.11 (2016): e221-e226.
21. Jørgensen SB, *et al.* "Heat-Resistant, Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* in Endoscope-Mediated Outbreak". *The Journal of Hospital Infection* 93.1 (2016): 57-62.
22. Haller Sebastian, *et al.* "Contamination during Production of Heater-Cooler Units by *Mycobacterium Chimaera* Potential Cause for Invasive Cardiovascular Infections: Results of an Outbreak Investigation in Germany, April 2015 to February 2016". *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 21.17 (2016).
23. Cai Yi, *et al.* "Mycobacterium Infection from a Cardiopulmonary Bypass Heater-Cooler Unit in a Patient with Steroid-Induced Immunosuppression". *Canadian Journal of Anaesthesia* 64.5 (2016): 513-516.

24. Dupont C., et al. "Source-Case Investigation of Mycobacterium Wolinskyi Cardiac Surgical Site Infection". *The Journal of Hospital Infection* 93.3 (2016): 235-239.
25. Abdouchakour Fatima., et al. "Pseudomonas Aeruginosa and Achromobacter Sp. Clonal Selection Leads to Successive Waves of Contamination of Water in Dental Care Units". *Applied and Environmental Microbiology* 81.21 (2015): 7509-7524.
26. Dutil Steve., et al. "Aerosolization of Mycobacteria and Legionellae during Dental Treatment: Low Exposure despite Dental Unit Contamination". *Environmental Microbiology* 9.11 (2007): 2836-2843.
27. Schulze-Röbbecke R., et al. "Dental Units: An Environmental Study of Sources of Potentially Pathogenic Mycobacteria". *Tubercle and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* 76.4 (1995): 318-323.
28. Kramer Axel., et al. "How Long Do Nosocomial Pathogens Persist on Inanimate Surfaces? A Systematic Review". *BMC Infectious Diseases* 6.1 (2006): 130.
29. Lemmen SW., et al. "Distribution of Multi-Resistant Gram-Negative versus Gram-Positive Bacteria in the Hospital Inanimate Environment". *The Journal of Hospital Infection* 56.3 (2004): 191-197.
30. Lerner A., et al. "Environmental Contamination by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae". *Journal of Clinical Microbiology* 51.1 (2013): 177-181.
31. Dancer, Stephanie J. "Importance of the Environment in Meticillin-Resistant Staphylococcus Aureus Acquisition: The Case for Hospital Cleaning". *The Lancet Infectious Diseases* 8.2 (2008): 101-113.
32. Tajeddin Elahe., et al. "The Role of the Intensive Care Unit Environment and Health-Care Workers in the Transmission of Bacteria Associated with Hospital Acquired Infections". *Journal of Infection and Public Health* 9.1 (2016): 13-23.
33. Yu Monica., et al. "Crib Mattress Investigation: A Quality Improvement Study to Assess Mattress Cover Permeability and Bacterial Growth in Crib Mattresses". *American Journal of Infection Control* 44.7 (2016): 837-839.
34. Parer Sylvie., et al. "An Outbreak of Heterogeneous Glycopeptide-Intermediate Staphylococcus Aureus Related to a Device Source in an Intensive Care Unit". *Infection Control and Hospital Epidemiology* 33.2 (2012): 167-174.
35. Nseir S., et al. "Risk of Acquiring Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli from Prior Room Occupants in the Intensive Care Unit". *Clinical Microbiology and Infection* 17.8 (2011): 1201-1208.
36. Ajao Adebola O., et al. "Risk of Acquiring Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Klebsiella Species and Escherichia Coli from Prior Room Occupants in the Intensive Care Unit". *Infection Control and Hospital Epidemiology* 34.5 (2013): 453-458.
37. Huang Susan S., et al. "Risk of Acquiring Antibiotic-Resistant Bacteria from Prior Room Occupants". *Archives of Internal Medicine* 166.18 (2006): 1945-1951.
38. Asai Satomi., et al. "An Outbreak of blaOXA-51-like- and blaOXA-66-Positive Acinetobacter Baumannii ST208 in the Emergency Intensive Care Unit". *Journal of Medical Microbiology* 63.11 (2014): 1517-1523.
39. Pantel Alix., et al. "Environmental Persistence of OXA-48-Producing Klebsiella Pneumoniae in a French Intensive Care Unit". *American Journal of Infection Control* 44.3 (2015): 366-368.

40. Clarivet Béatrice., *et al.* "Persisting Transmission of Carbapenemase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* due to an Environmental Reservoir in a University Hospital, France, 2012 to 2014". *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 21.17 (2016).

**Volume 7 Issue 6 April 2017**

**© All rights are reserved by Sophie Baranovsky., *et al.***

#### 4- Les moyens de maîtrise du risque environnemental

Des mesures particulières sont mises en place afin de lutter contre les IAS d'origine environnementale dans les services accueillant les patients les plus à risques d'infection comme par exemple les services où sont hospitalisés les patient greffés, les blocs opératoires ou les services ayant une activité nécessitant une maîtrise de la contamination microbiologique de l'environnement comme par exemple les services de stérilisation ou les préparatoires pharmaceutiques. Parmi ces mesures, on retrouve la maîtrise de la contamination de l'air avec, par exemple, les centrales de traitement d'air (CTA) et la suppression de certaines zones, la maîtrise de la contamination de l'eau avec, par exemple, la pose de filtres anti-microbiens sur les points d'eau, l'entretien des surfaces avec son renouvellement plusieurs fois par jour, le contrôle microbiologique de l'environnement et une attention particulière aux respect des PS et des PC (SF2H 2016) (SF2H 2018b) (EBMT 2018).

Afin de maîtriser l'aérobiocontamination, la qualité de l'air suit des normes définies selon des seuils maximaux de contamination particulaire (ISO 14644-1 et 2) et de contamination microbiologique (NFS 90-351 et ISO 14698-1 et -2). Le traitement de l'air est réalisé par filtration avec des CTA composées d'une succession de filtres dont un filtre terminal HEPA (filtre absolu). La technologie mise en place peut influencer directement le risque d'IAS. A titre d'exemple, le traitement d'air par flux unidirectionnel (flux laminaire) est préférable au flux non-unidirectionnel (flux turbulent) (Bosanquet et *al.* 2013). Une étude incluant 170 opérations de chirurgie vasculaire montre un risque d'infection du site opératoire (ISO) 4,02 fois supérieur pour les patients opérés dans un bloc avec un flux non-unidirectionnel par rapport à ceux opérés dans bloc avec un flux unidirectionnel (Bosanquet et *al.* 2013). L'évaluation du risque d'IAS lié à l'environnement hospitalier fait souvent l'objet de controverses car les études publiées sont souvent peu robustes. L'avantage du flux unidirectionnel dans la prévention des ISO est ainsi régulièrement remis en question (Barbadoro et *al.* 2016) (Bischoff et *al.* 2017). Mais ces études présentent de nombreux biais méthodologiques (Jutte et *al.* 2017). De plus, afin de protéger la zone la plus à risque, le principe de l'asepsie progressive est mis en place : des surpressions successives d'environ 15 Pascals entre différentes zones constituent une barrière physique à l'entrée d'air dont le rôle

est de réduire l'introduction de microorganismes dans la zone à protéger. Mais ces systèmes de maîtrise de la qualité de l'air peuvent en pratique être défaillants (panne, conditions climatiques particulières, travaux) et l'air des pièces normalement traité peut être contaminé et engendrer des infections ou des épidémies chez les patients hospitalisés (Lutz et al. 2003) (Edmiston et al. 2005) (Napoli et al. 2012).

Afin de maîtriser la contamination de l'eau dans les services, plusieurs méthodes peuvent être utilisées visant à réduire les microorganismes naturellement présents dans l'eau comme *P. aeruginosa* et *L. pneumophila* : la température du réseau d'eau peut être augmentée pour produire un choc thermique, des produits désinfectants comme des produits chlorés ou oxygénés peuvent être introduits dans le réseau d'eau, ou des méthodes sans produits chimiques comme l'ionisation cuivre-argent, la lumière UV ou l'ozonation peuvent être utilisées (Cervia et al. 2008). Mais ces différentes méthodes ont une efficacité de courte durée et peuvent nécessiter une maintenance lourde (Cervia et al. 2010). De plus, ces méthodes ayant pour objectif de réduire une population bactérienne au sein des canalisations d'eau peuvent en faire émerger une autre résistante au traitement utilisé (Abdouchakour et al. 2015). Une autre méthode permettant de maîtriser la contamination de l'eau est de placer des filtres antimicrobiens sur les points d'eau. Plusieurs études ont pu montrer l'efficacité de ces filtres antimicrobiens constituant une barrière physique absolue lorsqu'ils sont utilisés correctement (Trautmann et al. 2008) (Cervia et al. 2010) (Warris et al. 2010). La mise en place de filtres antimicrobiens a aussi permis de mettre fin à des épidémies (Barna et al. 2014) (Bicking et al. 2017). En pratique, ces filtres antimicrobiens utilisés dans des services en activité peuvent être défaillants : ils peuvent notamment être saturés si la fréquence de changement n'est pas respectée, être contaminés par contact avec les mains ou par projection, ou être mal positionnés.

Les surfaces de l'environnement hospitalier sont classiquement décontaminées par des détergents-désinfectants. Le choix des produits désinfectants doit toujours être une balance entre efficacité, la toxicité pour l'agent et le patient, la compatibilité avec le matériel entretenu et l'écotoxicité. Ainsi, dans certaines situations particulières comme la nécessité d'éliminer des microorganismes sporulants, il est nécessaire d'utiliser des produits sporicides

comme par exemple l'eau de Javel (Orenstein et *al.* 2011) ou les dérivés oxygénés à forte concentration.

Afin de réaliser une décontamination des surfaces, un autre paramètre est à prendre en compte : l'accessibilité de la surface. Ainsi, une désinfection des surfaces par voie aérienne (DSVA) est possible grâce à la dispersion dans l'air de désinfectant qui se déposera sous forme de microgouttelettes sur les surfaces. Le produit le plus utilisé par ce type de dispositif est le peroxyde d'hydrogène. Ainsi, plusieurs études ont pu montrer que l'entretien des surfaces hospitalières comme les dispositifs médicaux, les objets relais et les surfaces du service et des chambres permettait de réduire le taux d'IAS (Goodman et *al.* 2008) (Dancer et *al.* 2009) (Donskey 2013) (Li et *al.* 2017). Par exemple, lors de la relocalisation d'un service de néonatalogie avec révision des pratiques d'entretien de l'environnement, le taux de contamination des surfaces par SARM a significativement diminué de 44% à 2,5% ( $p < 0.001$ ) et le taux d'IAS a significativement diminué de 16.8 pour 1000 jours d'hospitalisation à 10.0 pour 1000 jours d'hospitalisation ( $p < 0.001$ ) (Li et *al.* 2017). La révision des pratiques d'entretien concernait la désinfection des objet relais avec des lingettes désinfectantes jetables au lieu de l'eau de Javel et la désinfection des bandeaux de sol par lavage à 90°C au lieu du trempage dans de l'eau de javel à 0,5%.

Mais plusieurs paramètres peuvent influencer l'efficacité de l'entretien de l'environnement : des facteurs humains, des produits non adaptés, des surfaces non entretenues qui créent un réservoir de microorganismes qui par manuportage contamine les surfaces adjacentes... Ainsi, certaines études, ont pu montrer qu'un entretien régulier mal adapté des surfaces hospitalières pouvait entraîner un taux de contamination de plus de 50% des surfaces de l'hôpital prélevées lors d'un contrôle microbiologique de l'environnement (Querido et *al.* 2019).

## 5- La surveillance microbiologique de l'environnement hospitalier

Surveiller l'environnement hospitalier est un outil de prévention des IAS. Cette surveillance microbiologique de l'environnement permet de mieux connaître l'écologie de la structure de soins et ainsi de détecter des microorganismes présents dans l'environnement de soins pouvant être responsables d'IAS ou de phénomènes épidémiques. Actuellement, il existe une obligation ou des recommandations fortes de surveillance microbiologique de

l'environnement de soins uniquement pour la potabilité de l'eau et la qualité des eaux pour soins standards et bactériologiquement maîtrisées (arrêté du 11 janvier 2007 et du 12 février 2007), la recherche de légionnelles dans l'eau (arrêté du 1<sup>er</sup> février 2010), le traitement des endoscopes (instruction du juillet 2016) et la qualité de l'air dans les blocs opératoires et les zones à activités contrôlées. Les autres mentions sur la surveillance de l'environnement de soins sont soit des normes, soit des recommandations qui donnent une ligne directrice à suivre à l'établissement de santé (ES) sans obligation d'application et d'accréditation (CCLIN Sud-Ouest 2016). Face à ce flou réglementaire, les ES doivent selon leur appréciation et leur connaissance de l'écologie de leur structure de soins, réfléchir dans une démarche de qualité aux zones à risques, aux sites de prélèvements, et à la fréquence des analyses afin d'établir leur propre planification de surveillance microbiologique de l'environnement. De plus, il est aussi nécessaire de définir pour les analyses réalisées des valeurs d'alerte cible et la démarche à suivre afin de permettre une restitution des résultats efficaces et homogènes aux services de soins. C'est pour répondre au mieux à ce besoin que le CHU de Montpellier dispose, au sein du département d'hygiène hospitalière (DHH), d'un service dédié à la surveillance microbiologique de l'environnement : le laboratoire d'écologie microbienne hospitalière (LEMH). Les programmes des contrôles microbiologiques définissant les fréquences et les modalités de ces contrôles font l'objet d'une proposition du LEMH et d'une validation en CLIN (Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales) de l'établissement, et sont basés sur une évaluation et une cartographie institutionnelle des risques. Ces contrôles microbiologiques permettent de mieux connaître l'écologie de la structure de soins et ainsi de détecter des microorganismes présents dans l'environnement de soins pouvant être responsables d'IAS ou de phénomènes épidémiques.

En ce qui concerne les surfaces hospitalières, il n'existe pas de texte réglementaire pour leur surveillance microbiologique dans les établissements de santé (ES). La stratégie de contrôle des surfaces s'appuie sur des normes (NF S90-351 (2013), NF EN ISO 14698-1 (2004)), des recommandations de sociétés savantes (AFS 2005) (SF2H 2018b) ou des guides de bonnes pratiques (BPPH 2001) (AFSSPS 2010) (CCLIN Sud-Ouest 2016). Dans ces guides de bonnes pratiques, la réalisation des prélèvements de surfaces est recommandée pour des services ciblés comme les blocs opératoires, les services de stérilisation (BPPH 2001), les unités de

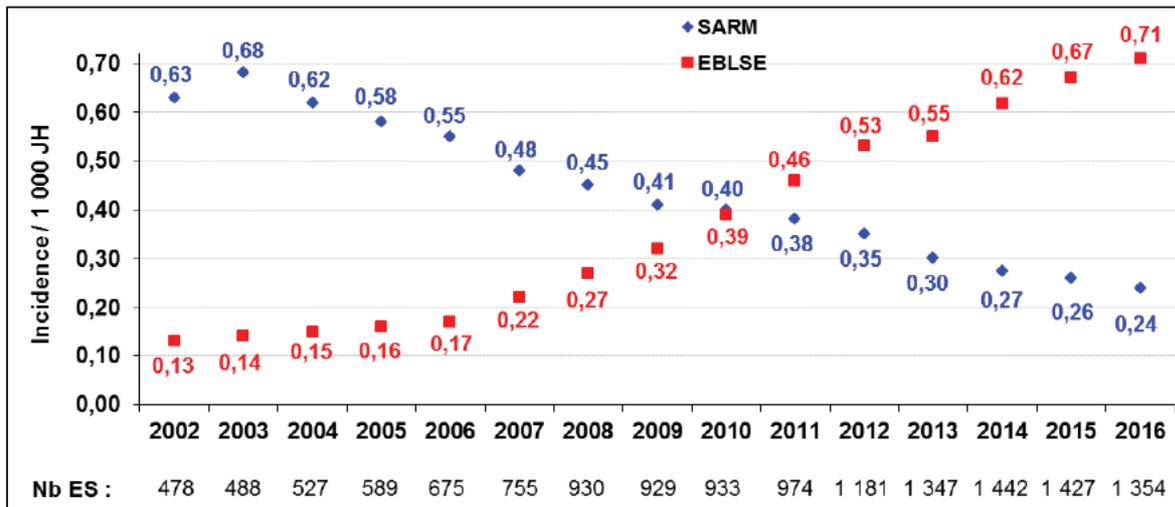
thérapie cellulaire (AFSSPS 2010) ou les services les plus à risques présentant des zones à environnement maîtrisé comme les chambres avec traitement d'air (AFSSPS 2010). Des recommandations de fréquence de prélèvements de surfaces ont été données dans le guide des bonnes pratiques du Centre de coordination des comités de lutte contre les infections nosocomiales (CCLIN) du Sud-Ouest en 2016. Ces recommandations se sont appuyées sur la qualification des zones à risques définis par la norme NF S90-351 (2013). Dans cette norme, les locaux sont classés en quatre classes (1 à 4) qui représentent des niveaux de risques du plus faible au plus important. Mais, selon les dernières recommandations de la SF2H de 2018, en routine, hors qualification des zones à environnement maîtrisé comme les blocs opératoires, il est indiqué dans le guide « qu'il est possible de ne pas réaliser de prélèvements de surfaces pour la recherche de bactéries » notamment celles à risque épidémique. Aucune indication de fréquence de prélèvements n'est donnée dans ce guide (SF2H 2018b). Dans les autres pays européens, les prélèvements de surfaces ne sont pas recommandés en routine mais peuvent être utilisés pour la validation de procédures d'entretien (RCPI 2012) (Willis et *al.* 2013) (Tacconelli et *al.* 2014). Il revient donc à chaque ES de décider de son programme de contrôle microbiologique de l'environnement. Cette décision est réalisée de façon pluridisciplinaire avec la validation institutionnelle du CLIN qui impose à l'établissement la politique de santé qui va être mise en place par le Département d'Hygiène Hospitalière (DHH). En revanche, les prélèvements de surfaces ciblés lors de situations épidémiques sont recommandés par plusieurs groupes d'experts en France et en Europe (RCPI 2012) (Willis et *al.* 2013) (Tacconelli et *al.* 2014) (Wilson et *al.* 2016) (CCLIN Sud-Ouest 2016) (SF2H 2018b).

## D- Faits marquants sur l'épidémiologie des bacilles à Gram négatif responsables d'IAS

### 1- Une dynamique : EBLSE versus SARM

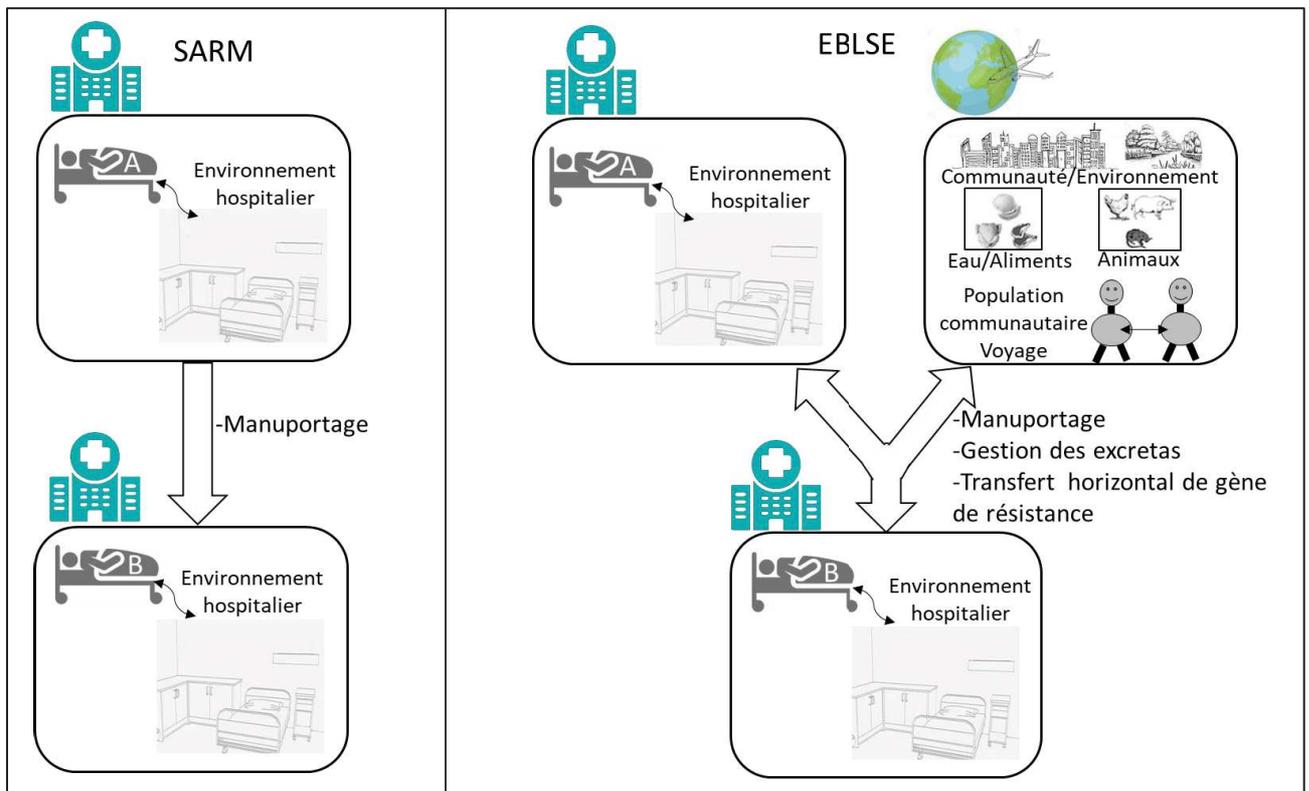
Dans les années 1990 - début 2000, l'émergence des *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) était devenue une préoccupation majeure de santé publique entraînant une sensibilisation du personnel soignant aux mesures d'hygiène hospitalière et particulièrement à la compliance à l'hygiène des mains, permettant de diviser la densité d'incidence des SARM par 2,6 de 2002 à 2016 (Figure 6). La corrélation entre la compliance à l'hygiène des mains et la diminution du taux d'infection à SARM a été ainsi démontrée (Pittet et *al.* 2000). Mais parallèlement, une augmentation des IAS à entérobactéries résistantes aux  $\beta$ -lactamines par production de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (EBLSE) a été observée. La densité d'incidence des EBLSE a été multipliée par 5,4 de 2002 à 2016 (Figure 6). Comme pour le SARM, une étude a montré que la compliance à l'hygiène des mains est aussi corrélée au taux d'incidence des EBLSE ( $p= 0,02$ ) (Kaier et *al.* 2009). Mais, une autre étude, menée en France de 2006 à 2008, a montré que, malgré une compliance à l'hygiène des mains passant de 55.6% à 70.9% ( $p < 0.0001$ ) et l'augmentation de la consommation de la SHA de 8 litres pour 1000 journées d'hospitalisation par an, le taux d'incidence des IN à SARM s'est stabilisé à 0.12 pour 1000 journées d'hospitalisation par an ( $p = 0.87$ ), alors que le taux d'incidence des EBLSE a significativement augmenté de 0.21 à 0.40 pour 1000 journées d'hospitalisation ( $p = 0.04$ ).

Cette étude montre bien que l'hygiène des mains n'est pas suffisante pour lutter contre les IN à EBLSE (Zahar et *al.* 2012).



**Figure 6:** Densités d'incidence par année des *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) et des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (EBLSE) pour 1 000 journées d'hospitalisation de 2002 à 2016. (Nb ES= Nombre d'établissements de santé) (INVS 2018).

Cette dynamique, diminution des IAS à SARM et augmentation des IAS à EBLSE, peut être expliquée par d'autres facteurs comme le mode de dissémination de ces souches résistantes qui est schématisé dans la figure 7.



**Figure 7:** Figure représentant les différents modes de dissémination des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) et des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases spectre étendu (EBLSE). Adaptée de Lucet et al. (2011).

L'émergence des EBLSE en communautaire s'explique par la mondialisation, le voyage en zone endémique étant un facteur de risque d'acquisition des souches EBLSE et l'importation des cas EBLSE de pays endémiques. Une étude suédoise a montré que 24% des voyageurs revenant d'Inde étaient colonisés par des EBLSE à leur retour alors qu'ils étaient négatifs à leur départ (Tängdén et *al.* 2010). Mais l'hospitalisation est aussi un facteur d'acquisition de souches EBLSE permettant leur dissémination. Afin de démontrer cela, plusieurs études se sont intéressées à la transmission d'EBLSE hors situation épidémique (Tschudin-Sutter et *al.* 2012) (Pasricha et *al.* 2013) (Kluytmans-van den Bergh et *al.* 2018). Le dépistage du portage d'EBLSE chez 1072 patients à l'admission dans un CHU à Genève et chez 473 patients à leur sortie montre que 4,8% des patients étaient porteurs à l'entrée et 4,4 % des patients ont été contaminés pendant leur hospitalisation. 75,6 % des EBLSE acquises à l'hôpital étaient des *E. coli*. Les facteurs de risque d'acquisition d'EBLSE étaient un traitement par une céphalosporine de 1<sup>ère</sup> ou 2<sup>ème</sup> génération (OR 9.25 [2.22-37.82]), un transfert interne dans l'hôpital (OR 6.68 [1.71-26.06]) et une hospitalisation de plus de 21 jours (OR 25.17 [4.18-151.68]) (Pasricha et *al.* 2013). Dans une étude menée dans 14 hôpitaux allemands où les mesures d'hygiène sont respectées, Kluytmans-van den Bergh et *al.* (2018), ont estimé que le risque d'acquisition d'EBLSE est compris entre 2.8 et 3.8 pour 1000 jours d'hospitalisation. Ces différentes études, en plus des différentes épidémies nosocomiales d'EBLSE, montrent que l'hôpital est un contexte favorable à la transmission des EBLSE (Vonberg et *al.* 2011) (Friedrich 2019).

Le succès de diffusion des BLSE tient aux bactéries qui les produisent. Ainsi, des facteurs intrinsèques aux entérobactéries expliquent aussi leur émergence, comme leur capacité à persister dans l'environnement ; c'est le cas de *Klebsiella* spp. qui peut persister plus de 30 mois sur une surface. La pression de sélection des antibiotiques joue également un rôle dans le microbiote des patients et les mécanismes de résistance avec un support génétique mobile, apportent en plus d'une capacité de dissémination, une stabilité de la résistance dans les générations suivantes (Donskey, 2004) (Kramer et *al.* 2006) (Bennett, 2008) (Kaier et *al.* 2009) (Otter et *al.* 2019).

## 2- Le nouvel ennemi : les bactéries productrices de carbapénèmases (BPC)

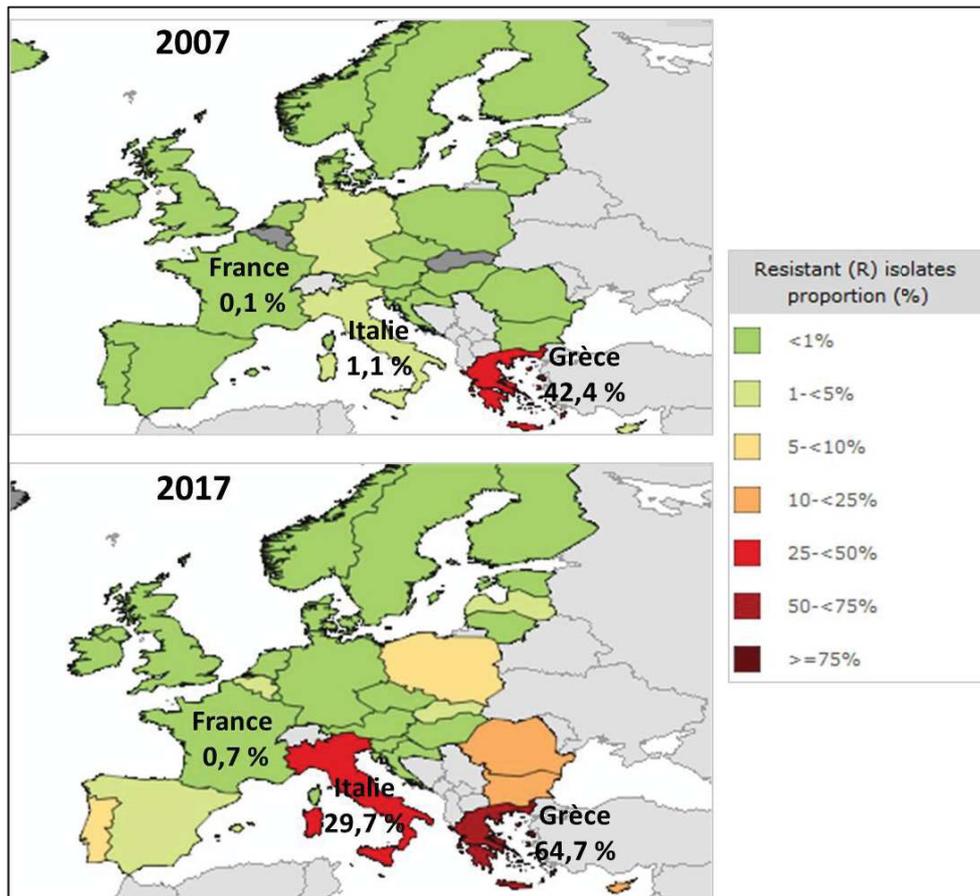
Les carbapénèmes sont des antibiotiques de réserve hospitalière, créés et utilisés pour traiter les infections à microorganismes résistant aux autres antibiotiques comme les infections à EBLSE car les carbapénèmes sont très résistants aux  $\beta$ -lactamases. La première molécule mise sur le marché est l'imipenème en 1985 (Papp-Wallace et *al.* 2011). Depuis, différents mécanismes de résistance aux carbapénèmes ont été observés : la production de  $\beta$ -lactamases capables de dégrader les carbapénèmes (les carbapénèmases), un système de pompe d'efflux, des mutations altérant l'expression et/ou le fonctionnement des porines et des protéines liant les pénicillines (PLPs). La combinaison de ces différents mécanismes entraîne un haut niveau de résistance aux carbapénèmes déjà décrit chez plusieurs bactéries comme les entérobactéries (Mena et *al.* 2006), *P. aeruginosa* (Rodríguez-Martínez et *al.* 2009) et *A. baumannii* (Limansky et *al.* 2002). Les carbapénèmases appartiennent aux 4 classes de la classification d'Amber des  $\beta$ -lactamases. Les plus répandues sont de type KPC (classe A), de type VIM, NDM (classe B) et de type OXA (classe D) (Queenan et Bush 2007).

Selon le Haut Conseil de la santé publique (HCSP), l'émergence des BPC a conduit à la définition française des BHRé, classification qui est assez réductrice concernant la résistance aux carbapénèmes car elle ne comprend que les entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) du fait de leur implantation dans le microbiote digestif, et ne prend pas donc en compte *P. aeruginosa* et *A. baumannii* producteurs de carbapénèmases. Dans ce travail, on préférera utiliser le terme BPC incluant les entérobactéries, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* producteurs de carbapénèmases, comme le recommande l'OMS. A ce titre, l'OMS propose trois acronymes : CRE pour « carbapenem-resistant Enterobacteriaceae », CRAB pour « carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* » et CRPSA pour « carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* » (WHO, 2017).

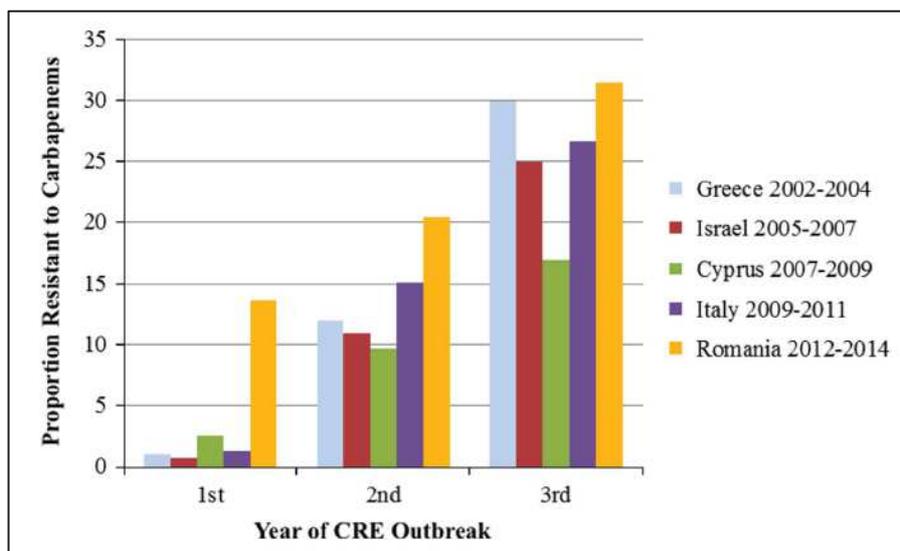
Les premières BCP ont été isolées dans les années 90. Depuis l'on observe une augmentation du nombre de cas d'infections sporadiques et d'épidémies à BPC, entraînant des impasses thérapeutiques (Djahmi et *al.* 2014). Dans les pays développés, l'émergence des BPC a eu lieu à l'hôpital selon ce modèle : un cas sporadique est accueilli dans un service et engendre une épidémie, puis les patients contaminés peuvent être mutés dans un autre hôpital et contaminer d'autres patients tout au long de leur parcours de soins (Grundmann et *al.* 2010). L'épidémiologie des BPC a été bien suivie en Europe, notamment par le « European

Centre for Disease Prevention and Control » (ECDC) qui publie un rapport chaque année sur l'évolution de la diffusion des BPC. L'ECDC met en ligne des cartes interactives qui permettent de suivre l'évolution de ces BPC (Figure 8). Ainsi, de 2007 à 2017, en France, la proportion de *K. pneumoniae* résistant aux carbapénèmes par rapport à *K. pneumoniae* sensible est passée de 0,1 à 0,7% (ECDC, 2017).

La diffusion des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes est très rapide en Europe, comme illustré dans la figure 9, qui représente la diffusion des *K. pneumoniae* résistant aux carbapénèmes dans cinq pays européens, durant les 3 premières années où des épidémies ont été décrites dans le pays. Ainsi, pour la Grèce, la proportion de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes est passée de moins de 2% à 30% entre 2002 et 2004 (Friedman et *al.* 2017). La diffusion de ces BPC est d'autant plus préoccupante que ces bactéries majoritairement isolées en milieu hospitalier ont aussi été isolées en France dans l'environnement aquatique urbain (Almakki et *al.* 2017) et qu'un cas de transmission de l'eau d'une rivière à l'homme lors d'un accident de noyade a aussi été décrit (Laurens et *al.* 2018).



**Figure 8:** Proportion de isolats de *K. pneumoniae* résistant aux carbapénèmes par rapport à *K. pneumoniae* sensible, en Europe en 2007 et 2017, donnée de ECDC « European Centre for Disease Prevention and Control ». Le nombre d'isolats analysés en 2007, pour la France, l'Italie, la Grèce est respectivement de 1037, 360 et 966. Le nombre d'isolats analysés en 2017 pour la France, l'Italie, la Grèce est respectivement de 2807, 2634 et 1363. Adaptée de (ECDC, 2017).



**Figure 9:** Proportion de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes dans 5 pays européens durant les trois premières années des épidémies décrites dans le pays. Le graphique a été construit à partir des données fournies par le « European Centre for Disease Prevention and Control » (Friedman et al. 2017).

Une étude menée dans 36 pays européens au cours de laquelle 2703 souches cliniques d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* ont été analysées, a montré que 1,3 patient pour 10 000 admissions à l'hôpital était positif à *E. coli* ou *K. pneumoniae* producteur de carbapénèmases. L'incidence était plus importante dans les pays méditerranéens et dans les Balkans, avec par exemple une incidence de 5,96 pour 10 000 admissions en Italie, de 5,65 pour le Monténégro et de 0,56 pour l'Allemagne (Grundmann et al. 2017). En France, l'émergence de ces BPC est devenue un réel problème à l'hôpital. Ainsi, certains auteurs ont même considéré en s'appuyant sur une revue de la littérature, que les BPC de type OXA-48 pouvaient être considérées comme endémiques en France (Friedman et al. 2017).

### 3- L'émergence des Pathogènes Résistants Opportunistes de la Plomberie et des Réseaux d'Eaux (PROPREs) ou Opportunistic Premise Plumbing Pathogens (OPPP)

En 1845, alors que les miasmes sont considérés comme responsables des infections, l'épidémiologiste John Snow remet en cause cette théorie et est le premier à démontrer le rôle de l'eau dans la transmission des infections. Il a ainsi mis fin à une épidémie de choléra dans le quartier de Soho à Londres en interdisant l'utilisation d'une fontaine d'eau (Vandenbroucke et al. 1991). Depuis, de nombreux cas d'infections et d'épidémies ont été reliés à des pathogènes majoritairement d'origine fécale, contaminant l'eau et reliés à un cycle de contamination fécale-orale. De nos jours, selon le dernier rapport de l'OMS, 2 milliards de personnes utilisent un point d'eau contaminé par des microorganismes d'origine fécale dans les pays à revenu faible ou intermédiaire, entraînant 502 000 décès par diarrhée par an (OMS 2017b). Dans les pays développés comme la France, le service d'approvisionnement en eau potable est géré en toute sécurité et l'eau est contrôlée et exempte de contamination fécale, tracée par l'absence de bactéries indicatrices d'un risque oro-fécal (*E. coli* et enterocoques thermo-tolérants) (Directive n° 98/83/CE du 03/11/98).

Mais en 1976 à Philadelphie, le 58<sup>ème</sup> congrès de l'« American legion » de 4400 participants, marqua un tournant dans l'histoire des infections d'origine hydrique avec la découverte de la première épidémie de légionellose qui engendra 182 pneumonies dont 34 décès (McDade et al. 1977) (Fraser et al. 1977). En effet, depuis les années 80, des microorganismes

naturellement présents dans l'eau (et non d'origine fécale) ont été incriminés comme responsables d'infections et d'épidémies communautaires et associées aux soins. L'amélioration de la qualité de l'eau avec la désinfection généralisée et la réduction des matières organiques présentes dans l'eau a permis de sélectionner des microorganismes autochtones des systèmes de distribution où ils sont capables de persister et de se multiplier, ces Pathogènes Résistants Opportunistes de la Plomberie et des Réseaux d'Eaux (PROPRES) principalement appelés Opportunistic Premise Plumbing Pathogens (OPPPs) par la communauté internationale (Falkinham 2015) (Wang et *al.* 2017b). L'acronyme « PROPRES » souligne dans les deux acceptions de l'adjectif « propre », à la fois l'origine intrinsèque aux hydrosystèmes et l'origine non fécale. Les PROPRES ont des caractéristiques communes directement liées à leur survie et leur persistance dans cet environnement artificiel particulier, comme la résistance aux désinfectants, la capacité à former du biofilm, à se multiplier dans les amibes et dans un milieu pauvre en nutriments ayant de faibles concentrations en carbone et oxygène (Falkinham 2015). Leur capacité à s'organiser en biofilm dans les canalisations d'eau leur apporte un avantage sélectif comme une protection contre les biocides, les antibiotiques et le stress environnemental (pH, UV, faible concentration d'oxygène). Le biofilm est constitué d'une matrice extracellulaire, fixée sur une surface biotique ou abiotique comme des matériaux médicaux, par exemple des cathéters ou des respirateurs ou des canalisations d'eau. Cette structure se développe autour d'une communauté bactérienne, permet aux bactéries de se protéger des agressions par des facteurs extérieurs, comme par exemple les antibiotiques ou les biocides. Le biofilm constitue aussi un réservoir protégé à partir duquel les bactéries peuvent diffuser en se détachant au cours du temps (Roux et Ghigo, 2006) (Sharma et *al.* 2016). La capacité de formation de biofilm est influencée par différents paramètres extérieurs comme la température ou les nutriments disponibles, et des facteurs intrinsèques de la bactérie comme sa pathogénicité, sa résistance aux antibiotiques, aux biocides ou la structure génétique de sa population. Cette organisation sous forme de communauté dans le biofilm favorise les transferts horizontaux de gènes, en particulier des gènes de résistance et de virulences. De plus leur forte concentration dans les canalisations d'eau et la plomberie, permet, grâce à la pression de l'eau au point d'usage, leur diffusion et leur transmission sous forme d'aérosol (Naumova et *al.* 2016).

Parmi les PROPRES, on retrouve par exemple *Legionella* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Stenotrophomonas* spp. et les mycobactéries non tuberculeuses. Ces PROPRES peuvent persister dans le système d’approvisionnement d’eau de l’hôpital durant un temps prolongé et être ainsi une source de contamination à l’origine notamment de cas d’infections pulmonaires, de septicémies ou de phénomènes épidémiques nosocomiaux et aussi communautaires comme l’ont décrit de nombreuses études (Rogues et al. 2007) (Yapicioglu et al. 2012) (Venier et al. 2014) (Loveday et al. 2014) (Walker et al. 2014) (Romano et al. 2013). En France, une épidémie marquante liée à des PROPRES mérite d’être citée, due à son ampleur et sa médiatisation. C’est celle de « l’affaire de la Clinique du sport » (1989-1993) à Paris, où de l’eau contaminée par *Mycobacterium xenopi*, utilisée pour le rinçage des dispositifs médicaux après désinfection, a entraîné une épidémie de spondylodiscite chez 58 personnes (Astagneau et al. 2001). Ces PROPRES sont devenus un réel problème de santé publique, à cause de leurs implications dans les IAS et les phénomènes épidémiques : ainsi *P. aeruginosa* est le 4<sup>ème</sup> agent impliqué dans des infections nosocomiales, en France en 2017, selon la dernière enquête de prévalence des IN, en représentant 6,28% des microorganismes rapportés dans les IN (SF2H 2018a), et fait partie des cinq premiers agents responsables d’IAS en Europe et en France selon le ECDC (ECDC 2019). La transmission croisée est une part importante des cas d’infections à *P. aeruginosa* dans des services à risque comme les réanimations car selon certains auteurs, elle représenterait en moyenne 50% des cas d’infections à *P. aeruginosa* (Coppry et al. 2019). L’environnement a un rôle non négligeable dans ces cas de transmissions croisées (Bertrand et al. 2003) (Rogues et al. 2007) (Johnson et al. 2009). De plus, le coût de ces IAS dans le système de santé ne peut être négligé. Ainsi, aux Etats-Unis, les infections dues à des PROPRES coûtent environ 500 millions de dollars par an et en 15 ans (entre 1991–2006), les infections à *P. aeruginosa* ont eu un coût estimé à 8,8 milliards de dollars (Collier et al. 2012) (Naumova et al. 2016). Malgré la forte prévalence des IAS à *P. aeruginosa*, le rôle essentiel de l’environnement dans les cas d’infections à *P. aeruginosa* et le coût des IAS à *P. aeruginosa*, les voies de transmission des souches environnementales de *P. aeruginosa* à l’homme restent peu étudiées.

## II- Potentiels infectieux et épidémique des principales bactéries à Gram négatif responsables d'IAS

### A- Notion de structure de population et relation avec le potentiel infectieux et épidémique

Un clone bactérien se définit comme une cellule bactérienne et sa descendance. On parlera de populations clonales en prenant en compte les différentes variations génétiques et/ou phénotypiques se produisant à chaque génération. Etudier la génétique d'une population bactérienne, c'est donc étudier son évolution, ses variations génétiques d'un point de vue spatio-temporel. Ces variations génétiques peuvent être de simples mutations, des réarrangements génomiques ou l'acquisition de matériel génétique. La notion de structure de population prend donc en compte toute la complexité de la diversité génétique voire phénotypique d'une espèce bactérienne. Son étude permet de mieux caractériser la diffusion et l'émergence mais aussi d'évaluer le potentiel épidémique de certaines sous-populations.

Cette variabilité intra-spécifique des potentiels infectieux et épidémique (incluant la résistance) est particulièrement observée chez les bactéries pathogènes dites opportunistes (BPO) ou généralistes, au sens où elles n'établissent pas de relations strictes et spécifiques avec un hôte et présentent de nombreux modes de vie : commensal/pathobionte, saprophyte, pathogène. Inversement, les bactéries pathogènes strictes ou spécialistes ont une moindre variabilité intra-spécifique liée à un mode de vie quasi-systématiquement pathogène et à des relations très spécialisées avec l'hôte pouvant aller jusqu'à la vie intracellulaire obligatoire.

En général, les BPO provoquent une infection du fait de facteurs favorisant liés à une baisse des défenses de l'hôte : un déséquilibre des microbiotes, la rupture des barrières protectrices cutanéomuqueuses, une maladie chronique comme la mucoviscidose ou l'immunodépression du patient... La diversité des souches d'un point de vue génétique et phénotypique, au sein d'une espèce de BPO, est importante à considérer car certaines populations, dans certaines conditions auront une capacité supérieure à s'adapter (pathoadaptation), un meilleur fitness ou une résistance à certains antibiotiques/antiseptiques, et pourront donc mieux diffuser et/ou persister dans un environnement, comme par exemple dans le milieu hospitalier (Clark et *al.* 2015) (Abdouchakour et *al.* 2018).

## **B- Méthode d'étude de la structure de population au sein d'espèces bactériennes**

Des méthodes moléculaires peuvent être utilisées pour comparer, établir des relations entre des souches bactériennes et structurer les populations au sein d'une espèce : les variations génétiques grâce au MultiLocus Sequence Typing (MLST), ou les variations génomiques grâce à la multiplex rep-Polymerase Chain Reaction (MR-PCR), la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) par macrorestriction et séparation en électrophorèse en champs pulsé (ECP), et au Whole Genome Sequencing (WGS).

### **1-Le MLST : MultiLocus Sequence Typing**

Le MLST s'appuie sur l'amplification et le séquençage de gènes de ménage conservés au sein de l'espèce. Pour définir le ST « Sequence Type » correspondant au profil allélique unique de la souche bactérienne, les séquences sont comparées aux allèles déposés dans des banques génétiques internationales (<http://bigsdB.web.pasteur.fr/ecoli>) ([https://pubmlst.org/bigsdB?db=pubmlst\\_mlst\\_seqdef](https://pubmlst.org/bigsdB?db=pubmlst_mlst_seqdef)). La comparaison avec la banque de données internationale permet donc de replacer une souche dans une population internationale et donc d'évaluer si un ST est endémique dans le monde, devenu majoritaire dans une région, ou si sa diffusion n'est actuellement que sporadique. Un schéma MLST se compose généralement de 7 gènes de ménages. Une fois les ST déterminés, afin de définir la structure de population d'une espèce bactérienne, les ST sont regroupés en complexe clonaux (CC). Deux ST appartiennent au même CC lorsqu'ils ont au maximum 2 loci différents. Un sigleton est composé d'un ST qui diffère des autres car il a au minimum 3 loci différents.

### **2-Multiplex rep-PCR (MR-PCR) ou BRE-PCR**

Cette méthode de typage permet de comparer des souches bactériennes entre elles et de définir des variations génomiques pour une bactérie ou une population bactérienne donnée appartenant à une espèce. Les souches sont typées par une amplification génique inter séquences répétées bactériennes ciblées sur 3 types de séquences répétées BOX, REP

(Repetitive Extragenic Palindromic) et ERIC(Enterobacterial Repetition Intergenic Consensus) : PCR (BRE-PCR) ou par MR-PCR (Dupont et *al.* 2015). Ces séquences varient en position et en nombre dans le génome des souches d'une même espèce, les profils d'amplification obtenus permettent de comparer les souches entre-elles. Le typage par MR-PCR est une méthode rapide et peu coûteuse qui peut être utilisée par exemple pour détecter rapidement une souche épidémique pendant une épidémie nosocomiale.

### 3-Electrophorèse en champ pulsé (ECP)

Cette méthode longue et plus coûteuse que la MR-PCR est parmi les plus discriminantes pour la comparaison moléculaire des souches bactériennes d'une même espèce. Elle permet de distinguer des variants génomiques au sein de groupes clonaux définis par d'autres méthodes comme par exemple la MR-PCR. Les souches sont comparées selon leurs profils de restriction (pulsotypes) qui dépendent de la position des sites de macrorestriction présents dans l'ADN génomique de la bactérie. Malgré l'avènement du séquençage total des génomes (WGS), l'ECP est considérée comme le « gold standard » des méthodes de typage des agents d'IAS (Neoh et *al.* 2019). Par rapport au WGS qui détecte essentiellement les mutations ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism), l'ECP met surtout en évidence des réarrangements génomiques qui sont souvent impliqués dans l'évolution rapide adaptative des bactéries.

### 4- Séquençage de génome entier

Le séquençage de génome entier peut, tout comme les autres méthodes précédemment décrites, être utilisé comme méthode de typage comparatif et permet de façon précise de tracer l'évolution d'une population bactérienne en comparant le nombre de SNP (Snitkin et *al.* 2012) (Willmann et *al.* 2015) (Humphreys et *al.* 2019). L'étude de Willmann et *al.* 2015, a mis en évidence l'apparition de 22 SNPs associée à des critères épidémiologiques, comme le lieu et la durée d'hospitalisation des patients chez 49 souches de *P. aeruginosa* isolées lors d'une épidémie, et a ainsi permis de tracer différentes routes de transmission du clone épidémique. Le WGS permet aussi de détecter des gènes de résistances aux antibiotiques (Ellington et *al.* 2017) ou de virulence (de Toro et *al.* 2017) qui peuvent servir de marqueurs pour tracer une population à potentiels infectieux et épidémique.

### C- Potentiels infectieux et épidémique des entérobactéries : *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae*

Les entérobactéries telles que *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae* sont commensales du microbiote digestif de l'homme qui constitue une barrière à la colonisation par des espèces pathogènes (Calfee, 2017). Les entérobactéries coexistent avec plus de 500 espèces (Tenailon et 2010) et représentent moins de 1% du microbiote (Taur et al. 2012). Le microbiote peut être déséquilibré par exemple lors de traitements antibiotiques et les entérobactéries résistantes aux antibiotiques peuvent représenter alors plus de 90% du microbiote (Taur et al. 2012). Ces bactéries mutualistes peuvent avoir un comportement de pathogène opportuniste, on parle alors de pathobionte, et ainsi être responsables d'IAS (Keith et al. 2019). L'émergence de souches de plus en plus résistantes d'entérobactéries en fait des espèces pathogènes majeures très préoccupantes en termes de santé publique aussi bien en contexte hospitalier que communautaire (Doi et al. 2017). En plus de l'émergence de ces souches qui entraîne une grande diversité de résistances acquises aux antibiotiques au sein d'une même espèce, les entérobactéries présentent une forte diversité intra-spécifique qui s'exprime en particulier en termes de virulence et d'épidémiogénèse. L'acquisition de nombreux gènes, grâce à des transferts horizontaux et notamment d'éléments génétiques mobiles comme les plasmides, démontre bien la plasticité du génome des entérobactéries et donc sa capacité à acquérir de nouveaux gènes pour s'adapter à son environnement et devenir pathogène pour l'hôte (Walsh et al. 2011) (Van Elsas et al. 2011) (Cavalié et al. 2016) (Jang et al. 2017). Afin de mieux évaluer la diversité au sein d'une espèce, différentes classifications ou structurations de population ont été proposées. Elles s'appuient principalement sur le sérotypage, et le génotypage des gènes de virulence et du core genome dans les approches de MLST. Les facteurs de virulence acquis par transferts horizontaux concernent surtout des souches impliquées dans les infections digestives communautaires. Le succès épidémique nosocomial et donc les facteurs influençant la transmission directe ou via l'environnement de soins sont à ce jour mal connus, même s'ils sont liés dans certains cas à des génotypes MLST particulier.

## 1-Diversité de la résistance aux ATB

Par définition, les entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques (MDR pour MultiDrug Resistant) sont résistantes à au moins une molécule de trois familles différentes d'antibiotiques (Magiorakos et *al.* 2012). Les entérobactéries résistent aux  $\beta$ -lactamines principalement par production de  $\beta$ -lactamases, des enzymes qui hydrolysent la liaison amine du cycle  $\beta$ -lactame. Les gènes codant les  $\beta$ -lactamases (*bla*) peuvent être soit chromosomiques et constitutifs, soit plasmidiques et acquis par transfert horizontal. Les plasmides peuvent porter des gènes de résistance sur des transposons et/ou des intégrons. Toutes les  $\beta$ -lactamases ont en commun une structure protéique, une hélice alpha et des feuillets bêta (Perez et *al.* 2007a), mais leurs séquences géniques et protéiques ont une variabilité importante. Pour chaque gène codant une  $\beta$ -lactamase, il y a plusieurs variants. Le nombre de variants décrits ne cesse d'augmenter, de moins de 10 variants en 1995 à plus de 150 variants aujourd'hui pour chaque type de  $\beta$ -lactamase, TEM, SHV ou CTX (Mazzariol et *al.* 2017). Ainsi, il existe une grande diversité de  $\beta$ -lactamases, plus de 1000 ont déjà été décrites (Kaye et Pogue, 2015).

Deux classifications des  $\beta$ -lactamases sont décrites : la classification structurale d'Ambler et la classification fonctionnelle de Bush (Ambler 1980) (Bush et *al.* 1995) (Bush et Jacoby 2010). Les quatre classes d'Amber ont été définies par la structure de leur site actif. Les enzymes des classes A, C et D ont une sérine sur leur site actif, et celles de la classe B dites métalloenzyme ont un ion métallique (zinc) sur leur site actif. Les enzymes de la classe A sont des pénicillinases (type TEM, SHV, CTX-M), celles de la classe C sont des céphalosporinases (type AmpC, FOX, ACT, CMY), et celles de la classe D sont des oxacillinases (type OXA). Les enzymes de la classe B sont des métallo- $\beta$ -lactamases (type IMP, NDM) (Kaye et Pogue 2015). Cette classification est simple et stable mais elle ne reflète pas la diversité aussi bien génétique que phénotypique des  $\beta$ -lactamases.

La classification de Bush est plus complète car elle s'appuie sur les caractéristiques physicochimiques et biochimiques des enzymes comme leur point isoélectrique, leur poids moléculaire, leur profil de substrat et leur profil de sensibilité aux inhibiteurs. Les enzymes sont classées en quatre groupes (1, 2, 3, 4) puis en sous-groupe 2a, 2b.... Le groupe 1 (classe C d'Amber) est constitué des céphalosporinases majoritairement chromosomiques, pouvant

hydrolyser les céphalosporines avec un spectre s'étendant jusqu'au C3G, et qui ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Le groupe 2 (groupe A et D d'Amber) est un vaste groupe de  $\beta$ -lactamases codées par des gènes plasmidiques et généralement inhibées par l'acide clavulanique. Les enzymes du groupe 3 (classe B d'Amber) sont inhibées par l'EDTA. Elles entraînent la résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines sauf les monobactames. Les enzymes du groupe 4 ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique et sont peu décrites pour l'instant. Elles n'ont pas de correspondance avec la classification d'Amber et ne peuvent pas être classées dans les autres groupes de la classification de Bush.

La classification de Bush s'appuie en partie sur le profil d'inhibition et d'inactivation des enzymes mais une mutation ponctuelle peut changer ces profils. Cette classification n'est donc pas stable dans le temps. Ainsi, le groupe 2b se divise en un sous-groupe 2br correspondant aux IRT « Inhibitor Resistant TEM », majoritairement les enzymes de types TEM-1 et TEM-2 qui sont devenues résistantes aux inhibiteurs par mutation et un sous-groupe 2be correspondant aux  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) (Perez et *al.* 2007a).

Les entérobactéries productrices de ces  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (EBLSE) ont été décrites pour la première fois dans les années 1980 et n'ont cessé de diffuser pour devenir un problème majeur et mondial de santé publique (Livermore et *al.* 2007). Actuellement, 1,5 milliard de personnes serait colonisé par des EBLSE (Doi et *al.* 2017). Ces EBLSE sont résistantes à plusieurs  $\beta$ -lactamines, à toutes les pénicillines, aux céphalosporines de 1ère, 2ème, 3ème et 4ème générations (C1G, C2G, C3G et C4G) (céfépime et cefpirome), et aux monobactames. Les carbapénèmes et les céphamycines sont encore actifs sur les EBLSE (Liebana et *al.* 2013). Les EBLSE les plus fréquemment isolées appartiennent à la classe A de la classification d'Amber (type TEM, SHV, CTX-M) ou au sous-groupe 2be de la classification de Bush (Perez et *al.* 2007a) (Liebana et *al.* 2013).

Les BLSE des groupes TEM et SHV sont apparues dans les années 80 par mutations des gènes *bla* TEM et SHV natifs qui codaient des pénicillinases. Les mutations ont conduit à des modifications structurelles permettant l'accession des C3G, C4G et de l'aztréonam au site actif de l'enzyme. Il s'en suit un élargissement du spectre d'hydrolyse de l'enzyme vers les céphalosporines. Les variants TEM-3, TEM-52, SHV-12 et SHV-5 sont les plus souvent décrits pour les BLSE de type TEM et SHV (Kaye et Pogue 2015). Ces BLSE sont responsables de

nombreuses épidémies nosocomiales notamment entre les années 1980 et 2000 puis les BLSE de type CTX ont été de plus en plus impliquées dans ces phénomènes épidémiques et sont devenues majoritaires (Ruppé, 2010).

Les EBLSE de type CTX-M sont apparues dans les années 90 et ont acquis leur gène de résistance via un plasmide provenant à l'origine du chromosome d'une entérobactérie environnementale appartenant au genre *Kluyvera* (Pitout et *al.* 2005). Ce gène acquis est associé à des séquences d'insertion comme ISEcp1 et ISEcp1-like qui codent des transposases jouant un rôle dans l'expression du gène. Le gène *bla* CTX peut aussi être porté par un intégron (Ruppé 2010). Le nom CTX-M vient de la première EBLSE, qui a été isolée à Munich et hydrolysait plus fortement le céfotaxime que la ceftazidime d'où son nom « cefotaximase Munich ». La céftazidime est une molécule volumineuse ne pouvant pas s'insérer initialement dans le site catalytique des bêta-lactamases, suite à des mutations génétiques, certaines d'entre-elles ont pu hydrolyser la ceftazidime. Plus de 150 variants CTX-M ont été décrits appartenant à 5 clusters (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25). Les BLSE de type CTX-M sont actuellement les plus courantes dans le monde. En Europe, les clusters 1 et 9 sont les plus présents (Bonnet 2004) (Coque et *al.* 2008) (Mazzariol et *al.* 2017). Les EBLSE de type CTX-M sont surtout responsables d'infections urinaires aussi bien nosocomiales que communautaires et leur diffusion peut être considérée comme pandémique (Ruppé 2010).

En cas d'infection, les EBLSE peuvent entraîner un retard de choix de l'antibiothérapie optimale, rallonger la durée et le coût d'hospitalisation, et augmentent ainsi la morbidité et la mortalité des patients. Ceci a été démontré dans une méta-analyse de 16 études avec un risque 1,85 fois plus élevé de mortalité et un risque 5,56 fois plus élevé de retard au bon choix de l'antibiothérapie lorsqu'un patient contracte une bactériémie à EBLSE par rapport à une entérobactérie non BLSE (Schwaber et Carmeli 2007). Selon le dernier rapport de Santé Publique France publié en mai 2018, la densité d'incidence des EBLSE a été multipliée par 5,4 entre 2002 et 2016 (de 0,13 en 2002 à 0,73 en 2016) (SF2H 2018a).

Suite à la diffusion de ces EBLSE, de nouvelles molécules à large spectre et actives sur les EBLSE ont été mises sur le marché : les carbapénèmes (l'imipénème, le méropénème, l'ertapénème et le doripénème). Mais, dès leur commercialisation, des souches résistantes à

ces molécules sont apparues. La résistance aux carbapénèmes peut se faire par la combinaison de plusieurs mécanismes qui leur apportent un haut niveau de résistance comme un système de pompe d'efflux, des mutations altérant l'expression et/ou le fonctionnement des porines et des protéines liant les pénicillines (PLPs) (Mena et al. 2006). De plus, des souches produisant une  $\beta$ -lactamase, une carbapénémase et entraînant une résistance stable aux carbapénèmes ont été décrites. Les gènes codant les carbapénémases sont majoritairement plasmidiques mais ils peuvent aussi être chromosomiques comme pour le gène *blaOXA-48* chez *E. coli* ST24 (Turton et al. 2016). Les entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC) entraînent des échecs thérapeutiques (Nordmann et al. 2012). La gravité d'une infection à EPC est plus importante que celle à entérobactéries résistantes aux carbapénèmes non-EPC (taux de mortalité, OR de 4.92 (IC 95%)) (Tamma et al. 2017).

Les carbapénémases appartiennent aux 4 classes de la classification d'Amber des  $\beta$ -lactamases (Queenan et Bush 2007). On retrouve principalement des carbapénémases de classe A de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), de classe B de type NDM (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamases), VIM (Verona integron–encoded metallo-  $\beta$  -lactamases) et IMP (active on imipenem) et de classe D de type OXA (carbapenem hydrolyzing oxacillinases) (Queenan et Bush 2007). Les carbapénémases de classe A hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines dont les carbapénèmes et leur activité est partiellement inhibée par l'acide clavulanique. Les carbapénémases de classe B hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines dont les carbapénèmes sauf l'aztéronam. Les carbapénémases affiliées à la classe C sont des céphalosporinases par exemple de type AmpC qui hydrolysent faiblement les carbapénèmes. L'association avec d'autres mécanismes de résistance comme l'imperméabilité est nécessaire pour entraîner une résistance aux carbapénèmes. Une EPC présentant seulement une  $\beta$ -lactamase de type OXA (classe D) sera uniquement moins sensible aux carbapénèmes. Mais les EPC de type OXA ont souvent plusieurs  $\beta$ -lactamases comme une association avec des BLSE qui leur confère un haut niveau de résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines dont les carbapénèmes (Nordmann 2010).

La première EPC de type KPC a été décrite en 2001 aux Etats-Unis par Yigit et al. (2001). C'était une souche de *K. pneumoniae* ayant un plasmide non-conjugatif de 50kb portant un gène de type *blaKPC-1* qui confère une résistance aux carbapénèmes inhibée en présence

d'acide clavulanique (Yigit et al. 2001). Les EPC de type KPC ont ensuite été décrites dans presque tous les états des USA et *K. pneumoniae* de type KPC est devenue l'EPC majoritaire aux Etats-Unis (Van Duin et al. 2014) (Calfee, 2017) (Lutgring 2019). Une étude multicentrique américaine a montré que les souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémase étaient majoritairement de type KPC-2 (48%) et KPC-3 (51%) (Van Duin et al 2014). Des EPC de type KPC ont aussi diffusé en Asie (Zhang et al. 2015). Une étude chinoise a montré que l'EPC majoritaire était de type KPC-2, représentant 70,6% des EPC isolées (Chen et al. 2011). Les EPC de type KPC ont aussi diffusé en Europe. En France pour l'instant, seules des épidémies d'EPC de type KPC sont décrites mais ces EPC ne sont pas considérées comme endémiques contrairement à l'Italie et à la Grèce (Nordmann et al. 2014) (Friedman et al. 2017). Dans une étude menée sur 2 ans de 2012 à 2014, en Italie, 436 souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases ont été analysées (Parisi et al. 2015). Les auteurs ont démontré que leur taux avait significativement augmenté en 2 ans ( $p < 0,001$ ) et qu'elles étaient majoritairement de type KPC (99,1%) (Parisi et al. 2015). Dans une étude menée en Grèce de 2005 à 2014, 1668 souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases ont été isolées et 80% étaient de type KPC. En 2008, une seule souche de *K. pneumoniae* KPC a été isolée, mais dès 2009, la résistance aux carbapénèmes avec le gène *bla<sub>KPC</sub>* est devenue majoritaire (Spyropoulou et al. 2016). Cette étude montre la grande rapidité avec laquelle peuvent diffuser les souches de *K. pneumoniae* KPC. Des EPC de type KPC ont aussi été décrites en Amérique du Sud (Villegas et al. 2016) et en Afrique (Brink et al 2012).

La première EPC de type NDM a été décrite en 2009 chez un voyageur Suédois revenant d'Inde. Le patient souffrait d'une infection urinaire à *K. pneumoniae* NDM. Le gène *bla<sub>NDM-1</sub>* était porté par un plasmide conjugatif de 140kb (Yong et al. 2009). Les EPC de type NDM sont maintenant endémiques en Inde, au Pakistan, au Bangladesh et en Chine (Logan et al. 2017). Une étude pakistanaise, analysant 200 échantillons de selles de patients collectés en 1 mois et demi a démontré la forte prévalence du portage d'EPC NDM. En effet 18,5% des patients étaient porteurs d'une EPC NDM-1 (Perry et al. 2011). Plusieurs études ont décrit des cas de patients ayant voyagé dans ces pays endémiques et ayant rapporté des EPC de type NDM dans les pays occidentaux et aux Etats-Unis (Struelens et al. 2010) (Grundmann et al. 2010) (Rasheed et al. 2013) (Ruppé et al. 2014). Les EPC de type NDM ont maintenant

une diffusion mondiale et ont été rapportées sur tous les continents (Nordmann et al. 2011) (Lutgring 2019). Le gène *bla*<sub>NDM</sub> est porté sur un transposon (Tn125 ou Tn300) (Khan et al. 2017). Il a été identifié dans 11 familles bactériennes différentes et actuellement 24 variants (*bla*<sub>NDM-1</sub> à *bla*<sub>NDM-24</sub>) du gène sont connus (Wu et al. 2019b). Vingt-quatre variants ont été identifiés chez des entérobactéries et le variant *bla*<sub>NDM-1</sub> a été identifié chez 27 espèces entérobactéries différentes (Wu et al. 2019b). Les variants ayant le plus diffusé dans la zone endémique autour de l'Inde sont *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-4</sub>, *bla*<sub>NDM-5</sub>, *bla*<sub>NDM-6</sub> et *bla*<sub>NDM-7</sub>. En zone non endémique, comme la France, c'est le variant *bla*<sub>NDM-1</sub> qui prédomine (Khan et al. 2017) (Wu et al. 2019b).

Les carbapénamases de type VIM ont d'abord été décrites chez *P. aeruginosa* (Lauretti et al. 1999) puis chez les entérobactéries (Miriagou et al. 2003). La première souche décrite chez un patient grec était un *E. coli* de type VIM-1, où le gène de résistance était sur un intégron de type 1, lui-même porté par un plasmide transférable de 50 kb (Miriagou et al. 2003). Depuis, les EPC de type VIM ont diffusé sur tous les continents mais ne sont considérées comme endémiques qu'en Grèce avec majoritairement *Klebsiella* spp. VIM-1 et *E. cloacae* VIM-1 (Matsumura et al. 2017).

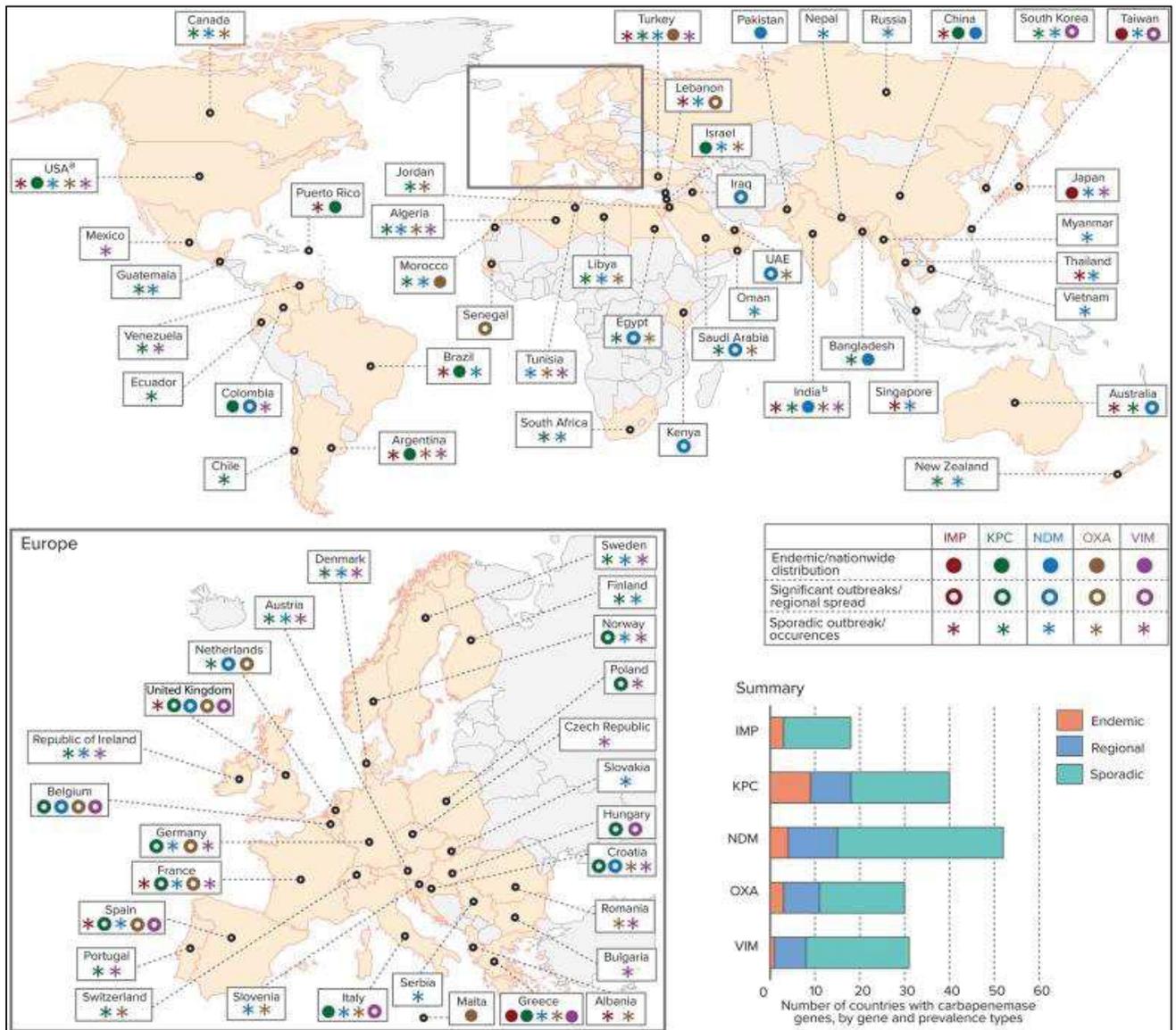
Les carbapénémases de type IMP ont aussi d'abord été décrites chez *P. aeruginosa* (Watanabe et al. 1991) avant d'être décrites chez les entérobactéries. La première EPC décrite est une *K. pneumoniae* IMP-1 où le gène de résistance est porté par un plasmide conjugatif de 150kb. Cette souche a été isolée chez un patient vivant à Singapour (Koh et al. 1999). Les EPC de type IMP sont surtout décrites en Asie (Japon, Taiwan) mais quelques cas sporadiques ont été décrits en Europe, aux Etats-Unis et en Afrique (Friedman et al. 2017) (Lutgring 2019).

La première EPC de type OXA était une souche de *K. pneumoniae* isolée en Turquie. Le gène *bla*<sub>OXA-48</sub> était porté par un plasmide conjugatif de 150 kb. Cinq  $\beta$ -lactamases différentes étaient associées à cette souche, lui conférant une haute résistance aux  $\beta$ -lactamines (Poirel et al. 2004). Les EPC de type OXA-48 ont diffusé sur tous les continents et sont devenues endémiques dans de nombreux pays comme la Turquie, le Japon, Malte... (Glasner et al. 2013) (Lutgring et al. 2018) (Logan et al. 2017). Une récente revue de la littérature a même considéré que les EPC de type OXA-48 étaient endémiques en France (Friedman et al. 2017).

De nombreuses épidémies de EPC OXA-48 ont été décrites en France impliquant parfois un grand nombre de patients. Par exemple, à Nantes, une épidémie de *K. pneumoniae* OXA-48 a impliqué 72 patients en 15 mois (Semin-Pelletier et al. 2015). Actuellement 10 variants de *bla*<sub>OXA-48</sub> ont été décrits, et ceux qui ont le plus diffusé sont *bla*<sub>OXA-181</sub> et *bla*<sub>OXA-232</sub> (Bonomo et al. 2018).

La distribution des EPC est résumée selon la situation épidémiologique (endémique, cas épidémiques, cas sporadiques) et selon leurs gènes de résistance sur la carte de la figure 10 tirée d'une récente revue de la littérature (Logan et al. 2017).

L'émergence des EPC est devenue un réel problème de santé publique, notamment car ces souches ont souvent plusieurs mécanismes de résistances associés, comme plusieurs  $\beta$ -lactamases dont plusieurs carbapénèmases (Xie et al. 2017) (Haciseyitoglu et al. 2017) (Ahn et al. 2019). De plus, les plasmides supports des gènes de résistance peuvent, par conjugaison, transférer la résistance à d'autres entérobactéries ou à d'autres BGN comme *P. aeruginosa* pouvant entraîner des « épidémies plasmidiques » (Marchandin et al. 2000) (Potron et al. 2011) (Walsh et al. 2011) (Mathers et al. 2011) (Cavalié et al. 2016) (Da Silva et Domingues, 2016).



**Figure 10 :** Distribution mondiale des entérobactéries productrices de carbapénèmes selon la situation : endémique, cas épidémiques, cas sporadiques et selon leur gènes de résistance ( $bla_{IMP}$ ,  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$ ,  $bla_{OXA}$ ,  $bla_{VIM}$ ) (Logan et al. 2017).

## 2- Diversité de population d'entérobactéries et émergence de clones à haut risque épidémique

### Diversité génétique des entérobactéries selon leur pathogénicité

*E. coli* est classiquement classé selon son pouvoir pathogène en deux catégories : les InPEC « *E. coli* pathogènes intestinaux » et les ExPEC « *E. coli* pathogènes extra-intestinaux ». Les InPEC sont des pathogènes obligatoires responsables de syndromes diarrhéiques et sont regroupés en six pathovars : EPEC « enteropathogenic *E. coli* », EHEC « enterohaemorrhagic *E. coli* », ETEC « enterotoxigenic *E. coli* », EIEC « Enteroinvasive *E. coli* », EAEC « enteroaggregative *E. coli* », DAEC « diffusely adherent *E. coli* ». Tous les pathovars ont un mécanisme de pathogénicité qui leur est propre et chacun entraîne un syndrome spécifique. Par exemple, la production de toxine, la Shiga toxine, présente chez EHEC, entraîne une inactivation de l'activité du ribosome, une inhibition de la synthèse protéique et induit l'apoptose (Köhler et Dobrindt 2011) (Mann et al. 2017) (Kaper et al. 2004). Les ExPEC peuvent être soit pathogènes, soit membres du microbiote digestif. Les ExPEC sont responsables d'infections extradiigestives, les pathovars les plus communs sont UPEC « uropathogenic *E. coli* » entraînant des infections du tractus urinaire, NMEC « neonatal meningitis *E. coli* » entraînant des méningites néonatales car leur capsule de type K1 est un fort inhibiteur de la phagocytose chez l'hôte (Croxen et Finlay 2010), SEPEC « sepsis-associated *E. coli* » entraînant des septicémies (Russo et Johnson 2000) et SSTI « skin and soft tissue infection » entraînant des infections localisées de la peau et des tissus mous mais pouvant entraîner des sepsis (Ranjan et al. 2017). Les UPEC sont impliqués dans 75% des infections du tractus urinaire et dans 95% des infections communautaires du tractus urinaire (Mann et al. 2017). A l'hôpital, les agents responsables d'IAS sont majoritairement des pathobiontes, c'est-à-dire des ExPEC du microbiote digestif qui provoquent une infection chez les patients fragilisés.

Les entérobactéries peuvent être classées selon des caractéristiques structurales pouvant être reliées à leur pathogénicité. Ainsi au sein de l'espèce *E. coli*, une classification en sérogroupes et en sérotypes est possible (Kauffmann 1947). Le sérotype repose sur le typage de l'antigène « O » correspondant à la partie terminale du lipopolysaccharide (LPS)

(plus de 170 ont été identifiés). Dans un même séro groupe, le sérotype est identifié par le flagelle « H » (plus de 50 ont été identifiés) puis éventuellement par l'antigène polysaccharidique capsulaire « K » (plus de 80 ont été identifiés). Le sérotypage est réalisé par agglutination grâce à des anti-sérums spécifiques (Machado et al. 2000). Plus de 700 sérotypes différents d'*E. coli* ont été identifiés (Jang et al. 2017). Le séro groupe et le sérotype permettent de déterminer des lignées particulièrement virulentes ou présentant un pouvoir pathogène marqué. Par exemple, le sérotype O57:H7 est souvent impliqué dans le Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) (Karch et al. 2005). Concernant les ExPEC, les sérotypes les plus fréquemment isolés dans les pyélonéphrites, les bactériémies et les méningites sont O4:K12:H5, O6:K2:H1, et O18:K1:H7 (Russo et Johnson 2000).

Cette classification en séro groupes et en sérotypes existe aussi chez *K. pneumoniae*. Actuellement seulement 9 séro groupes sont décrits pour *Klebsiella* spp. (Clarke et al. 2018) et 77 sérotypes de *K. pneumoniae* différenciés selon leur antigène capsulaire « K » ont été décrits (Ashurst et al. 2019). La virulence d'une souche de *K. pneumoniae* serait reliée à la composition de son antigène capsulaire « K ». Ainsi les souches n'ayant pas de séquences répétées « mannose-a-2/3 mannose » ou « L-rhamnose-A-L- rhamnose » ne sont pas phagocytées car non reconnues par les macrophages. Cet antigène capsulaire est donc bien un facteur de pathogénicité (Athamna et al. 1991). Les souches de *K. pneumoniae* de sérotype K1 et K2, de phénotype « hypermucoïdes » sont connues pour être les plus virulentes pouvant infecter des personnes immunocompétentes en communautaire aussi bien que des patients hospitalisés. Les souches de sérotype « K2 » sont associées à des infections pulmonaires, urinaires ou des septicémies, et les souches de sérotype « K1 » sont souvent associées à des infections hépato-biliaires (Fang et al. 2004) (Sánchez-López et al. 2019).

Pour *E. cloacae*, une classification en séro groupe a été établie en 1983. 23 séro groupes ont été identifiés (Gaston et al. 1983), mais depuis peu d'études ont utilisé cette classification (Han et al. 2017).

D'autres classifications s'appuyant sur les facteurs de virulence ont été proposées. Par exemple, Köhler et Dobrindt (2011) ont proposé dans leur revue une classification des facteurs de virulence pour *E. coli* en catégories fonctionnelles : l'adhésion aux surfaces de

l'hôte comme les pili de type 1 codés par le gène *fim*, l'invasion des surfaces de l'hôte comme « invasion of brain endothelium » (*ibeA*), l'acquisition du fer comme les siderophores, les toxines comme « alpha-Hemolysin » (*hlyA*), la protection contre les défenses immunitaires comme « Outer membrane proteases T » (*ompT*) (Köhler et Dobrindt 2011).

### **Diversité du fond génétique des entérobactéries**

L'analyse génétique portant sur les gènes de ménage s'est développée grâce à la technique du MLST qui permet d'analyser la structure de population des entérobactéries, et la compilation des données dans des banques internationales (pubMLST par exemple) permet d'observer l'émergence et le succès épidémique de certains génotypes appelés Sequence Type (ST). Des schémas MLST pour *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae* ont été déposés respectivement en 2005 (Diancourt et al. 2005), en 2006 (Wirth et al. 2006) et 2013 (Miyoshi-Akiyama et al. 2013).

#### ***K. pneumoniae***

Un seul schéma MLST est disponible pour *K. pneumoniae*. Ce schéma s'appuie sur l'amplification et le séquençage de 7 gènes de ménages : *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB*, *tonB* (Diancourt et al. 2005). Actuellement, 4105 ST ont été déposés dans la base de données pubMLST. ([https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst\\_kpneumoniae\\_seqdef](https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_kpneumoniae_seqdef)). Deux clusters de lignées clonales ayant une diffusion mondiale se distinguent : l'un est constitué de souches virulentes, responsables d'infections invasives communautaires, et l'autre de souches résistantes aux antibiotiques, responsables d'infections associées aux soins (Roe et al. 2019). Les souches virulentes responsables d'infections invasives communautaires sont de sérogroupes K1 et K2. Les souches de séro groupe K1 appartiennent aux CC23 et celles de séro groupe K2 appartiennent à différents CC suggérant des transferts de plasmides entre les différentes ST de *K. pneumoniae* (Struve et al. 2015).

Les lignées clonales résistantes aux antibiotiques responsables d'IAS appartiennent majoritairement aux ST258, ST11 et ST512 au sein du CC258 (Roe et al. 2019). Bien que ces souches ne soient généralement pas associées à des facteurs de virulence capsulaire, des yersiniabactines (siderophore) ont été détectés dans des souches épidémiques ST258

productrices de carbapénèmases KPC (Holt et al. 2015). Les ST du CC258 sont majoritairement associés au gène *bla*<sub>KPC</sub>. Le ST258 est décrit principalement en l'Europe et aux Etats-Unis, le ST11 en Asie et en Amérique Latine, et le ST512 en Europe et en Amérique (Lee et al. 2016) (Forde et al. 2017) (Peirano et al. 2017). Le ST258 est considéré comme un clone hyper-endémique (Dautzenberg et al. 2016) et est associé à de nombreuses épidémies nosocomiales (Tofteland et al. 2013) (Garza-Ramos et al. 2014) (Gartzonika et al. 2018). Le ST11 peut aussi être associé à d'autres gènes de résistance aux carbapénèmases comme le gène *bla*<sub>NDM-1</sub>. Il a été isolé en Inde, en Nouvelle Zélande et en Europe comme en Grèce (Peirano et al. 2017). En effet, dans une étude menée sur 4 ans (de janvier 2013 à décembre 2016) dans 8 centres hospitaliers grecs, 480 souches cliniques de *K. pneumoniae* ont été récoltées. 71% (341/480) de ces souches portaient le gène *bla*<sub>NDM-1</sub> et 69% (333/480) étaient de type ST11 et produisaient NDM-1 (Politi et al. 2019).

Deux autres lignées clonales émergentes résistantes aux antibiotiques ont été récemment décrites ST147 et ST101. *K. pneumoniae* ST147 est associée à des gènes de résistance de type *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-181</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> et a été isolé en Europe, au Canada et en Inde (Peirano et al. 2017). *K. pneumoniae* ST101 est associée à des gènes de résistance de type *bla*<sub>KPC-2</sub> et *bla*<sub>OXA48</sub> et elle a diffusé à travers le monde (Roe et al. 2019).

Le succès clonal chez *K. pneumoniae* est donc essentiellement lié à la résistance aux antibiotiques et l'usage des antibiotiques est à l'origine de la sélection et de la diffusion des principaux génotypes impliqués dans les IAS.

### *E. coli*

Deux schémas de MLST sont maintenant disponibles pour *E. coli* : le schéma à 7 gènes dit d'Achtman (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) (Wirth et al. 2006) et celui dit de l'Institut Pasteur (IP) à 8 gènes (*dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB*, *uidA*) (Clermont et al. 2015). Actuellement 8779 STs et 966 STs ont été décrits pour les schémas d'Achtman et de l'IP, respectivement. ([https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst\\_ecoli](https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_ecoli)).

Mora et al. ont comparé le typage MLST de 23 souches d'*E. coli* par les deux schémas MLST: toutes les souches appartenaient au ST131 selon Achtman, alors qu'elles correspondaient à sept STs différents selon l'IP. Cette étude démontre bien que le schéma de l'IP est plus discriminant que le schéma d'Achtman (Mora et al. 2014). Toutefois le schéma d'Achtman

reste la référence pour identifier la structure de population des souches, car les grandes lignées clonales ont été initialement définies par ce schéma (Clermont et al. 2015).

La population d'*E. coli* selon le schéma Achtman a été définie en CC : le CC10 composé des InPEC et des souches non pathogènes, et 16 CCs (CC 69, 95, 73, 131, 127, 141, 17, 14, 12, 144) composés majoritairement d'ExPEC (Köhler et Dobrindt 2011). Les lignées clonales internationales les plus impliquées dans les infections du tractus urinaire et les septicémies nosocomiales et communautaires appartiennent à ces 16 CC ; on y retrouve les séquences types ST131, ST393, ST95, ST73, ST648 et ST69 (Köhler et Dobrindt 2011) (Riley 2014) (Dantas Palmeira et al. 2018).

Actuellement, le ST131 cause des millions d'infections résistantes aux antibiotiques chaque année (Pitout et DeVinney 2017). Le ST131 a même été considéré comme un clone hyperendémique dans la revue de Dautzenberg et al. (2016). Ce clone qualifié à « haut risque épidémique » diffuse aussi bien à l'hôpital (Sauget et al. 2016) qu'en secteur communautaire (Jang et al. 2017). L'étude du génome d'*E. coli* ST131 a montré qu'il a évolué au cours du temps, en acquérant de nouveaux éléments génétiques comme des plasmides ou par recombinaison et mutations génétiques avec une augmentation de virulence et de résistance aux antibiotiques. Son sous-clone H30 est dénommé ainsi car il possède l'allèle 30 du gène *fimH* qui code les pili de type I facilitant l'adhésion à l'épithélium de l'hôte. Ce sous-clone est caractérisé par une résistance aux fluoroquinolones due à des mutations sur les gènes *gyrA* et *parC* codant pour les topoisomérases, cibles d'action des fluoroquinolones. Cette résistance est certainement à l'origine de l'émergence et la diffusion du sous-clone H30 du fait de la pression de sélection liée à l'usage des fluoroquinolones. Actuellement, ce clone est relié à une résistance de type BLSE où il représente plus de 90% des *E. coli* ST131 BLSE (Sauget et al. 2016). Au sein du sous-clone H30, une sous-population clonale, nommée H30-Rx, portant le gène codant une  $\beta$ -lactamase de type CTX-M-15 s'est individualisée (Nicolas-Chanoine et al. 2014). Elle est associée à certains gènes de virulences *iutA*, *afa*, *dra*, *kpsII* et à un antigène capsulaire K100 (Olesen et al. 2014). Certaines études ont aussi décrit des *E. coli* ST131 ayant acquis un gène de résistance aux carbapénèmes comme *bla*<sub>OXA-48</sub> (Ortega et al. 2016) (Hojabri et al. 2017).

Récemment, un autre clone international à haut risque épidémique a été identifié, le ST410. Ce clone porte deux gènes de résistance aux carbapénèmes : *bla*<sub>OXA181</sub> et *bla*<sub>NDM-1</sub>, et tout

comme le ST131, un sous-clone portant un variant du gène *fimH*, H24. Cette lignée est aussi résistante aux fluoroquinolones par mutation des gènes *gyrA* et *parC* et porte le gène codant une  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Roer et al. 2018). Le succès de diffusion de ST131 ou ST410 est particulièrement préoccupant, car en plus de leur profil d'antibiorésistance ils peuvent porter fréquemment des gènes de virulence.

Cependant, pour les autres lignées pandémiques (ST393, ST69, ST95, ST73 et ST648), la résistance n'est pas nécessairement le déterminant de leur diffusion. Les facteurs épidémiologiques et leur « aptitude » biologique intrinsèque ainsi que leur fitness sont susceptibles de contribuer à leur diffusion mais ces éléments restent très mal connus.

### *E. cloacae*

Un seul schéma MLST est disponible pour *E. cloacae*. Ce schéma s'appuie sur l'amplification et le séquençage de 6 gènes de ménages : *dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB* et *rpoB* (Miyoshi-Akiyama et al. 2013). Actuellement, 1241 STs ont été déposés dans la base de données ([https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst\\_ecloacae\\_seqdef](https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst_ecloacae_seqdef)). Plusieurs STs associés à des souches d'*E. cloacae* BLSE ont diffusé à travers le monde comme le ST66, ST78, ST108 et ST114 (Annavajhala et al. 2019). Izdebski et al. (2015) ont analysé 173 souches d'*E. cloacae* BLSE isolées dans 7 pays européens (France, Grèce, Italie, Luxembourg, Slovénie, Lettonie et Espagne) et en Israël. Ils ont aussi pu démontrer que les ST66, ST78, ST108 et ST114 sont les STs ayant le plus diffusé. En effet, au minimum 10 souches, provenant de 3 à 5 pays différents ont été isolées pour chacun de ces STs (Izdebski et al. 2015).

Les ST171 et ST78 ont aussi diffusé aux USA et des cas sporadiques ont été rapportés à travers le monde (Annavajhala et al. 2019). Ces STs sont associés à des souches productrices de carbapénèmases (Gomez-Simmonds et al., 2018). Pour le ST171, les gènes *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>KPC-3</sub> et *bla*<sub>KPC-4</sub> portés par un plasmide de groupe d'incompatibilité IncFIA sont le plus souvent rapportés. Ce plasmide est proche du plasmide de 70kb, ayant diffusé aux Etats-Unis chez *K. pneumoniae* ST258 (pBK30683) (Gomez-Simmonds et al. 2018). Ceci suggère une modification du plasmide portant le gène *bla*<sub>KPC</sub> chez *K. pneumoniae* ST258 qui a ensuite transféré et s'est stabilisé chez *E. cloacae* ST171 avec un succès de diffusion (Annavajhala et al. 2019). Pour le ST78, plusieurs types de plasmides (InN, IncHI2, IncW, IncFIB) et gènes de

résistance lui sont associés ( $bla_{KPC-2}$ ,  $bla_{KPC-3}$  et  $bla_{KPC-4}$ ,  $bla_{VIM-1}$ ,  $bla_{IMP-4}$ ,  $bla_{IMP-8}$ ,  $bla_{OXA-48}$ ). La diffusion du ST78 est donc associée à plusieurs souches avec des plasmides différents (Aoki et al. 2018) (Peirano et al. 2018) (Gomez-Simmonds et al. 2018).

### 3-Transmission des entérobactéries en milieu hospitalier

#### L'hospitalisation favorise l'infection par des entérobactéries résistantes aux antibiotiques

Plusieurs études se sont intéressées à la transmission nosocomiale d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques hors situation épidémique, démontrant que l'environnement de soins et les soins qui y sont prodigués constituent un risque d'acquisition d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques comme des EPC (Tschudin-Sutter et al. 2012) (Pasricha et al. 2013), (Chiotos et al. 2017), (Kluytmans-van den Bergh et al. 2018) (Asai et al. 2018). Ainsi, plus la durée d'hospitalisation est longue, plus le risque d'acquisition d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques est important. Kluytmans-van den Bergh et al. (2018) ont estimé que le risque d'acquisition d'EBLSE est compris entre 2.8 et 3.8 pour 1000 jours d'hospitalisation. Cette étude a été menée dans 14 hôpitaux allemands où les mesures d'hygiène étaient respectées. De plus, Pasricha et al. (2013) ont montré qu'une hospitalisation de plus de 21 jours (OR 25.17 [4.18-151.68]) est un facteur de risque d'acquisition d'EBLSE. En ce qui concerne les EPC, une étude japonaise a montré que les patients porteurs/infectés par une EPC ont une durée d'hospitalisation plus longue que les patients non porteurs/infectés par une EPC (121 versus 63 jours,  $p = 0.052$ ). De plus pour les patients ayant acquis une EPC, plus de dépenses sont réalisées à leur admission (220,710 versus 69,904 yen,  $p < 0.001$ ) et donc plus la prise en charge d'un patient est lourde et coûteuse plus le risque d'acquisition d'EPC est élevé (Asai et al. 2018). Ainsi, certains actes médicaux comme les opérations chirurgicales (OR=6,3 ;  $p=0,003$ ) ou la ventilation mécanique (OR=12,4 ;  $p=0,031$ ) sont des facteurs de risque d'acquisition d'EPC (Chiotos et al. 2017).

Ces différentes études montrent que l'hôpital est un contexte favorable à la transmission d'entérobactéries résistantes (Vonberg et al. 2011) (Friedrich 2019).

## L'environnement hospitalier, un réservoir d'entérobactéries : source d'épidémies nosocomiales

L'environnement peut être contaminé directement par des entérobactéries issues des microbiotes des patients ou indirectement par manuportage avec des entérobactéries contaminant de façon transitoire les mains des soignants ou des visiteurs (Larson 1981) (Kaier et al. 2009) (Scheithauer et al. 2010). L'environnement hospitalier contaminé constitue alors un réservoir où vont se multiplier et se maintenir des entérobactéries potentiellement résistantes aux antibiotiques (Lemmen et al. 2004) (Lerner et al. 2013) (Bouguenoun et al. 2016). Par exemple, dans l'étude de Bouguenoun et al. (2016), 300 prélèvements d'environnement ont été réalisés dans les espaces communs de 9 services. Un site était contaminé par *K. pneumoniae* résistant aux carbapénèmes (poignée de porte) et 6 surfaces étaient contaminées par *E. cloacae* résistant aux carbapénèmes (poignée de porte, chariot, pied à perfusion, table, radiateur, brancard) (Bouguenoun et al. 2016). Dans l'étude de Lerner et al. (2013), 12 sites dans les chambres de 34 patients porteurs de *K. pneumoniae* KPC ont été prélevés, après entretien de l'environnement. Les auteurs ont montré que les sites les plus contaminés étaient ceux les plus proches des patients. Ainsi, 33% des oreillers étaient contaminés par *K. pneumoniae* KPC (Lerner et al. 2013).

Ces surfaces contaminées par des entérobactéries résistantes aux antibiotiques constituent un réservoir environnemental qui peut servir de relais à des épidémies nosocomiales. Ceci a été décrit dans plusieurs études, où des surfaces sèches (Pantel et al. 2016) (Stoesser et al. 2015) (Dai et al. 2014), humides (Clarivet et al. 2016) (Decraene et al. 2018) et le matériel médical (Rutala et al. 2016) (O'Horo et al. 2016) étaient impliqués. Ainsi, dans une étude nîmoise, il a été démontré que le lavabo et le matelas d'une chambre avaient été contaminés pendant 20 mois par *K. pneumoniae* OXA-48 et avaient servi de relais à une épidémie impliquant 5 patients (Pantel et al. 2016). Au CHU de Montpellier, un siphon a aussi été contaminé par *K. pneumoniae* OXA-48 et a servi de relais à une épidémie de 2 ans impliquant 17 patients, dont 6 directement impliqués car ayant séjourné dans la chambre où le siphon était contaminé (Clarivet et al. 2016). Le rôle de l'environnement de soins et des siphons comme relais lors d'épidémies à EPC a aussi été démontré lors d'une investigation réalisée dans une clinique à Perpignan, où l'enquête environnementale et la décontamination des siphons a permis de stopper une épidémie de *K. pneumoniae*

producteur de carbapénèmes impliquant 31 patients en 5 ans (Boudot et *al.* 2019). Autre exemple impliquant cette fois-ci du matériel médical : Smith et *al.* (2015) ont décrit une épidémie de 6 patients impliquant un duodenoscope contaminé par *E. coli* NDM.

**La survie dans l'environnement et le succès de diffusion via l'environnement : *K. pneumoniae* et *E. cloacae* versus *E. coli***

Plusieurs études, ont démontré que la dynamique de la transmission des entérobactéries semble différente selon les espèces. Ainsi, deux études ont porté sur la contamination des chambres de patients porteurs d'*E. coli* BLSE et de *K. pneumoniae* BLSE lors de leur hospitalisation et pour chaque étude, cinq sites de la chambre ont été prélevés. Entre 3,7 et 4% des chambres étaient contaminées par *E. coli* BLSE avec au moins un des 5 sites positif et 19% pour les deux études par *K. pneumoniae* BLSE. Cette différence de taux de contamination de l'environnement entre ces deux espèces d'entérobactéries suggère que la persistance des bactéries dans l'environnement est différente selon l'espèce et que *K. pneumoniae* persiste plus longtemps que *E. coli* (Guet-Revillet et *al.* 2012) (Gbaguidi-Haore et *al.* 2013). Une autre étude a montré des résultats similaires. Huit surfaces ont été prélevées dans 15 chambres de 7 patients porteurs d'*E. coli*, de *K. pneumoniae* ou d'*E. cloacae* producteur de carbapénèmes. *K. pneumoniae* et *Enterobacter* spp. ont été isolés à partir de prélèvements de surface, mais aucune souche d'*E. coli*. Cette étude démontre qu'*E. coli* persiste moins dans l'environnement que *K. pneumoniae* et *E. cloacae* (Weber et *al.* 2015).

D'autres études se sont intéressées à la survie d'entérobactéries sur les surfaces en réalisant des tests *in vitro* (Havill et *al.* 2014) (Weber et *al.* 2015) (Weterings et *al.* 2019). Weber et *al.* (2015), se sont intéressés à la survie *in vitro* de *K. pneumoniae*, *E. cloacae* et *E. coli* sur 5 surfaces : vinyle, acier inoxydable, formica, tissu et table (nature non précisée sans l'étude). Pour les 3 espèces bactériennes, le taux de survie était inférieur à 15% en 24 h sauf pour *K. pneumoniae* sur le Formica™. Ils ont pu montrer qu'à 72 h aucune bactérie n'avait survécu mais que *K. pneumoniae* et *E. cloacae* persistaient plus qu'*E. coli* sur les surfaces testées. Une autre étude ayant réalisé des tests similaires *in vitro* a montré que *K. pneumoniae* pouvait persister plus de 20 jours sur l'inox (Havill et *al.* 2014). La différence du temps de

survie entre les deux études pourrait s'expliquer par l'inoculum de départ qui est 3 à 5 log<sub>10</sub> supérieur dans l'étude de Havill et *al.* (2014).

Ces différentes études s'intéressant à la survie des entérobactéries en conditions réelles ou *in vitro* démontrent bien que *K. pneumoniae* et *E. cloacae* contaminent et persistent plus dans l'environnement qu'*E. coli*.

### **L'entretien des surfaces pour limiter les réservoirs environnementaux hospitaliers d'EPC**

Face à ces réservoirs environnementaux d'EPC dans les services de soins et au risque épidémique qu'ils engendrent, il paraît nécessaire d'adopter un protocole d'entretien des surfaces efficace pour éliminer ces EPC dans l'environnement de soins. Certaines sociétés savantes ont pris position sur la question de l'entretien de l'environnement lors de l'accueil de patients porteurs/infectés par une EPC. L'ECDC a démontré la nécessité de l'entretien de l'environnement pour éviter les transmissions croisées d'EPC, mais il ne recommande pas un type de biocide particulier à utiliser (Tacconelli et *al.* 2014) (Magiorakos et *al.* 2017). L'OMS recommande la désinfection des surfaces de soins par de l'eau de Javel (WHO 2017). Le « Joint Working Party » recommande aussi un entretien à l'eau de Javel, qui peut être complété par une désinfection des surfaces par voie aérienne (DSVA) avec du peroxyde d'hydrogène pour atteindre les surfaces non accessibles (Wilson et *al.* 2016). Mais en pratique ces mesures se sont parfois montrées insuffisantes pour éliminer les EPC contaminant l'environnement (Gray, 2016). Face à ce problème, il semble judicieux de mettre un peu un contrôle microbiologique des surfaces afin de vérifier l'absence d'EPC sur les surfaces de soins après entretien. C'est pourquoi au CHU de Montpellier, un protocole rigoureux est appliqué lors de la sortie de patients porteurs ou infectés par une EPC. Leur chambre est entretenue en 3 opérations (détergent, rinçage à l'eau puis désinfection à l'eau de javel) puis une DSVA est réalisée, suivie d'un contrôle microbiologique des surfaces afin de vérifier l'absence d'EPC sur les surfaces de la chambre. De plus, la chambre est séquestrée jusqu'aux résultats du contrôle microbiologique. Ce protocole est appliqué depuis 2013, et s'est avéré efficace car, depuis, seulement une épidémie avec une origine environnementale a été recensée (Baranovsky et *al.* 2017).

## **D- Potentiels infectieux et épidémique d'*Acinetobacter baumannii***

La classification taxonomique d'*Acinetobacter* spp. est la suivante : Phylum : *Proteobacteria*, Classe : *Gamma Proteobacteria*, Ordre : *Pseudomonadales*, Famille : *Moraxellaceae*, Genre : *Acinetobacter*. Les avancées de la génétique moléculaire ont permis de distinguer différentes espèces d'*Acinetobacter* spp. (Doughari et al. 2011). Les espèces les plus retrouvées en clinique sont *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus* et *Acinetobacter calcoaceticus* (Jung et Park 2015). Ainsi, *A. baumannii* est un agent fréquent d'IAS telles que des pneumopathies, des bactériémies, des infections du site opératoire, des tissus mous, de la peau et du tractus urinaire (Almasaudi 2018) (Karageorgopoulos et Falagas 2008). Les infections à *A. baumannii* sont associées à une forte mortalité (Jung et Park 2015) (Falagas et al. 2006a) allant de 30 à 75% pour les infections nosocomiales pulmonaires (Doughari et al. 2011). Ces infections touchent particulièrement les patients vulnérables, en réanimation, après une chirurgie récente ou immunodéprimés (personnes âgées, nouveau-nés prématurés et patients atteints de pathologies tumorales) (Almasaudi, 2018) (Doughari et al. 2011). Des épidémies sont fréquemment rapportées dans les unités de réanimation, de soins intensifs et de grands brûlés (Almasaudi, 2018) (Munier et al. 2017).

### **1-Résistance d'*A. baumannii* aux antibiotiques**

*A. baumannii* présente une résistance naturelle à certains antibiotiques mais jusqu'aux années 1970, elle était décrite comme une bactérie sensible à la plupart des antibiotiques présents sur le marché et n'était pas considérée comme une bactérie engendrant des échecs thérapeutiques. Elle est souvent considérée comme un contaminant sans grand intérêt des échantillons cliniques. En l'espace de 50 ans, *A. baumannii* est devenu un agent pathogène nosocomial, multirésistant aux antibiotiques, particulièrement redoutable.

#### **Résistance naturelle aux antibiotiques d'*A. baumannii***

La résistance naturelle d'*A. baumannii* est due à plusieurs mécanismes : l'efflux, l'imperméabilité et la production de  $\beta$ -lactamases (Poirel et Nordmann 2006). Les pompes à efflux sont de type AdeABC, AdeDE et AdeIJK. Elles entraînent une résistance à un large spectre d'antibiotiques comme le chloramphénicol, les fluoroquinolones, l'érythromycine, la

ceftazidime ou le triméthoprime (Damier-Piolle et *al.* 2008). L'imperméabilité intrinsèque est due à un faible nombre de porines de petite taille. Ces porines représentent moins de 5% des protéines de la membrane externe d'*A. baumannii* contre 60% chez *E. coli* (Sato et Nakae 1991). La première céphalosporinase constitutive caractérisée chez *A. baumannii* est de type AmpC chromosomique non inductible (Bou et Martínez-Beltrán 2000). Puis les céphalosporinases d'*A. baumannii* ont été nommées ADC (*Acinetobacter-derived-cephalosporinase*). Elles sont à l'origine de la résistance aux aminopénicillines, à la céfalotine et la céfoxitine et ne sont pas sensibles aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases comme l'acide clavulanique (Héritier et *al.* 2005) (Decré, 2012). Une oxacillinase chromosomique constitutionnelle de type OXA-51 et ses deux variants OXA-69 et OXA-66 ont été décrits, ces oxacillinases n'entraînent pas ou peu de résistance phénotypique aux antibiotiques (Decré 2012). Mais, la séquence d'insertion ISAbal1 peut entraîner la surexpression de ce gène dormant constitutif codant l'oxacillinase OXA-51 et les souches peuvent ainsi devenir résistantes aux carbapénèmes (June et *al.* 2016). De plus, cette oxacillinase de type OXA-51 garde une configuration stable en conditions de stress, lui permettant d'acquérir une résistance à l'imipénème malgré les variations de pH ou de température (Tiwari et Moganty 2014). *A. baumannii* est également naturellement résistant à l'ertapénème, à la fosfomycine, au triméthoprime, à l'acide pipémidique, à la norfloxacine (mais pas à l'acide nalidixique), aux furanes et peu sensible à l'aztréonam (Decré, 2012).

### **La résistance acquise aux antibiotiques chez *A. baumannii***

Selon les auteurs, différentes définitions de la multi-résistance phénotypique d'*A. baumannii* ont été utilisées (Falagas et *al.* 2006b). *A. baumannii* multirésistant aux antibiotiques « multidrug resistant » (MDR) est, soit résistant à toutes les molécules des trois familles d'antibiotiques suivantes : céphalosporines associées avec un inhibiteur des BLSE, fluoroquinolones et aminoglycosides (Jung et Park 2015) (Manchanda et *al.* 2010), soit résistant à plus de deux des cinq classes d'antibiotiques suivantes : céphalosporines antipycyaniques (ceftazidime ou céfépime), carbapénèmes (imipénème ou meropénème), ampicilline associée au sulbactam, fluoroquinolones (ciprofloxacine ou lévofloxacine) et aminoglycosides (gentamicine, tobramycine ou amikacine) (Peleg et *al.* 2008). *A. baumannii* « Extensively Drug Resistant » (XDR) répond à la première définition des MDR mais est

également résistant aux carbapénèmes. *A. baumannii* « Pan Drug Resistant » (PDR) est XDR et résistant aux polymyxines dont la colistine (Manchanda et *al.* 2010). Ces bactéries résistantes ont été sélectionnées au contact d'antibiotiques (Kempf et Rolain 2012) via l'acquisition de matériel génétique spécifique (Decré, 2012) (Fournier et *al.* 2006a).

Cette plasticité a été démontrée par analyse comparative des séquences génomiques de souches sensibles et résistantes aux antibiotiques. Ainsi, la souche d'*A. baumannii* isolée après antibiothérapie et résistante à la tigécycline montrait une différence de 18 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) et 3 délétions de 15, 44 and 17 kb comparativement à la souche sensible isolée antérieurement (Hornsey et *al.* 2011). Une autre étude s'est intéressée à la souche épidémique d'*A. baumannii* AYE multirésistante aux antibiotiques, responsable d'épidémies dans 54 établissements de santé (ES) de 8 régions françaises et associée à un taux de mortalité de 26%. Son équivalent sensible aux antibiotiques, la souche SDF, a été isolée à partir de poux humains. Le séquençage des génomes de ces isolats a mis en évidence le nombre accru de gènes de résistance dans le génome de la souche multirésistante : 52 gènes contre 7 dans le génome de la souche sensible (Fournier et *al.* 2006a). Le séquençage des génomes a également permis de révéler la présence d'ilots génomiques de résistance localisés sur des transposons appelé AbaR-type RI pour « *A. baumannii* resistance » et « Resistance Islands » (Kempf et Rolain 2012) (Fournier et *al.* 2006b).

*A. baumannii* peut intégrer du matériel génétique portant des gènes de résistance aux antibiotiques par transformation, conjugaison ou transduction (Almasaudi, 2018). Les intégrons de type I et II ont participé à la diffusion nosocomiale mondiale de souches d'*A. baumannii* résistantes environnementales et cliniques (Fournier et *al.* 2006a). Ces éléments génétiques mobiles peuvent porter des gènes codant une résistance aux  $\beta$ -lactamines. Ainsi, des souches d'*A. baumannii* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) de type TEM-92 ont été décrites en Europe, de type SHV-12 en Asie et Europe, de type CTX-M-2 et 43 en Asie et Amérique du Sud, de type VEB-1 en Europe et de types PER-1 et 2 en Europe, USA, Asie et Proche-Orient. Ces souches ont un haut niveau de résistance aux pénicillines et céphalosporines (Kolayli et *al.* 2005) (Almasaudi, 2018). La résistance aux carbapénèmes est de plus en plus décrite et retrouvée dans des souches responsables d'épidémies

nosocomiales (Woodford et al. 2011) (Decousser et al. 2013). Tout commença en 1985 en Ecosse, avant l'utilisation des carbapénèmes, avec l'isolement d'une souche d'*A. baumannii* produisant une carbapénémase OXA-23 dont le support de résistance à l'imipénème était porté par un plasmide transférable (Donald et al. 2000). Puis, ce plasmide a été décrit en Angleterre, au Brésil, en Corée, à Singapour, en Polynésie ou en Chine (Brown et Amyes 2006) avant de diffuser mondialement (Codjoe et al. 2017). Afin d'exprimer une résistance phénotypique aux carbapénèmes, l'expression du gène de résistance *bla*<sub>OXA-23</sub> doit être couplée à l'expression des pompes à efflux AdeABC (Evans et al. 2014). *A. baumannii* OXA-23 a entraîné des épidémies en Europe, en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud (Manchanda et al. 2010). Depuis, 6 groupes d'oxacillinases ont été décrits, en se basant sur les homologues de séquence : OXA-23-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-40-like, OXA-48-like et OXA-143-like. Chaque groupe comprend plusieurs enzymes, par exemple dans le groupe OXA-23-like on retrouve OXA-23, OXA-73, OXA-49... (Evans et al. 2014). Ce sont majoritairement les séquences d'insertions ISAb1 ou ISAb3 qui permettent la surexpression des oxacillinases. La majorité des gènes sont chromosomiques mais certains sont associés à un plasmide comme *bla*<sub>OXA23</sub>, *bla*<sub>OXA58</sub>, *bla*<sub>OXA24</sub>, *bla*<sub>OXA-143</sub>, *bla*<sub>OXA-231</sub>... (Zarrilli et al. 2013) (Manchanda et al. 2010) (Brown et Amyes 2006).

Toutes les oxacillinases n'ont pas diffusé géographiquement de la même manière. Ainsi, les groupes OXA23-like, OXA51-like, OXA-58-like et OXA-48-like ont une diffusion mondiale (Coelho et al. 2006) (Tiwari et Moganty 2014) (Mugnier et al. 2010) (Codjoe et al. 2017).

Le groupe OXA-40-like a seulement diffusé aux Etats-Unis et en Asie (Evans et al. 2014) alors que le groupe OXA-143-like n'a diffusé qu'au Brésil (Zarrilli et al. 2013).

D'autres carbapénémases ont été rapportées dans cette espèce bactérienne, comme les enzymes de type VIM, IMP et SIM-like qui sont associées à un intégron de type 1 et qui ont diffusé à travers le monde en Europe, en Asie et en Amérique du Sud (Perez et al. 2007b) (Evans et al. 2014). Pour les enzymes de type NDM, le gène est soit chromosomique soit plasmidique. Pour les souches d'*A. baumannii* NDM isolées en Europe, *bla*<sub>NDM</sub> est chromosomique et localisé sur le transposon Tn125-like (Bonnin et al. 2012). *A. baumannii* NDM connaît aussi une diffusion mondiale, des souches étant décrites en Inde, au

Bengladesh, en Chine, aux Emirats-Arabes, en Israël, Egypte, Allemagne, Belgique et en République tchèque (Zarrilli et *al.* 2013) (Bonnin et *al.* 2012).

Des souches d'*A. baumannii* produisant des enzymes de type KPC et GES ont été identifiées localement respectivement à Porto-Rico et en France/Belgique. Le support génétique du gène *bla*<sub>KPC</sub> n'a pas été identifié et *bla*<sub>GES</sub> a été associé au plasmide et à un intégron de type 1 (Robledo et *al.* 2011) (Bonnin et *al.* 2011) (Bogaerts et *al.* 2010).

Comme pour de nombreuses espèces bactériennes, *A. baumannii* peut aussi devenir multirésistant aux antibiotiques lorsque les gènes de résistance naturelle présents dans son génome sont surexprimés (Almasaudi 2018) (Manchanda et *al.* 2010) (Perez et *al.* 2007b). L'insertion d'une séquence *ISAba1*-like entraîne la surexpression des gènes *ampC* et *bla*<sub>OXA51/OXA51like</sub> et diminue ainsi la sensibilité à la ceftazidime et aux carbapénèmes (Turton et *al.* 2006) (Héritier et *al.* 2006). La surexpression des gènes codant les pompes à efflux entraîne une diminution de la concentration des antibiotiques dans le cytoplasme de la bactérie. Par exemple, la surexpression de la pompe AdeABC diminue la sensibilité à la tigécycline et aux carbapénèmes. Pour avoir un haut niveau de résistance aux carbapénèmes, ce mécanisme doit être combiné avec une hydrolyse de l'antibiotique par une oxacillinase (Almasaudi, 2018).

*A. baumannii* peut aussi devenir résistant à de nombreux antibiotiques par modification de sa structure cellulaire. Une diminution du nombre de porines de la membrane externe diminue encore sa perméabilité aux antibiotiques. Par exemple, la perte de la protéine membranaire CarO entraîne une résistance à l'imipénème et au méropénème (Siroy et *al.* 2005). Dans l'étude de Fernández-Cuenca et *al.* 2003, une réduction de la production d'une PLP2 « Protéines Liant les Pénicillines » ou l'absence d'une protéine membranaire de 22.5 kDa entraîne la résistance aux carbapénèmes (Fernández-Cuenca et *al.* 2003). La modification des lipopolysaccharides entraîne une résistance à la colistine, et l'altération de la structure de l'ADN gyrase ou des topoisomères IV une résistance aux quinolones (Perez et *al.* 2007b).

Ainsi, la capacité d'*A. baumannii* à évoluer face à la pression de sélection des nouveaux antibiotiques explique en partie l'émergence et le succès de certaines lignées clonales (Woodford et *al.* 2011).

## 2-Résistance aux antiseptiques et aux biocides

Peu d'études se sont intéressées à la résistance d'*A. baumannii* aux antiseptiques. Une récente étude a démontré l'efficacité *in vitro* de la povidone iodée à 4% (Betadine scrub®), du gluconate de chlorhexidine à 0,5%, de l'alcool éthylique à 70% et d'un biocide à base d'ammoniums quaternaires, le chlorure de didecyldiméthylammonium (Surfanios®) sur 82 souches d'*A. baumannii* avec une réduction  $\geq 5 \text{ Log}_{10}$  lors d'une utilisation dans leur forme recommandée par le fabricant (Lanjri et al. 2017). Une autre étude réalisée par Cardoso et al. (1999) avait pour objectif de tester l'efficacité d'antiseptiques (alcool éthylique à 70%, povidone iodée à 10%, gluconate de chlorhexidine à 4% et savon doux liquide) sur des mains de volontaires sains qui avaient été préalablement contaminées artificiellement par *A. baumannii*. Deux expériences ont été réalisées : les mains ont été, soit faiblement contaminées ( $10^3$  UFC par doigt) soit fortement contaminées ( $10^6$  UFC par doigt). Dans la première expérience, les désinfectants ont été efficaces en éliminant la totalité de la population d'*A. baumannii* sur les mains. Dans la seconde expérience, la povidone iodée à 10% (le taux de réduction de la population d'*A. baumannii* sur les doigts de 98,49%) et l'alcool éthylique à 70% (98,93%) ont significativement été plus efficaces que le gluconate de chlorhexidine à 4% (91,36%) et le savon doux liquide (92,33%) ( $P < 0.05$ ). Cette étude démontre certes l'efficacité des désinfectants mais également ses variations en fonction du niveau de contamination initiale (Cardoso et al. 1999).

La résistance aux biocides a aussi été décrite dans plusieurs études qui se sont intéressées à l'efficacité de l'entretien de l'environnement hospitalier. Deux études ont montré l'efficacité de l'aspersion de peroxyde d'hydrogène par rapport à la désinfection avec un ammonium quaternaire, hypochlorite de sodium à 0,25% ou alcool à 70°. (Manian et al. 2011) (Otter et al. 2013). Dans l'étude de Manian et al. (2011), 26,6% des surfaces des chambres prélevées étaient contaminées après 4 tours de nettoyage/désinfection avec un ammonium quaternaire et de l'hypochlorite de sodium à 0,25% versus seulement 0,19% après entretien avec 1 tour de nettoyage/désinfection avec ces mêmes produits, suivi d'une aspersion avec du peroxyde d'hydrogène. Dans l'étude d'Otter et al. (2013), 47,6% des surfaces étaient contaminées par des BGN après un entretien à l'hypochlorite de sodium à 2000 ppm pour

les surfaces et avec des lingettes imprégnées d'alcool à 70° pour les dispositifs médicaux, et aucun des sites prélevés n'était contaminé après une aspersion par du peroxyde d'hydrogène.

D'autres études seraient nécessaires, en testant notamment l'efficacité des produits sur différents matériaux et sur la peau, afin d'avoir une vision plus globale de la résistance d'*A. baumannii* et donc de sa capacité à persister sur des surfaces inertes et vivantes.

### 3-Emergence de clones d'*A. baumannii* à haut risque épidémique et résistants

Parmi les pathogènes émergeant ces dernières décennies, *A. baumannii* est devenu un des plus fréquemment impliqué dans les IAS en unités de soins intensifs (Kempf et Rolain 2012). Des épidémies à *A. baumannii* sont décrites depuis les années 1980, (Peleg et al. 2008) (Villegas et Hartstein 2003), mais celles causées par des souches résistantes aux carbapénèmes sont décrites uniquement depuis 15 ans en France et en Europe (Zarrilli et al. 2009) (Kempf et Rolain 2012) (Poirel et al. 2003). La diffusion de souches d'*A. baumannii* multirésistantes entre les continents est notamment due à la mondialisation qui a permis la diffusion de certaines lignées clonales lors de voyages avec transmission de souches entre des centres hospitaliers éloignés géographiquement (Naas et al. 2007) (Peleg et al. 2006). Ainsi, dans l'étude de Bonnin et al. en 2013, les 8 souches d'*A. baumannii* NDM-1 provenant de patients de différentes villes françaises, précédemment hospitalisés en Afrique du Nord appartenaient toutes au ST85. Cette étude montre l'émergence mondiale des souches d'*A. baumannii* résistantes, et le rôle dans cette diffusion de la circulation internationale des patients lors de rapatriements sanitaires (Bonnin, 2013). De la même façon, Decousser et al 2013, ont décrit une épidémie d'*A. baumannii* NDM-1 de 7 patients en France dont le cas index est un patient précédemment hospitalisé en Algérie (Decousser et al. 2013).

Trois clones majeurs ont été caractérisés comme ayant un succès de diffusion international. Ils sont appelés les clones Européens I, II et III, puis renommés clones internationaux I, II et III (Van Dessel et al. 2004) (Peleg et al. 2008) (Diancourt et al. 2010). Les clones I et II ont d'abord diffusé dans le nord de l'Europe (Dijkshoorn et al. 1996) et ont diffusé dans différents pays comme le Royaume-Uni, l'Espagne, la France, les Pays-Bas et Israël (Turton et al. 2007). Le clone III a connu un succès de diffusion moins important, limité au bassin

méditerranéen et au Brésil (Nemec et al. 2004) (Zarrilli et al. 2013) (Zowawi et al. 2015). Ces clones ont d'abord été décrits par polymorphisme de longueur des fragments amplifiés ou « amplified fragment length polymorphism » (AFLP) avec un niveau de similitude de 80%, puis par ribotypage, électrophorèse en champs pulsé et enfin par MLST (Peleg et al. 2008). Deux schémas de MLST avec trois loci communs ont été décrits : celui d'Oxford (*gltA*, *recA*, *cpn60*, *gyrB*, *gdhB*, *rpoD*, et *gpi*) (Bartual et al. 2005) et celui de Pasteur (*gltA*, *recA*, *cpn60*, *fusA*, *pyrG*, *rpoB*, et *rplB*) (Diancourt et al. 2010) (<http://pubmlst.org/abaumannii/>) (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html>) (Woodford et al. 2011). Actuellement, 1962 ST et 1327 ST sont caractérisés respectivement dans le schéma d'Oxford et de Pasteur (<https://pubmlst.org/abaumannii/>).

Un schéma à trois gènes (*ompA*, *csuE*, *bla<sub>OXA-51like</sub>*) permettant une identification rapide des principales lignées clonales a aussi été proposé (Nemec et al. 2008) (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/AB/home.php>). Un séquençage unique du gène *bla<sub>OXA-51like</sub>* peut aussi être réalisé car ce gène est très discriminant. Dans l'étude de Hamouda et al. (2010), les auteurs ont étudié 44 souches provenant de 22 pays et chaque ST correspondait à un variant du gène *bla<sub>OXA-51like</sub>*. Cette méthode est rapide et permet d'affilier une souche aux lignées européennes mais reste une méthode moins fine que le MLST (Hamouda et al. 2010).

Dans le schéma « Pasteur », les 3 complexes clonaux CC1 (avec ST1, ST7, ST8, ST19 et ST20), CC2 (avec ST2, ST45 et ST47) et CC3 (ST3 et ST14) correspondent respectivement aux clones internationaux I, II et III. La majorité des clones épidémiques appartiennent aux CC1 et CC2 (Woodford et al. 2011). Dans le schéma « Oxford », les CC109, CC92 et CC187 correspondent respectivement aux clones I, II et III (Stietz et al. 2013). Les clones du CC2 du schéma de « Pasteur » que l'on retrouve dans le CC92 du schéma d'« Oxford » ont eu le plus grand succès de diffusion à travers le monde (Karah et al. 2012).

Ces deux schémas permettent d'identifier les 3 clones internationaux et peuvent donc être utilisés tous les deux à des fins épidémiologiques (Zarrilli et al. 2013). La grande variabilité de séquence des gènes *gpi* et *gyrB* du schéma « Oxford » rend ce dernier plus discriminant et apporte plus d'informations dans la description des épidémies locales par exemple à l'échelle d'un hôpital (Tomaschek et al. 2016).

#### 4-Quelles sont les raisons du succès épidémique d'*A. baumannii* ?

Selon la revue d'Almasaudi 2018, *A. baumannii* est une bactérie peu virulente. Différents facteurs de virulence sont décrits comme des endotoxines inhibant l'action des polynucléaires neutrophiles et des verotoxines ayant une activité N-glycosidase ciblant directement le ribosome et inhibant la synthèse protéique cellulaire puis entraînant la mort cellulaire (Almasaudi, 2018). D'autres facteurs lui permettent de survivre, comme l'hydrophobicité de sa surface cellulaire, lui permettant d'éviter la phagocytose et d'améliorer ses propriétés d'adhésion (Kurcik-Trajkovska, 2009) ou sa capacité à s'adapter à la pression de sélection des antibiotiques (Almasaudi, 2018). La clef du succès épidémique d'*Acinetobacter baumannii* ne semble donc pas due à sa virulence mais à sa capacité à persister dans l'environnement et donc à survivre dans des niches environnementales (Almasaudi 2018) (Beggs et al. 2006) ainsi qu'à sa capacité à s'adapter aux traitements anti-infectieux comme nous l'avons vu précédemment (Woodford et al. 2011).

#### Persistance d'*A. baumannii* sur les surfaces de l'hôpital

La persistance d'*A. baumannii* sur les surfaces peut s'expliquer par sa capacité à former du biofilm et à résister aux biocides. Ainsi, dans la revue de Longo et al. (2014), il a été montré que les souches d'*A. baumannii* MDR persistent et diffusent dans l'environnement du fait de leur capacité à former du biofilm sur les surfaces abiotiques et biotiques. *A. baumannii* peut survivre sur des surfaces abiotiques malgré des conditions de dessiccation en passant sous forme de « cellules dormantes » via des mécanismes affectant le contrôle du cycle cellulaire dans le biofilm (Gayoso et al, 2014). La survie dans l'environnement hospitalier peut aussi s'expliquer par la résistance aux biocides. La revue de Weber de 2013, décrit que, lors d'épidémies, 3 à 50 % des surfaces étaient contaminées par *Acinetobacter* spp. et remet en cause l'efficacité de l'entretien de l'environnement (Weber et al. 2013). De plus, une résistance aux ammoniums quaternaires, à l'hypochlorite de sodium à 0,2% et à 0,25%, et à l'alcool à 70°C a déjà été décrite dans cette espèce bactérienne (Manian et al. 2011) (Otter et al. 2013).

Des tests réalisés *in vitro* ont montré que la survie d'*A. baumannii* sur des surfaces sèches peut être très longue et aller jusqu'à 4 mois (Wendt et al. 1997). Ainsi, *A. baumannii* a été isolée sur des surfaces sèches et humides telles que des respirateurs, des monitorings, des humidificateurs, des bassines, des urinoirs, des lavabos, des tables de nuit, des structures de lit, des matelas et des oreillers (Almasaudi, 2018) (Raro et al. 2017) (Villegas et Hartstein 2003). *Acinetobacter* spp. peut persister sur différents types de matériaux, comme le papier filtre (7 jours), le Formica™ (3 jours), le coton (25 jours) et la glace (7 jours) (Beggs et al. 2006). L'étude de Nseir et al 2011 montre qu'il existe un risque 4,53 fois plus important d'acquérir une souche d'*A. baumannii* lorsque le patient est hospitalisé dans une chambre précédemment occupée par un patient colonisé/infecté par *A. baumannii* (Nseir et al. 2011). Ce risque est plus faible pour d'autres espèces bactériennes comme le décrit la revue de Mitchell et al. (2015), qui calcule un risque moyen de 2,14 pour un patient de contracter une IAS après avoir été hospitalisé dans la chambre d'un patient porteur ou infecté par des bactéries résistantes (Mitchell et al. 2015).

Lors d'une épidémie d'infections à *A. baumannii* impliquant 15 patients, les surfaces sèches ont joué un rôle de réservoir : la souche épidémique a été isolée sur la structure de lit d'un patient 9 jours après sa sortie (Catalano et al. 1999). Autre exemple, une souche *A. baumannii* ST208, ayant persisté pendant 1,5 an sur un matelas, a entraîné une épidémie impliquant 8 patients (Asai et al. 2014). Pour les surfaces humides, une souche résistante d'*A. baumannii* ST219 a persisté dans le système de distribution d'eau (brise jet, joint du mitigeur...) et a entraîné une épidémie de 15 patients en 1 mois (Umezawa et al. 2015).

### **Diffusion d'*A. baumannii* sur les surfaces de l'hôpital**

Les surfaces de l'environnement hospitalier apparaissent donc comme un réservoir et une source principale de contamination par *A. baumannii*. Mais sa diffusion peut être relayée par les mains des soignants qui peuvent favoriser la diffusion de souches épidémiques (Lee et al. 2011) (Karageorgopoulos et Falagas 2008) (Ferng et al. 2015). Par exemple, lors d'une épidémie impliquant 21 patients, *A. baumannii* a été isolée dans 3% des prélèvements de mains du personnel soignant et 36% des échantillons d'environnement (El Shafie et al. 2004). Les mains des soignants peuvent être contaminées directement en touchant les patients ou indirectement au contact d'une surface contaminée (Weber et al. 2010). De plus,

les bactéries du genre *Acinetobacter* appartiennent au microbiote cutané (Larson, 1981) (Towner, 2006) et l'espèce la plus fréquemment isolée dans cet écosystème n'est pas *A. baumannii* (0,5%) mais *Acinetobacter lwoffii* (47%) (Seifert et al. 1997). Les mains des soignants peuvent ainsi être des niches de multiplication des souches d'*Acinetobacter* spp. responsables d'IAS. Ainsi, afin de stopper la diffusion des *A. baumannii*, l'adhésion des soignants aux procédures d'hygiène des mains est essentielle afin de faire barrière aux cas de transmissions croisées via le manuportage (Karageorgopoulos et Falagas 2008). Cette barrière ultime avant contact avec le patient est d'ailleurs efficace pour tous les agents d'IAS.

## E- Potentiel infectieux et épidémique de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* est classé parmi les Pathogènes Résistants Opportunistes de la Plomberie et des Réseaux d'Eaux (PROPREs). Cette bactérie d'origine environnementale circule à l'hôpital aussi bien dans les canalisations que sur les surfaces (Venier et al. 2014) (Lupo et al. 2018). Elle est à l'origine, chez les patients les plus vulnérables, de cas d'infections comme des pneumopathies, des infections de plaies, des infections des sites opératoires, des infections urinaires, des bactériémies... et d'épidémies nosocomiales (Lyczak et al. 2000) (Walker et al. 2004) (Kerr et Snelling 2009) (Valenza et al. 2015).

### 1-Résistance aux antibiotiques

*P. aeruginosa* est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques et peut acquérir de nouvelles résistances, entraînant des échecs thérapeutiques (Breidenstein, et al. 2011). La résistance naturelle aux antibiotiques de *P. aeruginosa* est due à la combinaison d'une imperméabilité membranaire due à des porines peu perméables, à la présence de nombreuses pompes d'efflux et à la production constitutive de  $\beta$ -lactamases (Lupo et al. 2018).

La perméabilité membranaire de *P. aeruginosa* est 100 fois inférieure à celle d'*E. coli*. Les porines majoritaires OprF sont non spécifiques et seulement 5% sont en conformation ouverte (Hancock et Brinkman 2002). Mais la résistance aux antibiotiques est majoritairement due à des pompes à efflux de la famille RDN pour « resistance nodulation

cell division » qui utilisent un gradient de protons pour fonctionner (Hancock et Brinkman 2002). Au total, 12 types de pompes à efflux ont déjà été décrits chez *P. aeruginosa* dont quatre de type Mex pour multidrug efflux (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, et MexXY-OprM) (Dreier et Ruggerone 2015). MexAB-OprM est responsable de l'efflux des  $\beta$ -lactamines et des quinolones, MexCD-OprJ de celui des  $\beta$ -lactamines, MexEF-OprN de celui des quinolones et MexXY-OprM des aminoglycosides (Pang et al. 2019).

*P. aeruginosa* sécrète naturellement deux  $\beta$ -lactamases : une constitutive de type *bla*<sub>OXA-50</sub> jouant un rôle mineur dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines, et une céphalosporinase inductible de type *bla*<sub>AmpC</sub> qui entraîne une résistance aux aminopénicillines et aux céphalosporines de 1ère et 2ème générations (Girlich et al. 2004) (Lupo et al. 2018).

L'acquisition de nouvelles résistances peut se faire par mutation ponctuelle. Par exemple, Moya et al (2012) ont démontré une corrélation entre une mutation sur *dacB* (entraînant une surexpression de AmpC), la perte de l'expression des gènes codant PLP4 (Protéines liant les Pénicillines) et une résistance à l'imipénème, au ceftazidime et au ceftolozane qualifiée de « pan- $\beta$ -lactamine résistance » (Moyá et al. 2012).

L'acquisition de résistance peut aussi se faire par transferts horizontaux de gènes, c'est le cas des gènes codant des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu conférant un haut degré de résistance à la majorité des  $\beta$ -lactamines dont les pénicillines, les céphalosporines et l'aztréonam.

Les carbapénémases prédominantes sont de type OXA (Rawat et Nair 2010) mais six types de métallob- $\beta$ -lactamases dont les gènes sont portés par des éléments génétiques mobiles ont déjà été décrits chez *P. aeruginosa* : Imipénémase (IMP), Verona Integron-encoded Metallo- $\beta$ -lactamase (VIM), Sao Paulo Metallo- $\beta$ -lactamase (SPM), Germany IMipénémase (GIM), New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) et Florence IMipénémase (FIM) (Pang et al. 2019).

L'accumulation de ces mécanismes de résistance engendre des bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques mais aussi des mécanismes difficiles à décrypter sur les résultats d'un antibiogramme. Afin de mieux définir le niveau de résistance des souches de *P. aeruginosa*, une classification a été proposée. Les souches MDR « multidrug-resistant » sont résistantes à au moins un antibiotique de 3 classes, les souches XDR « extensively drug-resistant » sont résistantes à au moins un antibiotique de toutes les classes sauf une ou

deux. Les souches PDR « pandrug-resistant » sont résistantes à tous les antibiotiques. Les différentes classes d'antibiotiques prises en compte sont : aminoglycosides, carbapenemes, cephalosporines antipseudomonas, fluoroquinolones antipseudomonas, pénicillines combinées avec des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, monobactam, fosfomycine et colistine (Magiorakos et *al.* 2012).

## 2-Emergence mondiale de clones à haut risque épidémique

L'émergence de plusieurs clones épidémiques résistants aux antibiotiques et à diffusion mondiale a été mise en avant grâce à la détermination de la structure de la population de *P. aeruginosa* par MultiLocus Sequence Typing (MLST). Curran et al (2004) ont développé un schéma MLST basé sur le séquençage de 7 loci : *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, et *trpE* (Curran et *al.* 2004). Plusieurs génotypes comme les ST235, ST175, ST111, ST308, ST244 ont été nommés « Epidemic High-Risk » (EHR) étant considérés comme à haut risque épidémique (Mulet et *al.* 2013) (Treepong et *al.* 2018) (Slekovec et *al.* 2019). Bien que la majorité des génotypes EHR soit résistante aux antibiotiques, certaines souches de phénotype sensible aux antibiotiques ont aussi été décrites, mais la majorité des études s'intéresse aux souches résistantes aux antibiotiques (Cabot et *al.* 2012) (Treepong et *al.* 2018). L'implication de ces souches dans les infections nosocomiales et les épidémies hospitalières démontre l'importance de l'hôpital dans la diffusion de souches résistantes aux antibiotiques (Koutsogiannou et *al.* 2013) (Hishinuma et *al.* 2018) (Abdouchakour et *al.* 2018). Une étude multicentrique réalisée sur une période d'un an dans 6 centres hospitaliers français et qui avait comme objectif de caractériser des souches de *P. aeruginosa* responsables de bactériémies ou d'infection pulmonaire a permis de démontrer que des ST à diffusion internationale, résistants aux antibiotiques (ST235, ST175, ST111, ST308, ST244, ST395 et ST253) circulaient dans les hôpitaux français (Slekovec et *al.* 2019).

Le génotype ST235 est celui qui a eu la diffusion la plus large sur les cinq continents (Figure 11) (Oliver et *al.* 2015). Il est associé à l'émergence de souches de *P. aeruginosa* résistantes aux antibiotiques. Plusieurs études ont démontré que les souches de *P. aeruginosa* résistantes appartenaient majoritairement au type ST235. Par exemple, Kitao et *al.* (2012)

ont montré que 88,3 % des souches résistantes aux carbapénèmes, aux aminoglycosides, et aux fluoroquinolones isolées dans leur étude appartenaient au ST235 (Kitao et al. 2012). Miyoshi-Akiyama et al, (2017) ont analysé par séquençage complet du génome 185 souches cliniques de *P. aeruginosa* résistantes aux antibiotiques dont 136 appartenaient au type ST235 (soit 73,5%). L'analyse phylogénétique a pu montrer que les souches ST235 se divisaient en sept subclades associés à différents gènes de résistances aux antibiotiques comme *bla*<sub>TEM</sub> ou *bla*<sub>OXA-2</sub>. L'émergence mondiale du ST235 serait due à la plasticité de son génome lui permettant d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi plus de 100 différents transferts horizontaux de gènes impliquant majoritairement des intégrons et 39  $\beta$ -lactamases différentes ont déjà été rapportés (Mulet et al. 2013) (Brüggemann et al. 2018) (Treepong et al. 2018). L'émergence de cette séquence type coïncide avec l'utilisation des fluoroquinolones (péfloxacine, ofloxacine et ciprofloxacine), qui auraient donc assuré une pression de sélection. De plus, un facteur de virulence l'exoenzyme U (ExoU), est associé à ce ST. Il s'agit d'une phospholipase qui agit sur le surfactant pulmonaire dipalmitoyl phosphatidylcholine et dégrade la membrane cellulaire, contribuant ainsi à la dissémination des bactéries du tissu pulmonaire au tissu sanguin, entraînant des bactériémies et des chocs septiques (Khalifa et al. 2011) (Treepong et al. 2018).

Pour le génotype ST111, qui a connu une diffusion mondiale, excepté en Océanie (Figure 11) (Oliver et al. 2015), son émergence serait aussi liée à la plasticité de son génome. Cependant, un plus petit nombre de transferts horizontaux de gènes avec aussi majoritairement une implication des intégrons et  $\beta$ -lactamases a déjà été décrit, au total respectivement 39 et 14 (Oliver et al. 2015). La plasticité du génome du ST175, dont la diffusion est limitée à l'Europe et au Japon (Figure 11) (Oliver et al. 2015) a aussi été étudiée. Seulement 8 transferts horizontaux de gènes ont été décrits (Oliver et al. 2015) et sa résistance aux antibiotiques est associée à des mutations entraînant une inactivation de la porine de OprD, une hyperproduction de  $\beta$ -lactamase de type AmpC, et/ou une surproduction des pompes à efflux de type OprM (Cabot et al. 2012).

Pour les types ST111 et ST175, un facteur de virulence est associé : l'exoenzyme S (ExoS). Cette enzyme a un effet cytotoxique (Khalifa et al. 2011) (Oliver et al. 2015).

Le ST308 a diffusé en Europe (Willmann et al. 2015) (Abdouchakour et al. 2018), dans le bassin méditerranéen (Chairat et al. 2019) et en Amérique du Sud (Neves et al. 2019).

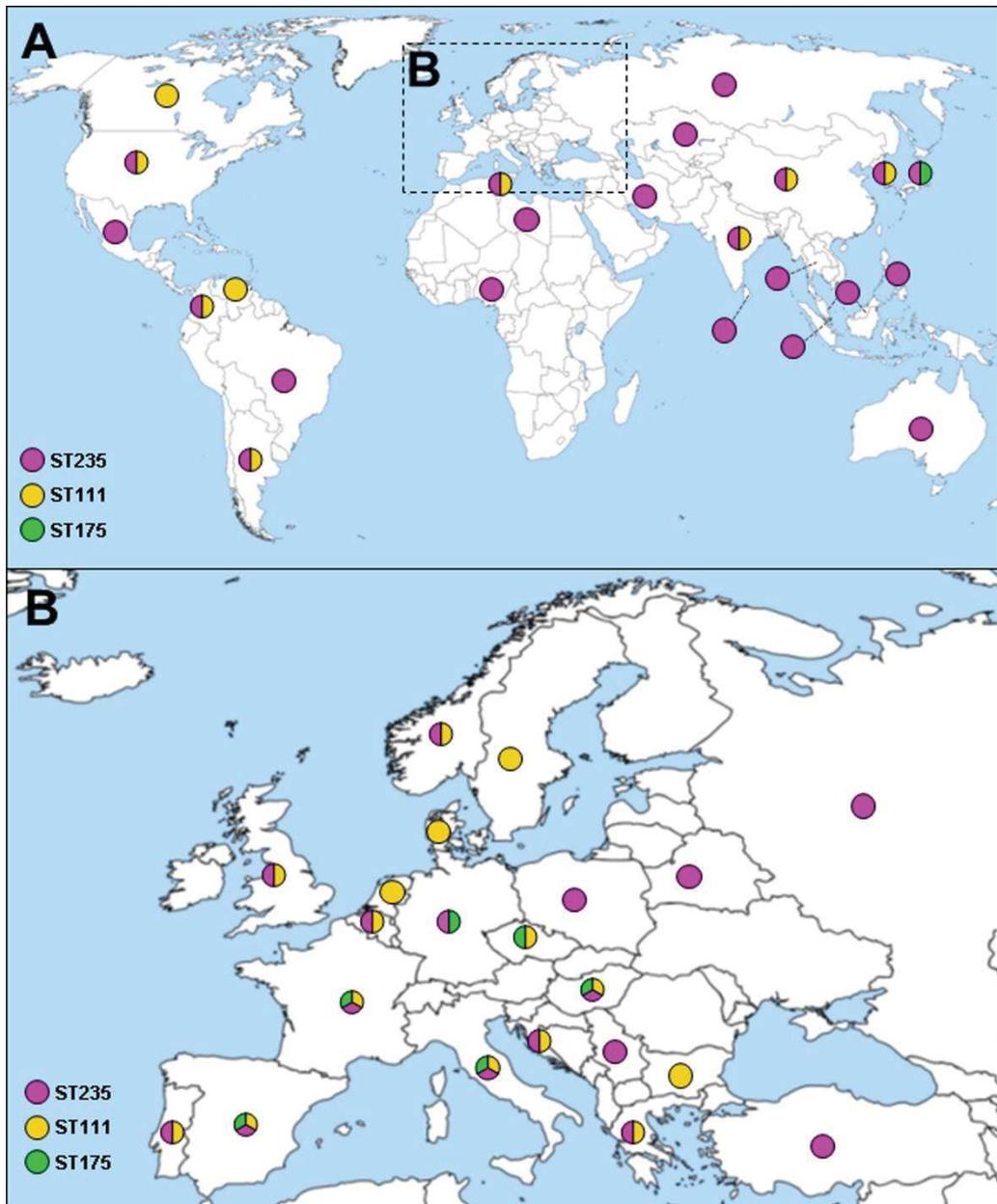
Le ST244 a diffusé en Asie (Chen et *al.* 2014), en Amérique du Sud (de Oliveira Santos et *al.* 2019) et en Europe (Slekovec et *al.* 2019).

Le ST395 a diffusé en Europe (Petitjean et *al.* 2017) (Slekovec et *al.* 2019) et dans le bassin méditerranéen (Chairat et *al.* 2019). Et Le ST253 a diffusé en Europe (Slekovec et *al.* 2019), en Australie (Davis et *al.* 2015) et en Asie (Sun et *al.* 2016). Cependant, certains auteurs considèrent que les deux génotypes ST395 et ST253 ne sont pas à haut risque épidémique malgré leur diffusion mondiale. Oliver et *al.* (2015) les caractérisent comme « wide-spreaders » (WS).

Mulet et *al.* (2013), ont comparé des marqueurs biologiques de 20 souches XDR de ST à émergence mondiale (ST235, ST111, ST175) à 20 souches sensibles ou MDR. Ils ont démontré que les souches résistantes émergentes étaient significativement ( $p < 0.01$ ) associées à une formation de biofilm plus importante, une mobilité de type twitching, swimming et swarming réduite, une réduction de la production de pigments de type pyoverdine et pyocyanine, et une diminution du fitness. La capacité supérieure à former du biofilm pour les souches EHR pourrait en partie expliquer la persistance de ces souches dans l'environnement et donc leur implication dans des phénomènes épidémiques (Mulet et *al.* 2013). Ainsi, pour les génotypes EHR ST235, ST175, ST111, leur capacité à acquérir de nouveaux mécanismes de résistance grâce à la plasticité de leur génome est à l'origine de leur émergence en tant que génotypes à haut risque épidémique mais d'autres facteurs seraient à prendre en compte, en particulier leur capacité à persister dans l'environnement grâce à leur capacité à former du biofilm.

Cette capacité à persister dans l'environnement hospitalier et à entraîner des épidémies a aussi été décrite pour les génotypes ST308 (Abdouchakour et *al.* 2018) et ST395 (Quick et *al.* 2014) où le réseau d'eau des services de soins a été colonisé par plusieurs de ces génotypes et des cas de transmission : eau – patients ont été démontrés. Dans l'étude de Abdouchakour et *al.* (2018), les auteurs ont aussi suggéré que le succès de persistance et

d'adaptation du clone ST308 dans le réseau d'eau était dû à la diversification génomique et phénotypique des souches.

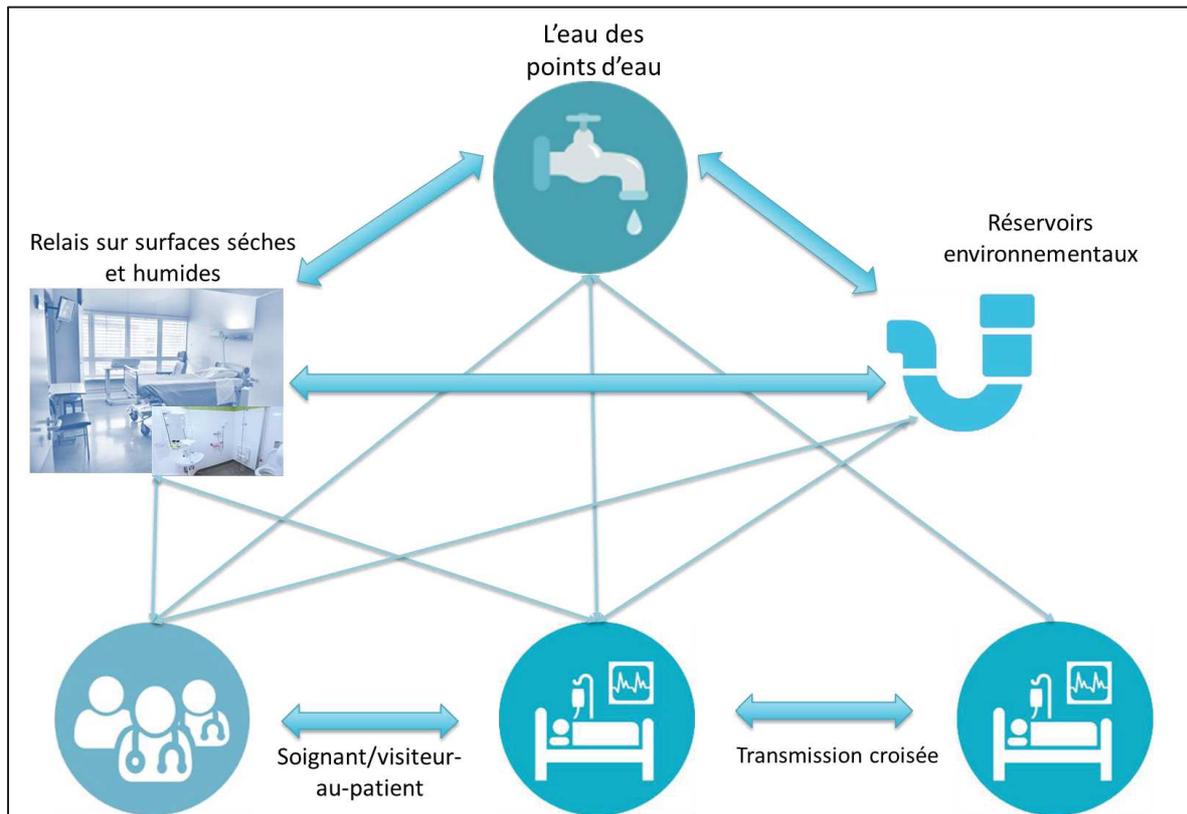


**Figure 11 :** Représentation de la diffusion mondiale des clones à haut risque épidémique de *P. aeruginosa*. La première carte (A) représente la diffusion mondiale et la deuxième (B) zoome sur l'Europe. Le ST235 est représenté en rose, le ST111 en jaune et le ST175 en vert (Oliver et al. 2015).

### 3- *P. aeruginosa* : une bactérie de l'environnement hospitalier

A l'hôpital, les patients peuvent développer une IAS à *P. aeruginosa* par voie endogène (Berthelot et al. 2001) ou par voie exogène (Coppry et al. 2019), soit par transmissions croisées via le manuportage entre deux patients ou entre l'environnement et le patient (Bertrand et al. 2003) (Johnson et al. 2009) (Cholley et al. 2010), soit directement à partir de l'environnement. Concernant la voie endogène, plusieurs études ont montré qu'entre 11,6% à 43% des patients en service de réanimation étaient colonisés au niveau digestif par *P. aeruginosa* à leur admission (Gómez-Zorrilla et al. 2015) (Harris et al. 2016) (Hoang et al. 2018). La transmission par l'environnement peut être directe ou indirecte à partir de l'eau pour les soins (Romano et al. 2013) (Costa et al. 2015) (Garvey et al. 2018) ou d'une surface contaminée qui sert de relais à la circulation/ transmission de *P. aeruginosa* (Bicking Kinsey et al. 2017). Le mode de transmission via l'environnement de soins est développé dans les parties ci-dessous.

De plus au sein d'un service de soins, il existe de nombreux réservoirs, lieux où des microorganismes persistent et se multiplient. Ces réservoirs peuvent être humains (patient ou personnel soignant/visiteurs) ou environnementaux. Le personnel soignant et les visiteurs peuvent aussi être contaminés par *P. aeruginosa*. Ainsi il a été décrit qu'entre 1,47 et 8,2% des individus sains étaient colonisés au niveau digestif par *P. aeruginosa* (Estepa et al. 2014) (Valenza et al. 2015) (Ruiz-Roldán et al. 2018) et pourraient transmettre leurs microorganismes aux patients. Les réservoirs environnementaux seront détaillés ci-dessous. Parmi ces réservoirs, on retrouve le réseau d'eau, l'eau étant le milieu naturel de vie de *P. aeruginosa*, et les surfaces humides et sèches de l'environnement de soins (Bicking Kinsey et al. 2017). Afin de montrer la complexité de la transmission/circulation de *P. aeruginosa* dans les services de soins, la figure 12 schématise les possibles circuits de transmission/circulation de *P. aeruginosa*.



**Figure 12 :** Cycle de transmission/ circulation de *P. aeruginosa* au sein d'un service de soins

### Transmission de souches d'origine hydrique à l'homme

Une étude multicentrique française a été menée dans 10 services de soins intensifs hors période épidémique (Venier et al. 2014). Elle avait comme objectif d'identifier les facteurs de risque d'acquisition de *P. aeruginosa* pour les patients hospitalisés. 1314 patients ont été inclus dans cette étude et 34% se sont positivés à *P. aeruginosa* pendant leur hospitalisation. 17% de l'eau des points d'eau étaient contaminés par *P. aeruginosa*. Dans cette étude, les auteurs ont pu démontrer que l'eau d'un point d'eau contaminé par *P. aeruginosa* dans la chambre d'un patient était un facteur de risque d'acquisition de *P. aeruginosa* ( $p < 0,02$ ) (Venier et al. 2014). Le travail de cette étude multicentrique française a été poursuivi afin de déterminer l'origine de la contamination des patients à *P. aeruginosa*. Ils ont pu démontrer que dans 45,6 % des cas, la contamination des patients était d'origine exogène et que dans 17,1% des cas, l'eau d'un point d'eau à proximité était la source de la contamination du patient (Coppay et al. 2019). Cette association entre la contamination de l'eau des points d'eau par *P. aeruginosa* et le nombre de cas d'infection à *P. aeruginosa* a aussi été étudiée

dans un CHU français par Lefebvre et *al.* (2017). Ils ont pu démontrer cette association dans les services d'hématologie et de soins intensifs mais pas dans les services de médecine accueillant des patients à moindre risque infectieux ( $p < 0.001$ ). Ainsi l'eau du réseau contaminée entraînerait une augmentation du taux d'infection à *P. aeruginosa* dans les services accueillant des patients à risque mais n'aurait pas d'incidence significative sur les autres patients (Lefebvre et *al.* 2017).

La transmission directe de *P. aeruginosa* de l'eau d'un point d'eau contaminé au patient a été démontrée dans plusieurs études à travers la description de contamination chez des cas sporadiques ou lors de phénomènes épidémiques (Reuter et *al.* 2002) (Romano et *al.* 2013) (Costa et *al.* 2015) (Garvey et *al.* 2018) (Coppry et *al.* 2019). Par exemple, la transmission directe d'une souche de *P. aeruginosa*, lors de la douche préopératoire d'un patient, a entraîné une bactériémie sur cathéter veineux périphérique. La souche clinique présentait le même profil ECP que la souche isolée dans l'eau de la douche, prouvant ainsi que l'eau du point d'eau était la source directe de l'infection (Romano et *al.* 2013).

### **Le réseau d'eau : réservoir de *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* peut survivre sur des surfaces abiotiques sous forme de biofilm, permettant à la bactérie de se protéger des facteurs de stress (Harmsen et *al.* 2010). A l'hôpital, la restructuration des bâtiments, la non-utilisation de certains points d'eau et le système de plomberie constituent de nombreux bras morts avec une stagnation de l'eau propice à l'installation de biofilm et à l'accumulation de matières organiques, sources de nutriments pour la communauté bactérienne du réseau d'eau (Exner et *al.* 2005) (Loveday et *al.* 2014).

Afin de pallier la formation de biofilm dans les canalisations d'eau, certains hôpitaux se sont dotés d'un réseau d'eau en cuivre car ce matériau limite l'installation du biofilm. En effet par un mécanisme appelé « contact killing », lorsque la bactérie entre en contact avec une surface en cuivre, cela provoque la mort de la bactérie par plusieurs mécanismes dont la détérioration de la membrane cellulaire par peroxydation des lipides (Hans et *al.* 2015). Mais certains clones bactériens comme ST395 ou ST308 possèdent des gènes codant une résistance aux ions cuivre (Petitjean et *al.* 2017) (Jeanvoine et *al.* 2019). Petitjean et *al.* (2017) ont conclu dans leur étude que cette résistance aurait facilité l'implantation du

génotype ST395 dans le réseau d'eau et provoqué des cas de transmission de *P. aeruginosa* de l'eau au patient.

Une autre solution, afin de réduire la contamination du réseau d'eau et éliminer le biofilm, est de réaliser des chocs thermiques ou des traitements par des biocides dans le système de la tuyauterie (Exner et al. 2005). Mais la succession de ces différents traitements peut entraîner l'émergence de certaines espèces bactériennes ou lignées de clones (Abdouchakour et al. 2015).

### **Les points d'eau : un système sous forme de cycle propre-sale**

En plus de la configuration intrinsèque du réseau d'eau qui entraîne la formation de biofilm, le point d'eau peut aussi être une zone où le biofilm à *P. aeruginosa* peut s'installer. Ainsi, certains matériaux constitutifs des éléments de plomberie comme le silicone ou l'éthylène-propylène-diène monomère (EPDM) sont des matériaux favorables à la formation de biofilm (Halabi et al. 2001) (Exner et al. 2005) (Moore et al. 2015) (Walker et al. 2014). Afin de limiter la formation de biofilm au sein des points d'eau, leur entretien régulier doit être réalisé. Mais certaines souches de *P. aeruginosa* se sont révélées résistantes aux biocides (Lavenir et al. 2008) (Tschudin-Sutter et al. 2011).

De plus, la complexification des éléments de plomberie peut favoriser l'installation de biofilm. Par exemple, de nombreux hôpitaux se sont dotés de robinets à cellule automatique, car les poignées de robinet étaient considérées comme des objets relais susceptibles de se contaminer et de devenir des réservoirs de bactéries (Bures et al. 2000). Mais ce système automatique entraîne une complexification de l'intérieur du robinet, propice à la formation de biofilms, au niveau proximal du point, susceptibles de libérer ensuite des bactéries dans le réseau d'eau. Ce type de robinet à cellule n'est donc plus recommandé dans les hôpitaux (Halabi et al. 2001) (Merrer et al. 2005) (Zingg et Pittet 2012).

Une autre solution afin de pallier la contamination de l'eau pourrait être de remplacer ou de décontaminer régulièrement les éléments de plomberie des points d'eau comme le robinet, le brise-jet et le siphon. Dans l'étude de Garvey et al. (2019), 30% des robinets étaient contaminés par *P. aeruginosa*. L'analyse des souches isolées par séquençage total des

génomés a montré que 30% des cas d'infections étaient reliés à une transmission directe d'un point d'eau au patient. Après changement des robinets, aucun point d'eau n'était contaminé et le taux d'infection à *P. aeruginosa* a chuté de 50% (Garvey et al. 2019).

Les ES peuvent aussi se doter de filtres antimicrobiens pour sécuriser les points d'eau les plus proches des patients dans les services les plus à risques et éviter la transmission de souches hydriques aux patients. L'efficacité sur le taux d'IAS des filtres antimicrobiens a déjà été prouvée par plusieurs études (Trautmann et al. 2008) (Loveday et al. 2014). Mais ces filtres antimicrobiens présentent une limite car leurs surfaces peuvent elles-mêmes se contaminer et devenir un réservoir de bactéries (Garvey et al 2016).

En effet les points d'eau constituent un système où le « propre » et le « sale » se côtoient. En amont de ce système, on retrouve l'eau du point d'eau : le « propre », et en aval le siphon : «le sale » (Kotay et al . 2017). Lors de l'utilisation d'un point d'eau, par exemple pour le lavage des mains, les mains vont être au centre de ce système : les mains des soignants « sales » avant lavage puis « propres » après lavage. Ainsi, des microorganismes présents dans l'eau, sur les mains et dans le siphon peuvent contaminer par éclaboussures les surfaces du point d'eau et ces surfaces du point d'eau constituent alors un réservoir de microorganismes. L'aérosolisation des bactéries colonisant les siphons et la contamination du point d'eau et de ses alentours ont été démontrées et modélisées dans une étude sur point d'eau expérimental (Kotay et al. 2017). Ces réservoirs peuvent être la source de transmissions croisées ou de phénomènes épidémiques (Davis et al. 2015) (Clarivet et al. 2016).

Lors d'une épidémie impliquant 12 patients sur une durée 11 mois dans un service de soins intensifs de néonatalogie, afin de rechercher un réservoir environnemental et une éventuelle source de la contamination, des prélèvements de surfaces ont été réalisés autour des points d'eau du service et de l'environnement proche des patients colonisés comme les poignées de portes, les téléphones... Sept souches de *P. aeruginosa* ont été isolées. Pour ces souches cliniques et environnementales, le ST a été déterminé et un séquençage total a été réalisé. Les souches cliniques appartenaient au ST253 et étaient identiques. Deux souches environnementales isolées sur deux lavabos différents appartenaient aussi au ST235. Ces souches présentaient 9 et 45 SNPs avec les souches cliniques démontrant le lien génétique

entre certaines souches environnementales et cliniques et donc le rôle des points d'eau dans cette épidémie (Davis et *al.* 2015).

### **Les surfaces hospitalières : réservoir /relais de transmission de *P. aeruginosa***

Les surfaces du point d'eau peuvent donc constituer un réservoir/relais dans le cycle de transmission de *P. aeruginosa*. De plus, des souches de *P. aeruginosa* présentes dans l'eau et sur le point d'eau peuvent diffuser directement par éclaboussure sur une surface éloignée du point d'eau ou indirectement via le manuportage ou via l'entretien de l'environnement. Ce type de diffusion dans l'environnement de soins a été à l'origine de cas de transmissions croisées et de phénomènes épidémiques (Engelhart et *al.* 2002) (Lanini et *al.* 2011) (de Abreu et *al.* 2014) (Bicking Kinsey et *al.* 2017). Ainsi, lors d'une épidémie d'infections à *P. aeruginosa* d'un an dans un service de soins intensifs de néonatalogie impliquant 31 patients et entraînant le décès de 3 patients, une enquête environnementale a été menée afin de rechercher la source de contamination des patients (Bicking Kinsey et *al.* 2017). Quarante-deux prélèvements ont été réalisés dans l'environnement proche des patients comme les respirateurs, les tire-laits... 67% des surfaces prélevées étaient contaminées par *P. aeruginosa* et 84% des 32 prélèvements d'eau dans les chambres des patients étaient positifs à *P. aeruginosa*. Une analyse par ECP des souches cliniques et environnementales a été réalisée et a permis de distinguer 4 groupes comprenant des souches cliniques et environnementales. Deux patients étaient infectés par une souche ayant en ECP 100% d'homologie avec les souches isolées sur les surfaces de leurs chambres (tablette murale et surface du lavabo). Les auteurs ont conclu que cette épidémie avait pour origine les surfaces de l'environnement et que l'eau du réseau était le réservoir de l'épidémie (Bicking Kinsey et *al.* 2017).

A l'hôpital, l'eau est aussi utilisée pour l'entretien et/ou le fonctionnement de matériels médicaux comme par exemple les endoscopes, les appareils de dialyse, les appareils de circulation extracorporelle et la contamination de ce matériel médical peut également entraîner des IAS (Diaz-Granados et *al.* 2009) (Kovaleva, 2016) (Guimarães et *al.* 2016) (Kumarage et *al.* 2019).

Ces différents exemples montrent bien le lien entre le réseau d'eau, les points d'eau et les surfaces de l'hôpital et donc la nécessité de s'intéresser aux surfaces potentiellement contaminées par l'eau pour mieux comprendre la transmission des PROPRES agents d'IAS et en particulier, la transmission de *P. aeruginosa*.

# Partie expérimentale

Comme nous avons pu le détailler dans la synthèse bibliographique, l'environnement de soins est un relais/réservoir d'agents responsable d'IAS et mieux comprendre leurs circuits de diffusion dans ce contexte s'avère indispensable.

L'objectif de ce travail expérimental était de mieux caractériser les circuits de diffusion des agents responsable d'IAS sur les surfaces de soins en intégrant toute la diversité génétique et phénotypique des populations bactériennes.

Dans ce travail expérimental, deux types de sources de contamination des surfaces de l'environnement hospitalier ont été prises pour modèle d'étude :

- la contamination d'origine hydrique par des Pathogène Résistant Opportuniste de la Plomberie et des Réseaux d'Eaux (PROPRES) avec en chef de file *P. aeruginosa*
- la contamination d'origine humaine par des bactéries résistantes aux antibiotiques, productrices de carbapénèmases (BPC) colonisant ou infectant les patients, telles que *A. baumannii* et les entérobactéries.

Dans la première partie expérimentale, la circulation des PROPRES entre l'eau des points d'eau, les surfaces hospitalières et les patients a été étudiée dans deux services de soins différents : un service d'hématologie (patients à haut risque infectieux) et un service d'oto-rhino-laryngologie (ORL) (patients à risque standard). En effet, chaque service présente des particularités, dues au risque infectieux des patients pris en charge, à la sécurisation ou non des points d'eau par des filtres antimicrobiens, et à l'organisation même du service avec des facteurs humains propres à chaque unité.

Dans la deuxième partie expérimentale, la circulation des bactéries d'origine humaine entre les patients et les surfaces de soins a été étudiée dans deux situations : lors de l'accueil de patients sporadiquement porteurs/infectés par une BPC, c'est-à-dire hors contexte épidémique, et lors d'une épidémie de BPC impliquant 4 espèces de BPC circulant entre 6 patients.

Dans les deux parties expérimentales, la stratégie d'étude est commune et fait l'originalité de notre travail qui associe : i) l'observation de situations réelles sur le terrain qui guide l'échantillonnage microbiologique de l'environnement des services et des patients ; ii) la définition des habitats et la reconstitution des circuits de diffusion des bactéries d'intérêt par typage moléculaire ; iii) l'analyse génétique des populations bactériennes et de leurs traits adaptatifs afin d'argumenter les comportements bactériens observés (en particulier le succès de diffusion et le succès épidémique). Il s'agit donc d'un travail qui va de l'observation des pratiques d'hygiène hospitalière jusqu'à des aspects de microbiologie fondamentale et ce, dans le but d'optimiser la maîtrise du risque nosocomial lié à l'environnement hospitalier sur des bases argumentées.

**Partie I : Diffusion et persistance**  
**de bactéries d'origine hydrique**  
**sur les surfaces des unités de**  
**soins**

## I) Contexte général et objectifs

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la diffusion sur les surfaces hospitalières des Pathogènes Résistants Opportunistes de la Plomberie et des Réseaux d'Eaux (PROPRES) correspondant aux Opportunistic Premise Plumbing Pathogens (OPPPs) de la littérature anglo-saxonne.

Le réseau d'eau et les points d'eau des hôpitaux peuvent être contaminés par des PROPRES, ou OPPPs (Wang et *al.* 2017b). Ces souches, d'origine hydrique, peuvent être transmises aux patients (Venier et *al.* 2014) (Lefebvre et *al.* 2017). Parmi les PROPRES, *P. aeruginosa* fait partie des cinq premières bactéries les plus fréquemment isolées dans les IAS en Europe et en France (ECDC 2019) (SF2H 2018a). Afin de limiter la transmission aux patients de souches hydriques comme *P. aeruginosa*, des filtres antimicrobiens peuvent être positionnés sur les points d'eau, créant une barrière physique de protection des patients.

Selon les dernières recommandations de la Société Française d'Hygiène Hospitalière, pour les patients à risque élevé d'infection bactérienne, il est recommandé de filtrer les points d'eau utilisés par le patient pour maîtriser le risque d'infection aux PROPRES. Ces patients sont « les patients d'hématologie, quel que soit leur statut immunitaire », « les patients allogreffés de moelle ou de cellules-souches périphériques » et « les patients présentant une neutropénie profonde (<200 polynucléaires neutrophiles) et/ou prolongée (>10 jours) » (SF2H 2016). Cette recommandation ne prend en compte que l'exposition directe du patient aux PROPRES du point d'eau mais la circulation des bactéries hydriques hors du réseau d'eau, via la contamination des surfaces, n'est pas prise en compte alors que ces surfaces sont des réservoirs/relais dans la transmission pouvant entraîner des IAS ou des épidémies nosocomiales notamment à *P. aeruginosa* (Davis et *al.* 2015) (Bicking Kinsey et *al.* 2017). Les routes de transmission des agents d'IAS entre l'eau et le patient ne sont pas encore bien identifiées (Loveday et *al.* 2014) (Willmann et *al.* 2015). Il apparaît donc nécessaire de mieux comprendre la circulation des PROPRES, hors réseau d'eau, sur les surfaces de l'hôpital afin d'ajuster les mesures de maîtrise du risque d'IAS lié aux PROPRES.

L'objectif de notre étude était d'évaluer la circulation secondaire (hors réseau d'eau) et la diffusion de *P. aeruginosa* sur les surfaces des unités de soins afin d'évaluer le risque de contamination des patients.

Pour répondre à cet objectif, deux services de soins ont été inclus dans l'étude. Ces services diffèrent par les patients qu'ils accueillent, leurs pratiques de soins, leur organisation et la protection microbiologique des points d'eau. Ces deux services-modèles sont un service d'hématologie et un service d'oto-rhino-laryngologie (ORL). Dans le service d'hématologie, les patients sont particulièrement vulnérables aux infections à *P. aeruginosa*, c'est pourquoi l'eau des points d'eau de soins en contact avec les patients est filtrée. Dans le service d'ORL, les patients sont considérés comme à risque standard d'infections graves à *P. aeruginosa* et l'eau des points d'eau n'est pas filtrée.

Lors de l'étude de ces deux services modèles, une stratégie commune a été adoptée, s'appuyant sur une phase d'observation des pratiques de soins, permettant de définir des circuits de circulation de l'eau sur les surfaces de soins dans le service puis sur une analyse de la circulation des souches hydriques au sein des circuits définis lors de la phase d'observation. Enfin, les cas d'infections chez les patients hospitalisés, pour les deux services, ainsi que les cas de portage uniquement pour le service d'ORL, ont été recensés. En cas d'infection ou de colonisation à *P. aeruginosa*, une enquête environnementale a été effectuée afin de mieux comprendre la circulation de *P. aeruginosa* entre le patient et l'environnement.

## II) Cartographie de la circulation des PROPRES dans un service avec des points d'eau protégés par des filtres antibactériens

### Contexte du service d'hématologie et du CHU de Montpellier

Entre 2005 et 2010, six épidémies causées par *P. aeruginosa* ont concerné différents sites du CHU de Montpellier : l'hôpital St Eloi, l'hôpital Gui de Chauliac et l'hôpital Lapeyronie. Elles ont eu lieu dans les services les plus à risques accueillant des patients immunodéprimés : hématologie clinique et 4 réanimations : traumatologique, neurologique, métabolique et des grands brûlés. Pendant cette période épidémique, 399 souches de *P. aeruginosa* provenant des patients et de l'environnement hydrique hospitalier ont été étudiées par MLST. *P. aeruginosa* ST308 représentait à lui seul 34% des souches isolées (Abdouchakour, 2016).

En 2010, la mise en place de filtres antibactériens terminaux sur les points d'eau a permis l'arrêt des épidémies, prouvant en conditions réelles que le réservoir environnemental était la source majeure des épidémies d'IAS à *P. aeruginosa* ST308 à Montpellier. Mais des cas sporadiques d'infections ou de colonisations à *P. aeruginosa* ST308 ont subsisté. Ainsi en 2013, un patient du service d'hématologie adulte a déclaré une bactériémie à *P. aeruginosa* ST 308, malgré la présence de filtres antibactériens aux différents points d'eau de ce service, suggérant l'existence de circuits de transmission autres que la contamination directe à partir d'un point d'eau et l'existence de circuits secondaires de circulation de *P. aeruginosa* hors du réseau d'eau.

Dans le service d'hématologie, les patients hospitalisés sont particulièrement vulnérables aux infections, comme celles à *P. aeruginosa*, notamment du fait de leurs traitements immuno-suppresseurs tels que les chimiothérapies, une hospitalisation de longue durée et l'utilisation de dispositifs médicaux invasifs (Viasus et al. 2019). C'est pour cela que le réseau est partiellement protégé par des filtres anti-microbiens : 52 points d'eau filtrés (sur 73 points d'eau) positionnés sur les points d'eau exposant directement les patients (chambres ou utilisés pour les soins) afin de constituer une barrière à la diffusion de *P. aeruginosa*. La contamination de l'eau du réseau d'eau est surveillée de façon trimestrielle par le LEMH

(laboratoire d'écologie microbienne hospitalière) du CHU de Montpellier. Selon les résultats précédemment collectés par le LEMH, il a été montré que ce réseau d'eau présente une contamination par un faible inoculum de plusieurs populations (génotypes) de *P. aeruginosa* et d'autres bactéries hydriques appartenant en particulier au genre *Pseudomonas*.

**Article 2: Tracking the spread routes of opportunistic premise plumbing pathogens in a haematology unit with water points-of-use protected by antimicrobial filters**

Baranovsky S. , Jumas-Bilak E. , Lotthé A. , Marchandin H. , Parer S. , Hicheri Y., Romano-Bertrand S.

The Journal of hospital infection, 2018 Jan;98(1):53-59.



# Tracking the spread routes of opportunistic premise plumbing pathogens in a haematology unit with water points-of-use protected by antimicrobial filters

S. Baranovsky<sup>a,b</sup>, E. Jumas-Bilak<sup>a,b</sup>, A. Lotthé<sup>a,b</sup>, H. Marchandin<sup>b,c</sup>,  
S. Parer<sup>a,b</sup>, Y. Hicheri<sup>d</sup>, S. Romano-Bertrand<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Département d'Hygiène Hospitalière, CHU Montpellier, Montpellier, France

<sup>b</sup> UMR5569 HydroSciences Montpellier, Equipe «Pathogènes Hydriques Santé Environnements», Faculté de Pharmacie, Montpellier, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Bactériologie CHU Nîmes, Nîmes, France

<sup>d</sup> Département d'Hématologie Clinique, CHU Montpellier, Montpellier, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 18 May 2017

Accepted 24 July 2017

Available online 29 July 2017

### Keywords:

Healthcare-associated infection

Haematology

*Pseudomonas aeruginosa*

Waterborne bacteria

Hospital water use

Antimicrobial filter



CrossMark

## SUMMARY

**Background:** Water networks in hospitals are frequently contaminated by opportunistic premise plumbing pathogens (OPPPs) leading to installation of antimicrobial filters on water points-of-use (POU) in order to limit patients' exposure.

**Aim:** To assess the spread of OPPPs through secondary water routes (outside the plumbing system) in an adult haematology unit in which 52 out of 73 water POU were high risk for patients and protected by antimicrobial filters.

**Methods:** An observational audit identified six secondary water routes for which bacteria tracking and typing were performed in 315 surface samplings. Bacterial isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and compared to the infra-species level by multiplex repetitive element sequence-based polymerase chain reaction and/or by restriction fragment length polymorphism in pulse-field gel electrophoresis.

**Findings:** *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*, as well as non-pathogenic OPPP indicators, were detected in water collected upstream of antimicrobial filters. *P. aeruginosa* was the sole OPPP retrieved from tested surfaces (5.1%). The same clone of *P. aeruginosa* spread from water source to dry surfaces in the same room and cross-contaminated two sinks in different rooms. Three clones of non-pathogenic OPPP indicators spread more widely in different rooms.

**Conclusion:** A strategy based on filtration of most (but not all) water POU in a haematology unit could be sufficient to limit the spread of OPPPs to the environment, provided a functional mapping of 'high-risk' POU has been undertaken. The residual spread of OPPPs and OPPP indicators linked to non-filtered water POU argues for careful monitoring of non-filtered water use.

© 2017 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Address: Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier Infection Control, 15 Avenue du Doyen Gaston Giraud, Montpellier, 34095, France. Tel.: +33 617206545.

E-mail address: [sara.romano-bertrand@umontpellier.fr](mailto:sara.romano-bertrand@umontpellier.fr) (S. Romano-Bertrand).

## Introduction

In hospitals, tap water is a central resource and its microbiological quality is critical because of its many uses: for patient hygiene, healthcare workers' (HCWs) handwashing, hospital hygiene, but also for drug administration and for drinking. Hospital water networks are generally fed by municipal water complying with drinking quality standards, but they do contain autochthonous bacteria, described as opportunistic premise plumbing pathogens (OPPPs); these bacteria may proliferate in water networks and cause healthcare-associated infections (HCAIs) in predisposed human populations [1,2]. Among OPPPs, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* are (frequently multidrug-resistant) agents of HCAI and hospital outbreaks [3,4].

Disposable antimicrobial filters can be fixed on taps or showers to protect patients from OPPP exposure. The efficiency of point-of-use (POU) filters to lower *P. aeruginosa* HCAI risk has been demonstrated [5,6]. However, leaks around filters, filtering membrane saturation, and contamination of the filter surface are frequently observed [7]. In addition, for budgetary reasons, only the 'high-risk' POU directly exposing patients to OPPPs are generally equipped, i.e. tap and shower in patients' room, washbasin for particular care activities, or for HCW handwashing. In a hospital ward, secondary routes of water and OPPPs could originate from non-filtered water POU.

In the haematology unit of the University Hospital of Montpellier (France), tap water is chronically contaminated by *P. aeruginosa*. As immunocompromised patients are at high risk for OPPP infections, water POU used for patient care is filtered on this ward, but a few POU remain non-filtered. The objective of the study was to assess the effectiveness of water filtration in daily practice and to track secondary non-filtered water routes in the ward leading to the potential circulation of and exposure to OPPPs.

## Methods

### Settings

The Adult Haematology Unit (AHU) of the University Hospital of Montpellier treats patients with acute haematological malignancies, including before and after allogenic or autogenic haematological stem cell transplant (HSCT). The 19 single bedrooms include a bathroom of 2.5 m<sup>2</sup> with shower, washbasin, and toilet. The whole unit has 73 water POU, including 52 'high-risk POU' defined by the infection control team (Figure 1) that are equipped with antimicrobial filters. Filters are made from polyethersulfone membrane with asymmetric pore structure (diameters from 0.001 to 20 µm) (Filtranios 31DA, Anios, Lille–Hellemmes, France). These 52 POU are taps and showers in patients' rooms, washbasins used for healthcare or for HCW handwashing. In housekeeping rooms, the patient satellite kitchen, and in nurse tearoom, one tap in each room is filtered and dedicated to high-risk practices. All filters are changed monthly.

Patient rooms are cleaned once a day: rooms occupied by a patient are cleaned in the morning (using housekeeping room 1) and unoccupied rooms are cleaned in the afternoon (using housekeeping room 2). The nurse tearoom, patient satellite kitchen, and the room for preparing chemotherapy are cleaned

twice a day. The microbiological quality of the environment (surfaces, POU, and water) is surveyed twice a year. HCWs wear scrubs and shoes dedicated to the AHU. Additional safety devices such as gloves or aprons are used occasionally according to the infection control (IC) recommendations. Previous IC audits showed that AHU HCWs followed the IC rules closely, with more than 80% of compliance with standard precautions.

### Reconstruction of secondary water routes

Between January and May 2015, in order to define secondary routes of water circulation from the plumbing system, HCWs were observed and questioned on their care and cleaning practices regarding when, where, and for what they used water. A secondary water route was defined as beginning by an action performed on a POU and ending in a patient's bedroom. The different routes between beginning and end points were traced over a one-month period of observations. All surfaces in contact with water by wet hands or by splash (intermediary points) were included as potentially contaminated by OPPPs and hydric bacteria, and water routes were then mapped by retracing the circulation between each surface in contact with water (data not shown).

### Sampling, culture, and bacterial species identification

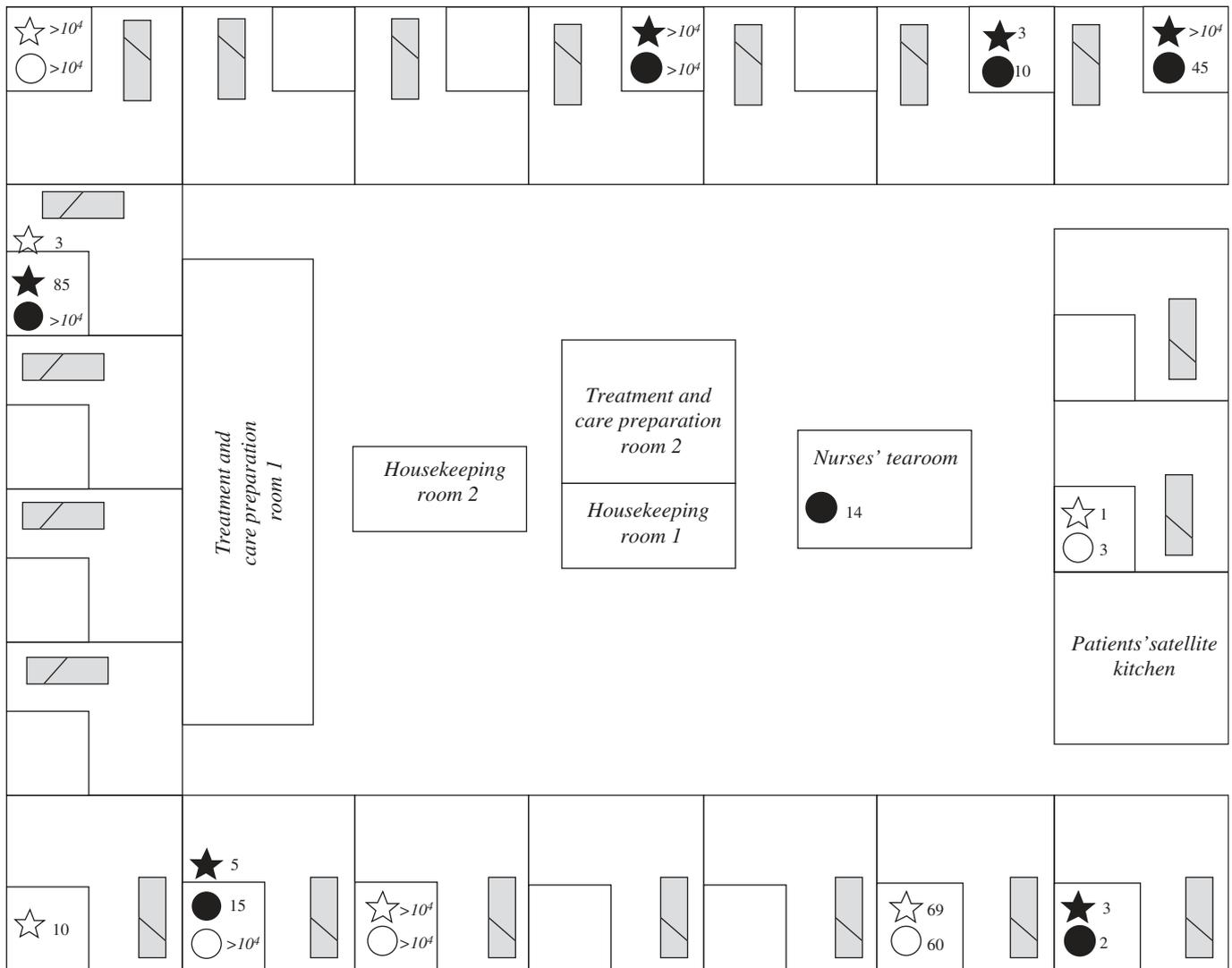
Dry and wet surfaces were sampled with sterile cotton swabs (Copan Diagnostics Inc., Murrieta, CA, USA). Swabs were pre-incubated for 12 h at 37°C in a soybean typticase broth (Difco, Bordeaux, France) before streaking on to MacConkey and cetrinide agar media (Difco, Bordeaux, France), then incubated for 72 h at 37°C in aerobic conditions. Volumes of 250 mL water were collected in bottles containing sodium thiosulfate (final concentration of 20 mg/L), filtered on to cellulose nitrate membrane of 0.45 µm porosity (Sartorius Stedim Biotech, Dourdan, France). The membranes were incubated on cetrinide agar plates for 72 h at 30°C. Each growing colony was identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker, Champs sur Marne, France).

### Epidemiological survey of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* bacteraemia

From January 2011 to May 2015, a period including the environmental study period, clinical isolates of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* from blood cultures in patients hospitalized in AHU were prospectively collected.

### Infra-specific molecular typing

Clinical or environmental isolates within same bacterial species were genotyped by multiplex repetitive element sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after *SpeI* macro-restriction, in order to compare isolates and assess their clonality [8,9]. *P. aeruginosa* strains isolated from bacteraemia were also characterized by multi-locus sequence typing to identify potential sequence type (ST) corresponding to high-epidemic risk clones after comparison to pudMLST database and published data [10].



**Figure 1.** Schematic mapping of the unit indicating the occurrence and the concentration of opportunistic premise plumbing pathogens and indicators in tap- or shower-water-sampled upstream filters. The 19 bedrooms are represented by a square containing a bed and a smaller square corresponding to the bathroom. Stars: January sampling campaign; circles: May sampling campaign; black: *Pseudomonas aeruginosa*; white: *Stenotrophomonas maltophilia*; numbers beside stars and circles: bacterial concentration in cfu/100 mL.

## Results

### Epidemiology of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* in AHU from January 2011 to May 2015

From January 2011 to December 2014, 52 'high-risk water POU' in the AHU were already equipped with antimicrobial filters but 31 strains of *P. aeruginosa* and 12 strains of *S. maltophilia* were isolated in blood cultures from respectively 19 and six patients. *P. aeruginosa* bacteraemia rates increased during the year 2014, with 21 clinical isolates in 11 patients. In the same period, 10 of the 475 environmental samples were positive for *P. aeruginosa* (siphons in housekeeping rooms 1 and 2 and bedroom, and water of housekeeping room 2) but none for *S. maltophilia*. From February 2014 to April 2014, one patient presented with bacteraemia caused by *P. aeruginosa* genotype ST308, which was a dominant genotype in patients and in the environment throughout the entire hospital and in the AHU from 2005 to 2011 [11]. This

strongly suggested a waterborne infection despite the presence of filters on high-risk POU, supporting the hypothesis of secondary water routes in the unit.

During the observation period between January and May 2015, no patient presented a positive blood culture with *P. aeruginosa* or *S. maltophilia*. The period might effectively be considered as a non-outbreak period.

### Bacterial diversity in tap water

The water samples collected upstream and downstream of antimicrobial filters from the 73 POU were analysed in January and May 2015. During the two sampling campaigns, no bacteria were found in water sampled downstream of antimicrobial filters, demonstrating their in-use efficiency. The percentages of upstream water samples positive for bacteria growing on cetrimide medium were 43.8% and 53.4% in January and May, respectively. The bacterial contamination was spatially stable with mainly the same contaminated POU in both sampling

**Table I**

Distribution and molecular typing of opportunistic premise plumbing pathogen strains (*Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*) and indicator strains (*Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oryzihabitans*) isolated from surface and water

Room <sup>a</sup>	Site of sampling	Bacterial species on surface/multiplex rep-PCR profile <sup>b</sup>	
Nurse tearoom	Water of non-filtered water point	<i>P. monteilii</i> /A (12) <sup>c</sup> <i>P. aeruginosa</i> /D <sup>d</sup>	
	Siphon of the filtered water point	<i>P. aeruginosa</i> /A (1) <i>P. monteilii</i> /A (15) <i>P. monteilii</i> /B <i>P. aeruginosa</i> /B	
	Wet surface of sink with filtered tap	<i>P. aeruginosa</i> /A (2) <i>P. monteilii</i> /A (14)	
	Siphon of the non-filtered water point	<i>P. aeruginosa</i> /A (3)	
	Tap of the non-filtered water point	<i>P. monteilii</i> /A (13)	
	Multi-purpose table	<i>P. aeruginosa</i> /A (4) <i>P. monteilii</i> /C	
	Housekeeping room 2	Siphon of the filtered water point	<i>P. aeruginosa</i> /C (5)
		Sink of the filtered water point	<i>P. luteola</i> /A (9)
		Tap of the filtered water point	<i>P. luteola</i> /B
	Housekeeping room 1	Siphon of the filtered water point	<i>P. aeruginosa</i> /C (6)
Tap of the filtered water point		<i>P. aeruginosa</i> /C (7)	
Surface of the antimicrobial filter		<i>P. aeruginosa</i> /C (7)	
Patient satellite kitchen	Housekeeping trolley after using	<i>P. luteola</i> /C	
	Siphon of the filtered water point (number 1)	<i>P. aeruginosa</i> /E	
226	Siphon of the filtered water point (number 2)	<i>P. aeruginosa</i> /F	
	Interior door handle	<i>P. luteola</i> /A (10)	
	Water of shower	<i>S. maltophilia</i> /A <sup>c</sup>	
	Tap of the filtered water point	<i>P. aeruginosa</i> /G	
203	High-touch object around the shower	<i>P. oryzihabitans</i> /C	
	Water of shower	<i>P. aeruginosa</i> /L <sup>c</sup> <i>P. aeruginosa</i> /M <sup>d</sup>	
201	Washbasin splashback	<i>P. luteola</i> /A	
	Siphon of the filtered water point	<i>P. aeruginosa</i> /H	
	Siphon of the filtered shower	<i>P. aeruginosa</i> /I	
	Water of shower	<i>P. aeruginosa</i> /N <sup>c</sup> <i>P. aeruginosa</i> /N <sup>d</sup>	
	Washbasin splashback	<i>P. oryzihabitans</i> /A (16)	

**Table I (continued)**

Room <sup>a</sup>	Site of sampling	Bacterial species on surface/multiplex rep-PCR profile <sup>b</sup>
200	High-touch object around the tap	<i>P. oryzihabitans</i> /B
	Bed tray	<i>P. oryzihabitans</i> /A (17)
	Siphon of the filtered water point	<i>P. aeruginosa</i> /J
	Toilet bowl	<i>P. aeruginosa</i> /K
	Water of washbasin	<i>P. aeruginosa</i> /O <sup>c</sup> <i>P. aeruginosa</i> /P <sup>d</sup>
230	Water of shower	<i>S. maltophilia</i> /B <sup>c</sup>
221	Water of shower	<i>S. maltophilia</i> /B <sup>d</sup>
220	Water of shower	<i>P. aeruginosa</i> /Q <sup>c</sup> <i>P. aeruginosa</i> /P <sup>d</sup>
		<i>S. maltophilia</i> /C <sup>c</sup> <i>S. maltophilia</i> /C <sup>d</sup>
224	Water of shower	<i>S. maltophilia</i> /C <sup>c</sup> <i>S. maltophilia</i> /C <sup>d</sup>
		<i>S. maltophilia</i> /D <sup>d</sup>
225	Water of washbasin	<i>S. maltophilia</i> /R <sup>c</sup>
	Water of shower	<i>P. aeruginosa</i> /R <sup>d</sup>
210	Water of shower	<i>P. aeruginosa</i> /D <sup>c</sup> <i>S. maltophilia</i> /E <sup>a</sup>
		<i>P. aeruginosa</i> /S <sup>d</sup>
204	Water of shower	<i>S. maltophilia</i> /F <sup>c</sup> <i>S. maltophilia</i> /F <sup>d</sup>

rep-PCR, multiplex repetitive element sequence-based polymerase chain reaction.

<sup>a</sup> Numbers corresponding to bedrooms.

<sup>b</sup> Numbering of the strain in Figure 2.

<sup>c</sup> January 2015 water sampling campaign.

<sup>d</sup> May 2015 water sampling campaign.

campaigns (Figure 1). The bacterial count in water upstream antimicrobial filter ranged from 1 to 10<sup>4</sup> cfu/100 mL and could be stable or variable between the beginning and the end of the study (Figure 1). Two OPPPs, *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, were found upstream of antimicrobial filters in January and May (Figure 1, Table I). Isolates of these two species displayed nine different genomic patterns for *P. aeruginosa* and six for *S. maltophilia* by multiplex rep-PCR typing (data not shown) (Table I). Beside major OPPPs, other non- or less-pathogenic bacteria were detected in water upstream of the filters. The most frequent genus was *Pseudomonas* with the species *Pseudomonas mosselli*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas putida*, and *Pseudomonas stutzeri*. Seven Alphaproteobacteria were also identified: *Acidovorax temperans*, *Blastomonas natatoria*, *Blastomonas ursincola*, *Brevundimonas diminuta*, *Delftia acidovorans*, *Parococcus yeii*, and *Sphingobium cloacae*, as well as the Betaproteobacterium, *Cupriavidus gilardii*. These bacteria share similar lifestyle with OPPPs, leading us to consider them as indicators of OPPP contamination. Hence, they were searched and studied in the bacteria-tracking part of this study.

#### Tracking bacteria in secondary water routes

The ecological and epidemiological conditions described above as the presence of polyclonal OPPPs or OPPP indicators

in the POU, together with the absence of an outbreak of human infection, provided conditions suitable to follow each genotype of OPPP or OPPP indicators in secondary water routes.

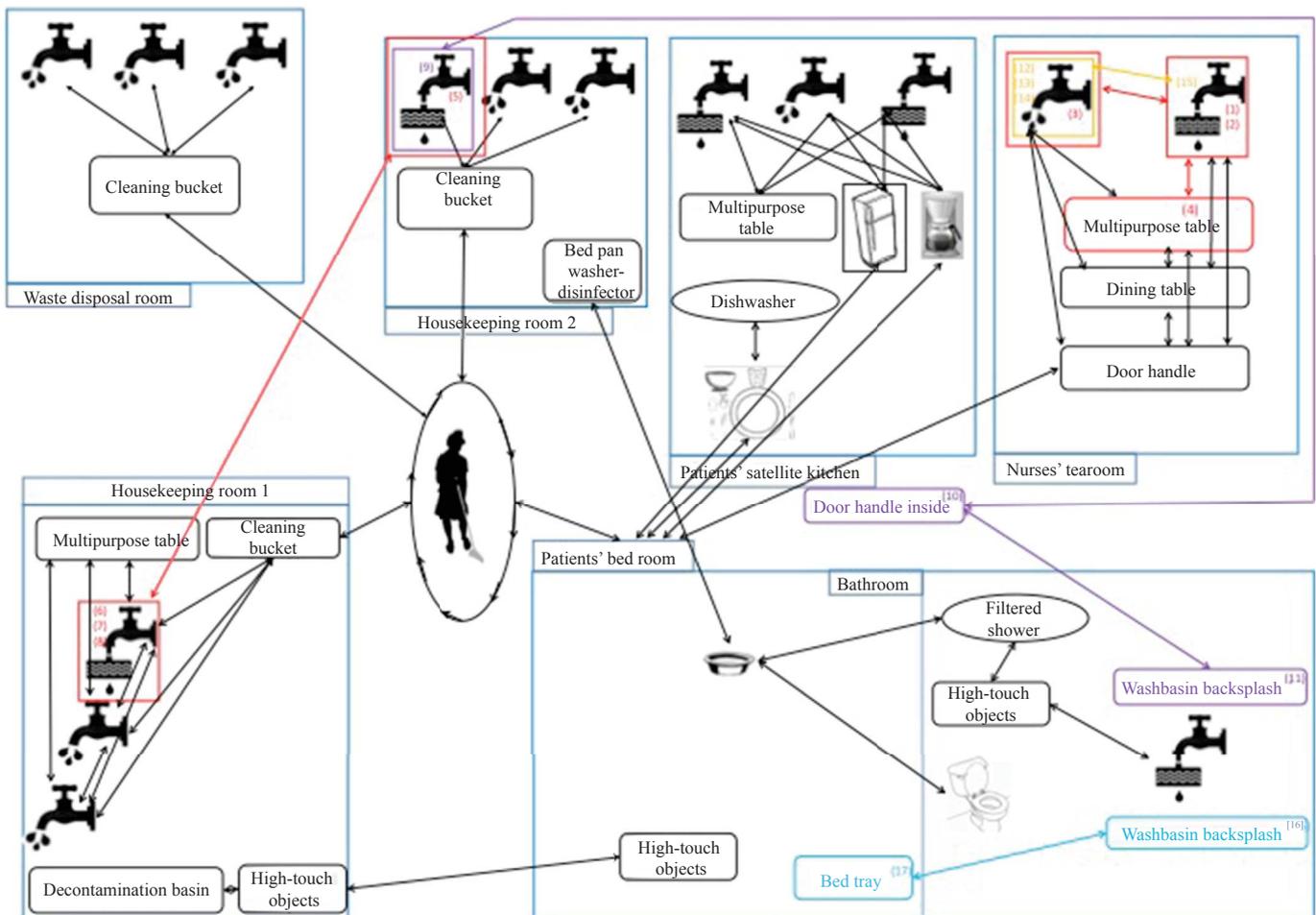
The observations and interviews of 14 HCWs (three medical, 11 paramedical) and 19 patients allowed the reconstruction of six secondary routes of water circulation (Figure 2). These six routes were named according to their starting point or to the corresponding activity: 'nurse tearoom', 'decontamination of high-touch surfaces', 'patient satellite kitchen', 'cleaning', 'patient nursing care', and 'bathroom' (Figure 2).

In all, 315 surface samples were collected during two sampling campaigns in February and April 2015. Table I summarizes OPPPs and indicators collected in surfaces and water samples according to the routes. No *S. maltophilia* was detected on the surfaces despite its presence in upstream water POU (Table I). *P. aeruginosa* was detected on 5.1% (16/315) of surfaces but on only one dry surface, underlining the notable frequency of *P. aeruginosa* contamination in moist environments but its low persistence on dry surfaces.

*Pseudomonas aeruginosa* was identified through two routes, 'Nurse tearoom' and 'Cleaning'. For the 'Nurse tearoom' route, five isolates were collected 24 h after room cleaning,

including four with the same multiplex rep-PCR and PFGE genotype (clone A<sub>Pa</sub>, Table I, Figure 2): the isolates (1) in the siphon, (2) on the wet surface of a sink with filtered tap, (3) in the siphon of the non-filtered tap, and (4) on the multi-purpose table of the 'Nurse tearoom' where HCWs prepare food. Thus, the clone A<sub>Pa</sub> of *P. aeruginosa* had spread 4 m away from its source in the water POU and persisted on a dry surface but did not spread outside the nurse tearoom.

For the 'cleaning' route, four isolates of *P. aeruginosa* clone C<sub>Pa</sub> were collected from the siphon of the filtered tap [isolate (5)] of housekeeping room 2, and from the siphon [isolate (6)], the tap [isolate (7)] and on the surface of the antimicrobial filter of filtered tap [isolate (8)] in housekeeping room 1 (Figure 2, Table I). Therefore, the clone C<sub>Pa</sub> of *P. aeruginosa* spread in two rooms separated by 30 m (Figure 2). No intermediate point contaminated by the clone C<sub>Pa</sub> was found between the two housekeeping rooms and *P. aeruginosa* did not contaminate upstream water POU in either housekeeping room. These results suggest that *P. aeruginosa* clone C<sub>Pa</sub> circulated in the ward and cross-contaminated two distant rooms with the same function, underlying a spread route out of the water network, probably via objects common to both



**Figure 2.** Bacterial isolates' circulation in different routes. In red: the route 'Nurses' tearoom' and 'Cleaning' in which *Pseudomonas aeruginosa* is isolated. In purple: the route 'Cleaning' in which *Pseudomonas luteola* is isolated. In orange: the route 'Nurses' tearoom' in which *Pseudomonas monteilii* is isolated. In blue: the route 'Bathroom' in which *Pseudomonas oryzihabitans* is isolated. The bacterial isolates are identified by numbers, which correspond to data in Table I.

rooms such as the cleaning trolley or buckets (despite no detection of the C<sub>pa</sub> clone on those objects sampled the same day).

Besides pathogens, OPPP indicators were isolated on different routes. For the 'cleaning' route, three isolates of *Pseudomonas luteola* were retrieved from the sink of the filtered tap in housekeeping room 2 [isolate (9)], on the interior door handle in 'patients' satellite kitchen' [isolate (10)], and on the washbasin backsplash [isolate (11)] of bathroom 203 (Figure 2, Table I). This result indicated the large diffusion of *P. luteola* clone A<sub>pl</sub> over 100 m through the ward, on very different materials. For the 'nurse tearoom' route, five isolates of *Pseudomonas monteilii* clone A<sub>pm</sub> were isolated from water [isolate (12)], the tap [isolate (13)] and siphon of non-filtered tap [isolate (14)] and in the siphon of filtered tap [isolate (15)] of the nurse's tearoom, but they did not diffuse on dry surfaces (Figure 2, Table I). For the 'bathroom' route in bedroom 201, *Pseudomonas oryzae* clone A<sub>po</sub> was collected on the washbasin backsplash [isolate (16)] and on the bed tray [isolate (17)] near the patient's bed and used for several activities including patient's meals and medical care to bedridden patients (Figure 2, Table I).

## Discussion

In hospitals, wet and hydric environments (drinking water, taps, sinks, cleaning equipment) may serve as reservoirs for OPPPs such as *P. aeruginosa* and contribute to HCAs [6,12]. The epidemiological cycle of *P. aeruginosa* or *S. maltophilia* is complex because they are not only environmental but also transiently found in patients' microbiota. Consequently, several routes of transmission are possible and the exact role of environment in the occurrence of *P. aeruginosa* HCAs and outbreaks is not easily demonstrated [6,13]. Vernier et al. showed that water contaminated by *P. aeruginosa* in a room increases the risk of infection for patients hospitalized in that room [14]. Indeed, 32% of patients colonized with *P. aeruginosa* were previously exposed to positively tested water in their room. Conversely, the implementation of control measures on water POU decreased the rate of *P. aeruginosa* colonization and infection [5,15]. However, microbiological evidence for *P. aeruginosa* transmission from water to patients, based on genotype comparison, remained scarce. A *P. aeruginosa* clone from the water used for preoperative shower caused a post-surgical bacteraemia in a patient [16]. In a broader study, faucets were the proven source of infection for 35% of patients included in the survey [17]. *S. maltophilia* is less studied but several reports favour a role of the environment in HCAI transmission [4,18].

The current wide use of MALDI-TOF for bacterial identification in clinical and in hospital environmental microbiology allows the efficient and cost-effective identification of OPPPs and other bacteria from water POU [19]. Identification of all growing colonies on to cetrinide medium shows the wide range of proteobacteria inhabiting the hospital water network. Most of them display low pathogenicity but the few human cases described in the literature suggest the environmental origin of infections [7,20,21]. The low pathogenicity of most hydric bacteria does not justify their routine identification aside from special investigations, but, as proposed in this study, they could be considered as indicators for OPPPs because they share the same niche and lifestyle. For instance, the long-distance

spread of a *P. luteola* clone in the ward and the migration of *P. oryzae* from sink to bed tray of a patient's room indicates the potential risk for *P. aeruginosa* spread associated with the same practices. The follow-up of such indicators could provide an alert system allowing the early implementation of control measures before the installation of OPPP reservoirs and development of an epidemiological cycle, especially in clean environment units such as AHU.

High-risk wards such as AHU require strict IC measures involving hospital hygiene and environmental surveillance [22]. The POU antimicrobial filters are efficient for reducing OPPP infections in such units and consequently filters are routinely used in Montpellier Hospital, where the premises plumbing system is endemically contaminated [18]. Before our study (2011–2014), several cases of invasive *P. aeruginosa* infection occurred. Owing to the filtered water system, endogenous origin or interpatient cross-transmission were first suspected. Another hypothesis, tested in this study by microbiological means, is that the protection provided by antimicrobial filters remains only partial. The study took place during a period of low prevalence of human OPPP infections in the AHU. This situation is a prerequisite for our specific goal of tracking the OPPP spread via secondary water routes outside the plumbing system. High prevalence of infections or outbreak conditions leading to a human-based circulation of OPPPs could blur their detection in secondary water routes.

In practice, this study strongly suggested the efficiency of antimicrobial filtration in daily use conditions because no bacterium (OPPP or indicator) was detected in downstream water, whereas *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, and several hydric bacteria contaminated upstream water. However, this observation is based on only two sampling campaigns and should be confirmed by long-term prospective surveillance. The IC team and the hospital microbial ecology laboratory performed routine surveillance of about one-third of the AHU POU per year. In agreement with our results, no OPPP or other bacteria were detected in filtered water during the last two years of routine surveillance.

The OPPP and OPPP indicator tracking performed in this study proves that hydric bacteria originating from non-filtered POU may spread in the ward through secondary routes out of the plumbing system, but probably at low frequency. Indeed, only 5.1% of OPPPs were observed, mainly on moist surfaces. We conclude that the strategy consisting of filtration at only at-risk POU in a ward (herein 71% of the POU) is sufficient to limit the spread of OPPPs. The residual spread of OPPPs and OPPP indicators appears linked to the use of non-filtered water POU for an action that takes place far away from the source POU.

Since non-filtered taps may deliver contaminated water, it is essential to maintain high-level compliance with infection control recommendations. The use of non-filtered POU in at-risk wards should be carefully framed by clear signboards and recommendations regarding hand hygiene, POU cleaning practices, or POU functionalities limiting aerosolization. For instance, in Montpellier Hospital, the use of alcohol-based gel is strongly promoted after contaminating practices, including the use of non-filtered POU water for hand hygiene. In at-risk units such as AHU, the POU and its drain are decontaminated daily using 0.5% sodium hypochlorite, and the tap-nose aerators are changed annually. The tap is generally positioned to prevent splashing and direct flowing within the siphon because aerosolization from incorrectly positioned taps has been

implicated in HCAI outbreaks [23]. Finally, the secondary routes of water in a high-risk unit should be thoroughly reconstructed after observations and audits in order to topologically and functionally map the high-risk POU.

#### Conflict of interest statement

None declared.

#### Funding source

This work was supported in part by ADEREMPHA, Sauzet, France.

## References

- [1] Falkinham JO. Common features of opportunistic premise plumbing pathogens. *Int J Environ Res Public Health* 2015;12:4533–45.
- [2] Falkinham JO, Pruden A, Edwards M. Opportunistic premise plumbing pathogens: increasingly important pathogens in drinking water. *Pathog Basel Switz* 2015;4:373–86.
- [3] Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 2015;21–22:41–59.
- [4] Guyot A, Turton JF, Garner D. Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* on an intensive care unit. *J Hosp Infect* 2013;85:303–7.
- [5] Trautmann M, Halder S, Hoegel J, Royer H, Haller M. Point-of-use water filtration reduces endemic *Pseudomonas aeruginosa* infections on a surgical intensive care unit. *Am J Infect Control* 2008;36:421–9.
- [6] Loveday HP, Wilson JA, Kerr K, Pitchers R, Walker JT, Browne J. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. *J Hosp Infect* 2014;86:7–15.
- [7] Aumeran C, Paillard C, Robin F, Kanold J, Baud O, Bonnet R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* outbreak associated with contaminated water outlets in an oncohaematology paediatric unit. *J Hosp Infect* 2007;65:47–53.
- [8] Dupont C, Michon A-L, Jumas-Bilak E, Nørskov-Lauritsen N, Chiron R, Marchandin H. Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of cystic fibrosis airways. *Infect Genet Evol* 2015;32:214–23.
- [9] Abdouchakour F, Dupont C, Grau D, Aujoulat F, Mournetas P, Marchandin H, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. clonal selection leads to successive waves of contamination of water in dental care units. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:7509–24.
- [10] Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004;42:5644–9.
- [11] Abdouchakour F. Environmental reservoir, persistence and epidemic success of *Pseudomonas aeruginosa* population in a hospital, Montpellier. Thesis, University of Montpellier.
- [12] Baranovsky S, Licznar-Fajardo P, Jumas-Bilak E, Romano-Bertrand S. Premises plumbing and wet technological niches as sources of healthcare-associated infections in hospital. *EC Microbiology* 2017;7:192–7.
- [13] Bédard E, Prévost M, Déziel E. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *MicrobiologyOpen* 2016;5:937–56.
- [14] Venier A-G, Leroyer C, Slekovec C, Talon D, Bertrand X, Parer S, et al. Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in intensive care units: a prospective multicentre study. *J Hosp Infect* 2014;88:103–8.
- [15] Petignat C, Francioli P, Nahimana I, Wenger A, Bille J, Schaller M-D, et al. Exogenous sources of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit patients: implementation of infection control measures and follow-up with molecular typing. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;27:953–7.
- [16] Romano S, Bourdier A, Parer S, Masnou A, Burgel L, Raczka F, et al. Peripheral venous catheter and bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* after a contaminated pre-operative shower. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013;34:544–6.
- [17] Reuter S, Sigge A, Wiedeck H, Trautmann M. Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Crit Care Med* 2002;30:2222–8.
- [18] Cervia JS, Farber B, Armellino D, Klocke J, Bayer R-L, McAlister M, et al. Point-of-use water filtration reduces healthcare-associated infections in bone marrow transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2010;12:238–41.
- [19] Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 2015;6:791.
- [20] Botana-Rial M, Leiro-Fernández V, Núñez-Delgado M, Álvarez-Fernández M, Otero-Fernández S, Bello-Rodríguez H, et al. A pseudo-outbreak of *Pseudomonas putida* and *Stenotrophomonas maltophilia* in a bronchoscopy unit. *Respir Int Rev Thorac Dis* 2016;92:274–8.
- [21] Marín M, García de Viedma D, Martín-Rabadán P, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Infection of Hickman catheter by *Pseudomonas* (formerly *flavimonas*) *oryzihabitans* traced to a synthetic bath sponge. *J Clin Microbiol* 2000;38:4577–9.
- [22] Libbrecht C, Goutagny M-P, Bacchetta J, Ploton C, Bienvenu A-L, Bleyzac N, et al. Impact of a change in protected environment on the occurrence of severe bacterial and fungal infections in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 2016;97:70–7.
- [23] Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaardt G, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:25–33.

La faible circulation de *P. aeruginosa* et des autres PROPRES sur les surfaces de l'unité de soin nous a contraint à utiliser des bactéries hydriques indicatrices du genre *Pseudomonas* spp. pour cartographier les routes secondaires de circulation. Nous avons considéré que si un *Pseudomonas* spp. pouvait diffuser sur les surfaces de l'unité de soins, cela indiquait que *P. aeruginosa* pouvait potentiellement aussi diffuser par ce même circuit.

Ce travail a mis en évidence une faible diffusion de *P. aeruginosa* et des bactéries hydriques indicatrices du genre *Pseudomonas* spp. dans l'environnement du patient et le service d'onco-hématologie avec seulement 5,1% des surfaces contaminées par *Pseudomonas* spp. La souche de *P. aeruginosa* ayant eu la diffusion la plus importante, a circulé sur 30 mètres entre 2 pièces dédiées à l'entretien de l'environnement, certainement via le chariot de ménage. Quatre autres génotypes de *Pseudomonas* spp. ont diffusé sur les surfaces durant cette étude mais uniquement à proximité (moins de 4 mètres) du point d'eau d'origine. De plus, aucun patient n'a présenté d'infection à *P. aeruginosa* pendant la période d'étude. Ce travail a permis de conclure que : (i) filtrer uniquement les points d'eau de soins en contact avec les patients est suffisant pour protéger les patients du risque d'infection à *P. aeruginosa* ; et (ii) que l'utilisation de bactéries hydriques indicatrices est une approche novatrice et aisée grâce à l'utilisation en routine du MALDI-TOF, notamment pour la surveillance de l'environnement.

Concernant ce dernier point, la microbiologie de l'environnement hospitalier a longtemps souffert d'un manque de moyens diagnostiques par rapport à la microbiologie humaine. Dans l'environnement, seules des espèces dites « spécifiées » étaient recherchées spécifiquement. La généralisation du MALDI-TOF comme méthode d'identification conduit le microbiologiste de l'environnement à identifier de nombreuses bactéries et plus seulement les pathogènes spécifiés. Ces identifications précises, considérées parfois comme inutiles en pratique, fournissent pourtant une base d'information riche. En effet, l'identification d'une bactérie non pathogène mais à mode de vie identique qu'un pathogène nosocomial (*Pseudomonas* spp. pour *P. aeruginosa* ou *S. epidermidis* pour *S. aureus*) suggère que les conditions sont réunies pour la transmission du pathogène.

La faible circulation de bactérie d'origine hydrique en présence de filtres anti-microbiens nous a conduit à poursuivre l'étude en évaluant leur diffusion dans un service où les points

d'eau ne sont pas protégés par des filtres anti-microbiens. Une étude de ce type ne peut être réalisée que dans un service accueillant des patients à risque standard d'infection à *P. aeruginosa* pour lesquels les bonnes pratiques d'hygiène hospitalière ne recommandent pas l'usage de filtres anti-microbiens. C'est pourquoi nous avons étudié la circulation de *P. aeruginosa* dans un service d'ORL accueillant des patients considérés comme à risque standard pour les IAS à *P. aeruginosa*. Par ailleurs, ces services à risque standard sont globalement peu étudiés de ce point de vue et font l'objet de très rares publications contrairement aux services à risques comme les réanimations ou les services d'hématologie.

### III) Cartographie de la circulation de *P. aeruginosa* dans un service à points d'eau non protégés

#### A) Contexte du service d'ORL au CHU de Montpellier

Le service dispose de 23 chambres dont 10 chambres doubles, et est doté de 54 points d'eau dont 34 robinets et 20 douches. Aucun de ces points d'eau n'est équipé de filtre antimicrobien terminal. Les patients accueillis dans ce service d'hospitalisation longue durée sont admis pour des pathologies cancéreuses ORL ou pour chirurgie ORL et maxillo-faciale. Ils ne sont pas considérés comme à risque d'infection à *P. aeruginosa* même en cas de chimiothérapie anticancéreuse. Les chimiothérapies des tumeurs solides sont faiblement immunosuppressives contrairement aux chimiothérapies d'hématologie (SF2H 2016).

L'entretien de l'environnement est réalisé une fois par jour avec un détergent-désinfectant. Ce service n'étant pas considéré comme un service à risque élevé d'IAS, aucun prélèvement de contrôle microbiologique de l'environnement de routine n'est réalisé par le LEMH.

Une évaluation des pratiques réalisée en 2017, après notre étude, a pu démontrer que la compliance à l'hygiène des mains était insuffisante dans le service (65% de l'objectif à atteindre).

#### B) Stratégie d'étude

Dans un premier temps, un état des lieux de la contamination de l'eau par *P. aeruginosa* a été réalisé au début de l'étude en juillet 2016. Dans un deuxième temps, une observation des pratiques sur l'utilisation de l'eau a été réalisée comme décrit dans l'article précédent (article 2). Brièvement, nous avons relevé quels points d'eau étaient utilisés, pour quels usages, quand et par qui. Puis, nous avons décrit différents circuits secondaires de circulation de l'eau sur les surfaces (hors réseau d'eau) pouvant éventuellement conduire à la diffusion et à la transmission de bactéries hydriques. Ces circuits prennent en compte les éclaboussures à partir d'un point d'eau, le manuportage et l'entretien de l'environnement. Dans un troisième temps, nous avons réalisé des prélèvements de surfaces sur les circuits précédemment déterminés afin d'évaluer la circulation de *P. aeruginosa* sur les surfaces de soins. Enfin, les cas d'infections à *P. aeruginosa* ont été recensés, et le portage ORL à *P. aeruginosa* a été déterminé à l'entrée et à la sortie du patient par écouvillonnage buccal.

Afin d'étudier la circulation de *P. aeruginosa* de l'environnement de soins au patient et/ou du patient à l'environnement de soins, des prélèvements d'environnement ont été réalisés dans la chambre des patients infectés ou porteurs de *P. aeruginosa*.

## **C) Matériel et méthodes**

### **1-Prélèvement et analyse des échantillon d'eau et de surfaces**

Des prélèvements du premier jet d'eau ont été réalisés pour avoir le reflet de la contamination de l'eau au point d'usage et donc de l'exposition directe du patient lors de l'usage du robinet. Les échantillons ont été analysés par filtration sur membrane de nitrocellulose (porosité 0,45µm), ensemencés sur milieu cétrimide (Difco®) puis, incubés pendant 72 h à 30 °C (Wang et al. 2017b). Les surfaces sèches et humides ont été prélevées par écouvillonnage sec coton, 24 h après l'entretien de l'environnement, c'est à dire juste avant l'entretien quotidien. Les échantillons ont été mis en culture d'enrichissement en bouillon Trypticase Soja (Difco®) pendant 12 h à 35 °C. Après enrichissement, la culture en bouillon a été isolée sur deux milieux gélosés : Mac-Conkey (Difco®) et Cétrimide (Difco®) 72 h à 35 °C. Pour tous les échantillons, chaque morphotype visible a été identifié au niveau de l'espèce par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker®).

### **2-Origine et analyse des échantillons cliniques**

Le portage buccal à *P. aeruginosa* a été recherché à partir de novembre 2016, grâce à une étude clinique concomitante à cette étude, intitulée « Formation de pathobiomes dans les points d'eau de soins et dynamique des pathogènes hydriques impliqués dans les infections associées aux soins ; TapAS » financée par le CHU de Montpellier. Lors de cette étude, le portage buccal de *P. aeruginosa* des patients hospitalisés dans le service d'ORL a été déterminé grâce à un prélèvement buccal à l'admission et à la sortie.

Un écouvillonnage buccal a été réalisé avec des écouvillons cotons. Les échantillons ont été enrichis en bouillon Trypticase Soja (Difco®) pendant 12 h à 35 °C, puis isolés sur milieu gélosé : Mac-Conkey (Difco®) et Cétrimide (Difco®) 72 h à 35 °C. Puis chaque morphotype a été identifié par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker®).

Les éventuelles IAS à *P. aeruginosa* sont systématiquement répertoriées et les souches infectieuses sont collectées auprès du laboratoire de bactériologie du CHU qui assure le diagnostic des infections.

### **3-Typage moléculaire**

Les isolats identifiés de *P. aeruginosa* isolés des surfaces, des points d'eau, de l'eau et des patients ont été comparés par typage Multiplex-Rep PCR (MR-PCR) (Dupont et *al.* 2015) afin de tracer la circulation des différents génotypes dans l'environnement de soins. Puis, chaque génotype MR-PCR a été analysé par MultiLocus Sequence Typing (Curran et *al.* 2004) afin d'étudier la diversité de la population de *P. aeruginosa* contaminant l'environnement de soins.

## **D) Recueil des données préliminaires à l'étude**

### **1-Données sur la contamination de l'eau du service par *P. aeruginosa***

Un état des lieux de la contamination de l'eau a été réalisé sur 54 échantillons correspondant aux 54 points d'eau du service. En juillet 2016, 3 mois avant le début de l'étude, 42,6% de l'eau des points d'eau (80% des douches et 20,6% des robinets) est contaminée par *P. aeruginosa*, avec un inoculum bactérien allant de 0,5 UFC/100 mL à 632 UFC/100 mL. Ces données préliminaires valident le service d'ORL comme modèle d'étude de la circulation de *P. aeruginosa* sur les surfaces.

### **2-Données sur les infections et les portages à *P. aeruginosa* chez les patients**

Durant toute la période de notre étude, aucun cas d'infection à *P. aeruginosa* n'a été recensé. Si les patients étaient porteurs, l'eau et les surfaces de leurs chambres étaient prélevés, 24h après entretien et en présence du patient afin de déterminer la circulation des souches de *P. aeruginosa*, de l'environnement de soins aux patients et/ou des patients à l'environnement de soins. Durant la période d'étude, de novembre 2016 à mars 2017, 71 patients ont été prélevés à leur admission et à leur sortie du service. Deux patients étaient

porteurs de *P. aeruginosa* à leur admission (patients 1 et 2) mais non prélevés à leur sortie, deux autres, non porteurs à l'entrée, étaient porteurs de *P. aeruginosa* à leur sortie (patients 3 et 5) et le patient 4 était porteur à son admission et à sa sortie du service.

### **3-Cartographie des circuits secondaires de circulation de l'eau impliquant les surfaces de soins**

Début septembre 2016, durant une période de 2 semaines, 12 personnes de l'unité (10 soignants et 2 médecins) ont été interrogées et observées sur l'utilisation de l'eau dans leurs pratiques de soins et d'entretien de l'environnement dans le service. Seize patients ont été interrogés sur l'utilisation des points d'eau durant leur hospitalisation.

Au total, 5 circuits secondaires ont été définis : 1 lié à l'entretien de l'environnement, 1 dans l'office alimentaire, 1 dans la salle de détente du personnel, 1 dans les chambres/salles de bain des patients et 1 lié à l'entretien des canules de trachéotomie. Ces dernières, largement utilisées par les patients du service, sont brossées sous l'eau d'un robinet non filtré, dans une pièce dédiée à leur entretien dans laquelle tous les patients peuvent se rendre pour assurer cet entretien. Concernant le circuit lié à l'entretien de l'environnement, est pris en compte tout le circuit d'entretien des locaux qui va du propre vers le sale, qui correspondent respectivement à la pièce dédiée à l'entretien où sont remplis des seaux de ménage avec de l'eau du robinet et au vidoir où l'eau sale est éliminée.

## **E) Résultats**

### **1-Structuration et dynamique des populations de *P. aeruginosa* dans le service**

Lors des différentes campagnes de prélèvement de juillet 2016 à mars 2017, 95 souches de *P. aeruginosa* de 41 génotypes MR-PCR différents et de 18 génotypes MLST (ST) ont été isolées. Le nombre relatif de génotypes MR-PCR et MLST est compatible avec la plus faible discrimination du MLST pour le typage de *P. aeruginosa* (Abdouchakour et al. 2016). Le ST253 est largement majoritaire, il représente 42% des souches isolées dans des sites variés, lors de plusieurs campagnes. Le ST253 est exclusivement environnemental et principalement hydrique. Viennent ensuite les ST395 (9,5%), ST308 (7,4%) et ST27(7,4%) qui sont eux aussi

exclusivement environnementaux. Les ST253, ST395 et ST308 ont déjà été décrits majoritaires lors d'un inventaire des génotypes à l'échelle du CHU réalisé entre 2005 et 2014 (Abdouchakour et *al.* 2016), ce qui montre une stabilité des principales lignées de *P. aeruginosa* circulant à l'échelle d'un CHU. Les ST cliniques retrouvés aussi sur des surfaces à proximité des patients sont des STs minoritaires. Finalement, l'affectation des souches du service d'ORL à des génotypes MLST suggère une séparation nette entre les souches d'origine cliniques et environnementales. Les souches ou génotypes dominants dans l'environnement du service ne sont jamais retrouvés chez les patients au cours de l'étude. Afin de comparer les génotypes MR-PCR et de les relier aux STs ainsi qu'à l'origine et la date d'isolement des souches correspondantes, une clusterisation UPGMA a été réalisée et présentée sous forme de dendrogramme en figure 13. Au seuil de 80% de similarité, les différents génotypes se regroupent en 8 petits clusters (Figure 13) composés de 2 à 4 génotypes MR-PCR. Le grand nombre de génotypes MR-PCR associé au faible effectif des génotypes au sein de chaque cluster démontre la grande diversité des génotypes MR-PCR circulant dans le service d'ORL. Pour 4 clusters (A, B, C et H) sur 8, les souches d'un même cluster MR-PCR appartiennent au même ST, ce qui confirme leur robustesse. Par contre les clusters D, E, F et G regroupent des souches de ST différent suggérant un regroupement non robuste de profils MR-PCR probablement trop pauvres en bandes (données non montrées) et donc une clusterisation aléatoire des profils.

Les souches de STs fortement représentés (ST253, ST395, ST308) sont distribués dans divers clusters MR-PCR ou sur des branches isolées. Ce manque de corrélation peut être interprété comme une forte diversification par micro-évolution (objectivée par la MR-PCR) au sein de lignées majoritaires (objectivées par MLST).

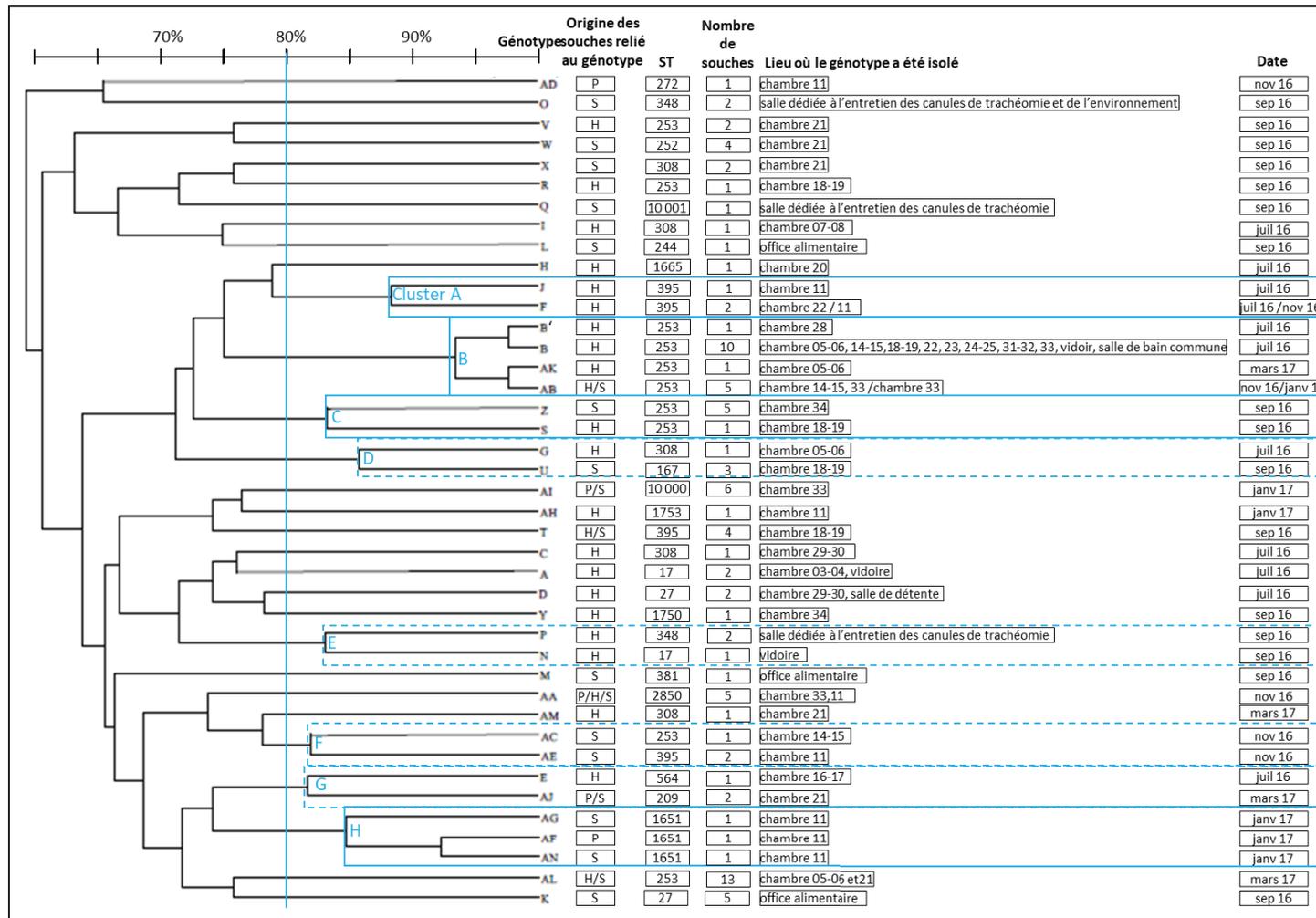
La figure 13 montre une faible clusterisation des génotypes selon la date et le lieu de prélèvement, ce qui démontre une forte dynamique des populations de *P. aeruginosa* et confirme la complexité des circulations de *P. aeruginosa* au sein d'un service. Seuls les clusters C et H regroupent des souches isolées lors des mêmes campagnes d'échantillonnage. Un cluster C regroupe des souches de deux génotypes MR-PCR Z et S appartenant au ST253 et isolées respectivement sur une surface humide de la salle de bain et de la chambre 34 ainsi que dans l'eau du lavabo de la chambre 18-19 en septembre 2016. Ce cluster regroupe donc deux génotypes ST253 isolés dans la même unité de temps. La

clusterisation UPGMA robuste, confirmée par l'appartenance au même ST, de ces deux souches/génotypes suggère un lien épidémiologique potentiel (Figure 13).

Le cluster H est constitué de 3 génotypes différents (AF, AN et AG) appartenant au ST1651 et présentant plus de 90% de similarité en MR-PCR. Le génotype AF correspond à une souche d'origine clinique (patient 3) et les deux autres génotypes correspondent à des souches isolées sur des surfaces (AN et AG) dans la salle de bain du patient 3. C'est trois souches présentent donc un lien épidémiologique étroit tout en présentant une variabilité intra-clonale (92% de similarité en MR-PCR) confirmant l'importance des événements de micro-évolution au sein des populations de *P. aeruginosa* isolées dans le service d'ORL.

Le même type de micro-évolution peut-être associé à la persistance d'une lignée. Ainsi, le cluster B est composé de 4 génotypes partageant au moins 93% de similarité (B, B', AB et AK) et appartenant au ST253 regroupe 17 souches isolées dans l'eau des points d'eau à différentes périodes de l'étude en juillet 2016, novembre 2016, janvier 2017 et en mars 2017. Etant donnée sa persistance et large distribution dans de nombreuses chambres, le cluster B peut-être considéré comme la lignée dominante colonisant le réseau d'eau du service. Au sein de cette lignée, le génotype MR-PCR B présente un succès particulier limité à la campagne de juillet 2016.

Toujours au sein du ST253, les 3 génotypes MR-PCR qui ont le plus diffusé dans l'environnement de soins (AB, AL et AC) ne sont pas regroupés dans un même cluster, démontrant la diversification génétique des génotypes diffuseurs (Figures 13 et 15).



**Figure 13** : Dendrogramme des différents génotypes définis par MR-PCR et isolés dans le service d'ORL.

Les différents génotypes définis par MR-PCR ont été comparés par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) calculée à partir du coefficient de similarité de Dice puis ont été représentés sous forme de dendrogramme (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>). Les souches notées : H sont d'origine hydrique, P sont d'origine clinique et S ont été isolées sur une surface.

## **2-Traçage de la circulation de *P. aeruginosa* sur les surfaces de soins un jour donné**

Pour ce traçage de la circulation de *P. aeruginosa* sur les surfaces de soins, les profils MR-PCR et les clusters UPGMA robuste, c'est à dire associant plus de 80% de similarité et l'appartenance à un même ST ont été utilisés. Au total 218 prélèvements de surfaces et 14 prélèvements d'eau reliés aux circuits précédemment décrits ont été réalisés dans le service, le même jour en septembre 2016. Pour l'étude du circuit « chambre/salle de bain du patient », 3 chambres distantes géographiquement ont été prélevées (Figure 13). Les sites contaminés par *P. aeruginosa* ont été listés dans le tableau 1. Aucun patient n'était infecté par *P. aeruginosa* mais le portage des patients n'a pas été recherché lors de cette phase de l'étude.

*P. aeruginosa* a été isolé sur 29 surfaces (sèches et humides) soit au total 13,3% des surfaces du service étaient contaminées. Le taux de contamination des surfaces par *P. aeruginosa* variait selon les pièces de 0% à 33%. Quinze géotypes MR-PCR et 8 ST ont été isolés sur les surfaces, démontrant à nouveau la grande diversité de géotypes circulant dans le service. Cette circulation a été schématisée dans la figure 14 dans laquelle chaque géotype a été représenté par une couleur différente.

Aucune souche isolée de l'eau n'a circulé dans le service sur une distance supérieure à 3 mètres de son point d'eau d'origine. Seul le MR-PCR géotype O et le cluster robuste C, regroupant deux souches isolées sur des surfaces humides de points d'eau, ont circulé entre 2 points séparés d'une 30<sup>aines</sup> de mètres : le siphon de la pièce dédiée à l'entretien et le brise-jet de la pièce dédiée à l'entretien des canules de trachéotomie et entre les chambres 18-19 et 34. Deux géotypes MR-PCR (T et P) correspondant respectivement à des souches isolées de l'eau de la chambre 18-19 et de la pièce dédiée à l'entretien des canules ont diffusé mais seulement sur des surfaces directement autour du point d'eau (vert pâle et vert foncé ; Figure 14).

Ces éléments démontrent la faible diffusion sur les surfaces des souches isolées de l'eau dans le service qui est limitée ici à une distance d'environ 3 mètres autour du point d'eau d'origine. Les souches qui ont diffusé proviennent d'eau fortement contaminée ( $10^4$  UFC/100ml). Ce constat n'est pas systématique puisque dans la chambre 34, l'eau de la douche était aussi fortement contaminée ( $10^4$  UFC/100ml), or la souche n'a pas diffusé sur

les surfaces du point d'eau (Figure 14). Trois autres génotypes (W, X et Z), représentés en orange, rouge et gris sur la figure 14, regroupent des souches isolées sur des surfaces humides et sèches des chambres 21 et 34. Ces génotypes associant des souches non retrouvées dans l'eau ont eu un succès de diffusion plus important que ceux retrouvés dans l'eau (V et Y) qui pourtant correspondent à des souches contaminant fortement l'eau ( $10^4$  UFC/100ml) des chambres 21 et 34.

De plus, dans l'office alimentaire, l'eau du point d'eau n'était pas contaminée alors qu'un génotype K correspondant à des souches isolées sur des surfaces humides et sèches (en violet sur la figure 14) a circulé sur des distances allant jusqu'à environ 5 mètres, confirmant que les génotypes ayant le succès de diffusion le plus important ne sont pas obligatoirement reliés à des souches présentes dans l'eau le jour de l'étude.

Partie I : Diffusion et persistance de bactéries d'origine hydrique sur les surfaces des unités de soins

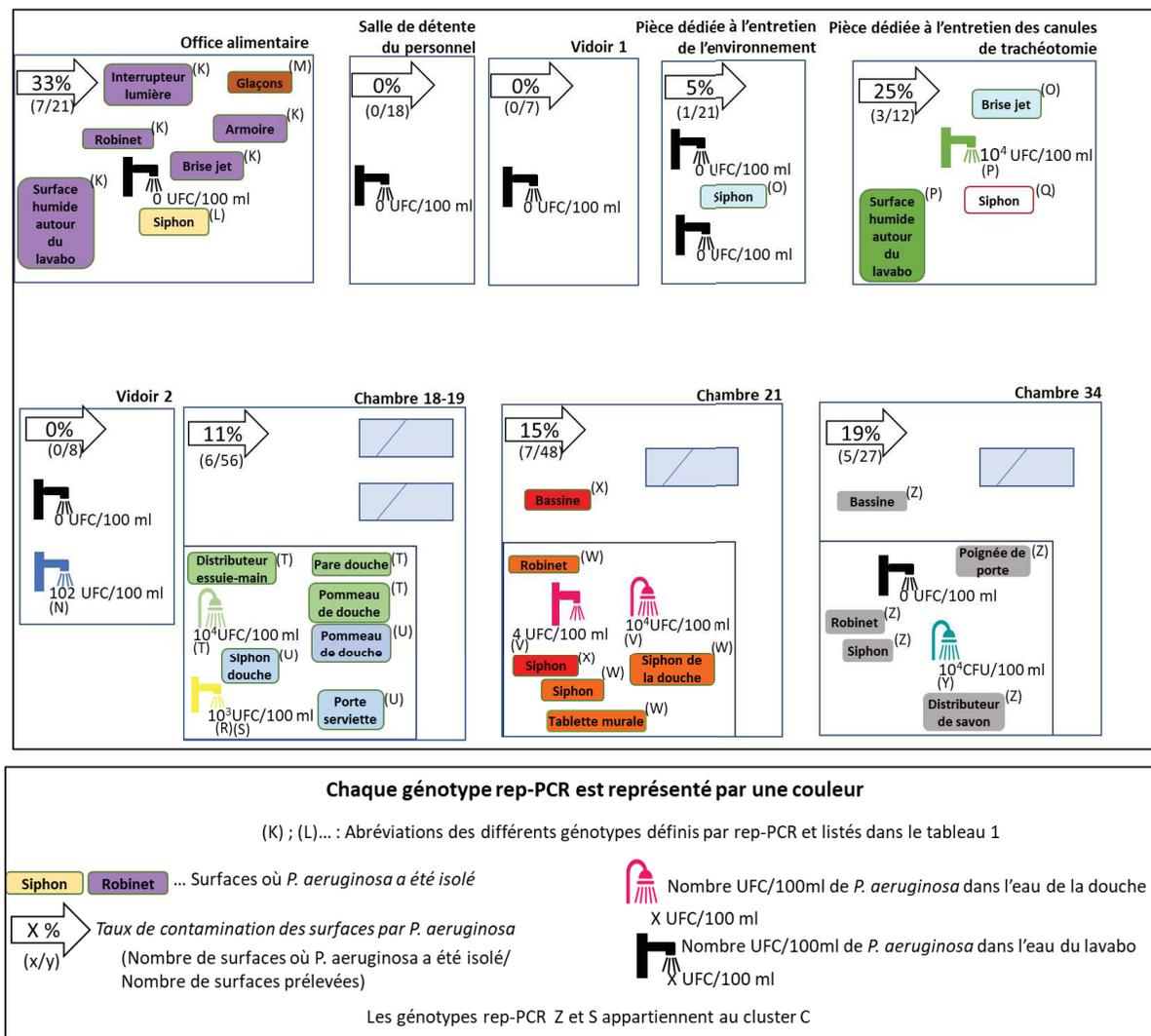


Figure 14 : Représentation de la circulation au sein du service d'ORL des différents génotypes de *P. aeruginosa* isolés dans l'environnement.

### **3-Circulation de *P. aeruginosa* dans l'environnement de soins en présence de patients porteurs**

Sur la période d'étude le portage de *P. aeruginosa* a été recherché à l'entrée et à la sortie de 71 patients. Seulement, 5 étaient porteurs à l'entrée, à la sortie ou au deux. Au total 297 prélèvements de surfaces ont été réalisés entre novembre 2016 et mars 2017, dans les chambres des 5 patients afin de tracer la circulation de *P. aeruginosa* sur les surfaces des chambres de patients porteurs de *P. aeruginosa* et de déterminer les liens entre la contamination de l'eau, des points d'eau, des surfaces et des patients. Cette circulation est représentée sur la figure 15 et les sites contaminés par *P. aeruginosa* ont été listés dans le tableau 1.

Parmi ces patients, deux étaient porteurs de *P. aeruginosa* à leur admission (patients 1 et 2) mais la recherche du portage à la sortie n'a pas été réalisée. Deux autres, non porteurs à l'entrée, étaient porteurs à leur sortie (patients 3 et 5) et le patient 4 était porteur à son admission et à sa sortie du service. Deux patients avaient été accueillis dans 2 chambres différentes au cours de leur hospitalisation : le patient 1 dans les chambres 33 et 14-15 ainsi que le patient 5 dans les chambre 05-06 et 21. Tous les patients étaient mobiles et autonomes pour leur toilette dans leur salle de bain. Le taux de contamination par *P. aeruginosa* des surfaces de leur chambre variait entre 4% et 17%, et une grande diversité de génotypes MR-PCR, 16 différents au total appartenant à 10 ST, a pu être mise en évidence.

#### **- Les patients contaminent-ils leur environnement ?**

Parmi les 5 patients inclus dans l'étude, trois patients étaient porteurs de *P. aeruginosa* à leur entrée dans le service.

Le patient 2 était porteur de *P. aeruginosa* de génotype AD (ST272) et n'a pas contaminé son environnement de soins qui est contaminé par le ST majoritaire ST395 et par le ST2850 isolé chez le patient 1 le même mois.

Le patient 1 était porteur à l'entrée de *P. aeruginosa* de génotype AA (ST2850). L'eau des deux chambres (33 et 14-15) où il a été hospitalisé était aussi contaminée ( $10^4$  UFC/mL) par ce génotype AA ainsi que 2 surfaces, la sonnette d'appel du lit de sa chambre (14-15) et le siphon de la chambre 11 où un autre patient était hospitalisé démontrant que ce génotype

AA a faiblement contaminé l'environnement proche du patient mais a diffusé sur une distance importante (environ 10 mètres) dans la chambre d'un autre patient.

Le patient 4 était porteur de *P. aeruginosa* de génotype AI (ST10000), l'eau de sa douche était contaminée par le génotype AB (ST253) (60 UFC/mL). Six surfaces de soins de sa chambre et de sa salle de bain ont été contaminées par *P. aeruginosa* : 5 surfaces par le génotype AI (table, chaise, robinet, siphon, tablette murale) et 1 surface par le génotype AB (pompeau de douche), démontrant que le génotype AB isolé chez le patient a un succès de diffusion plus important que le génotype AI isolé dans l'eau de la douche. 10,4 % (5/48) des surfaces prélevées étaient contaminées par le génotype patient AI (Figure 15).

Le taux de contamination de l'environnement de soins par les génotypes colonisant les patients est donc très différent selon les patients. Le génotype MLST des patients cohabite dans la plupart des cas avec les génotypes MLST environnementaux majoritaires.

#### **- Le succès de diffusion d'un génotype est-il prédictif du risque de contamination des patients ?**

Le ST qui a eu le succès de diffusion le plus important dans l'environnement est le ST253. D'un point de vue spatial, 57% des surfaces des chambres de patients contaminées par *P. aeruginosa* appartiennent au ST253. De plus le ST253 a été isolé sur les surfaces en novembre 2016 puis en janvier et mars 2017, ce qui montre son installation durable dans le service. Plusieurs génotypes MR-PCR (AB), (AL) et (AC) circulant dans le service appartiennent à ce ST. Les génotypes AB et AL ont été isolés à des dates différentes et dans des chambres différentes, ce qui démontre leur fréquence et leur adaptation dans l'environnement du service.

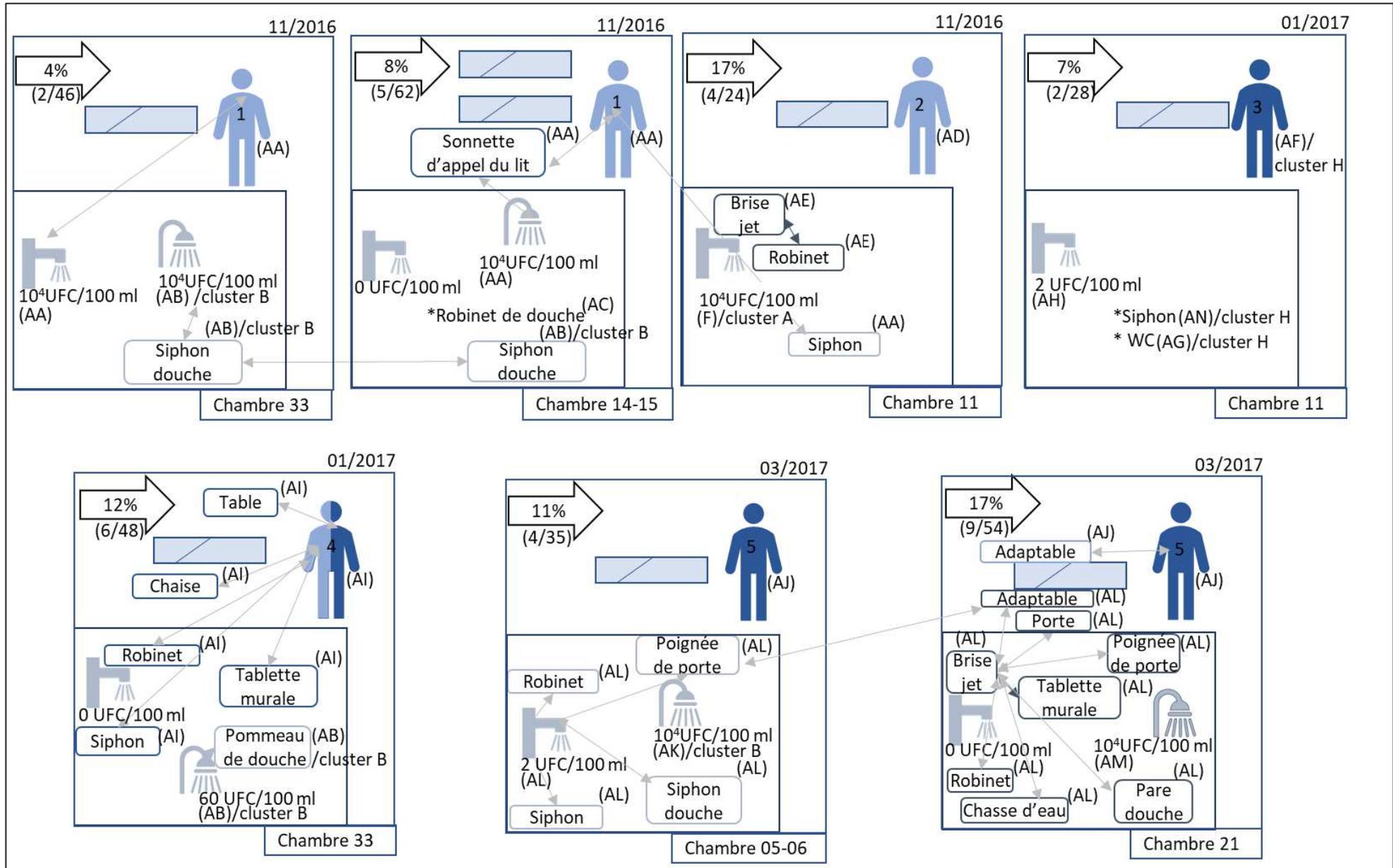
Aucun patient dans l'étude n'était porteur/infecté par *P. aeruginosa* ST253. La forte contamination persistante de l'environnement par le ST253 n'a pas conduit à la contamination des 71 patients de l'étude.

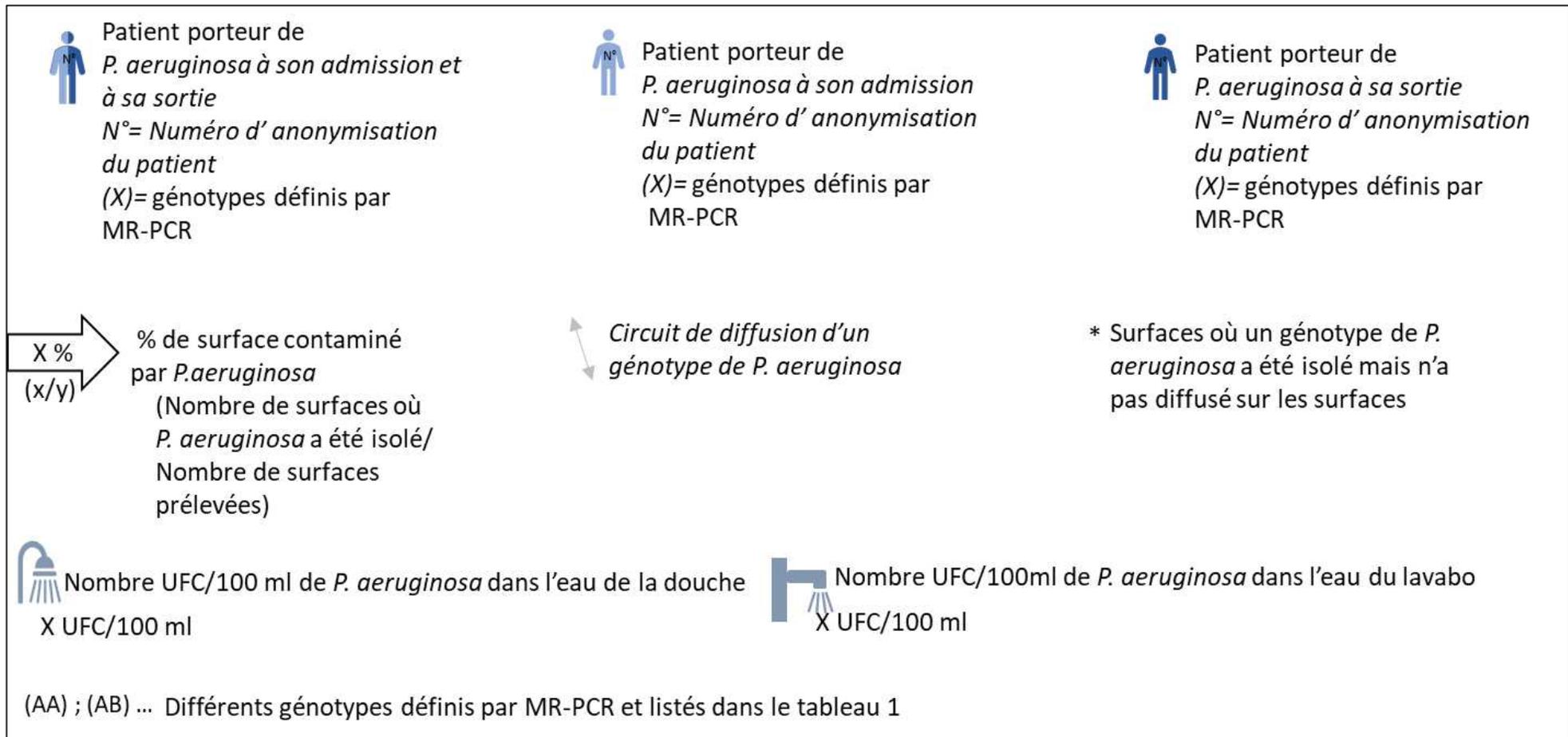
**- Les patients contaminés pendant leur hospitalisation acquièrent-ils une souche de leur environnement de soins ?**

Durant cette étude seulement deux patients ont été contaminés par une souche de *P. aeruginosa* pendant leur séjour : le patient 3 et 5.

Pour le patient 3 contaminé par le génotype MR-PCR AF (ST1651), aucune souche de génotype AF n'a été isolée dans son environnement. L'eau du lavabo était faiblement contaminée (2 UFC/mL) par des souches de génotype MR-PCR AH (ST1753).

Pour le patient 5 contaminé par le génotype AJ (ST209), une souche de génotype AJ a été isolée sur son adaptable. L'eau de la douche des deux chambres (05-06 et 21) où il a été hospitalisé était fortement contaminée ( $10^4$  UFC/mL) par les MR-PCR génotypes AK (ST 253) et AM (ST308). Concernant la souche isolée sur l'adaptable (MR-PCR génotype AJ), soit le patient a contaminé son environnement, soit les surfaces de soins, et plus particulièrement l'adaptable, ont contaminé le patient.





**Figure 15** : Représentation de la circulation de *P. aeruginosa* entre l'eau du réseau, les patients et l'environnement de leur chambre

## F) Discussion

Dans cette étude, nous avons pu démontrer qu'une grande diversité de génotypes MR-PCR (41 profils) de *P. aeruginosa* contaminent les surfaces (humides et sèches) et l'eau des points d'eau de l'unité de soins. Parmi les génotypes MR-PCR identifiés, plusieurs appartenaient au même ST. Ceci s'explique par le fait que le MLST est une méthode moins discriminante que le MR-PCR et que plusieurs génotypes MR-PCR proches sont regroupés dans un même ST (Dupont et al. 2015). En effet, le MLST s'appuie sur le séquençage de gènes de ménage, conservés au sein de l'espèce et présente l'avantage de pouvoir classifier les souches au sein de la structure de population globale de l'espèce *P. aeruginosa* (Curran et al. 2004). Ainsi, nous avons pu démontrer que certains des ST connus comme largement répandus au niveau mondial (ST253 et ST395) circulent également dans notre hôpital (Slekovec et al. 2019). La MR-PCR, en amplifiant les régions inter-géniques de séquences répétées permet de visualiser les réarrangements génomiques au sein de *P. aeruginosa*, ce type de réarrangement étant le principal mécanisme évolutif de l'espèce (Darch et al. 2015). Ces deux méthodes apportent donc une complémentarité et permettent de démontrer la diversité génétique de *P. aeruginosa* dans un service de soin tout en identifiant les génotypes à succès épidémiques internationaux tels que les EHR. En d'autres termes, le MLST permet de déterminer des grande lignées ou sous-populations au sein de l'espèce *P. aeruginosa* alors que la MR-PCR évalue la micro-évolution au sein de ces lignées et permet le traçage de souches dans un contexte temporo-spatial réduit. Cette complémentarité permet aussi de déterminer des clusters de génotypes de même ST pouvant avoir des liens épidémiologiques.

Certains génotypes regroupaient des souches isolées de l'eau et sur des surfaces, reliant la contamination des surfaces à celle de l'eau. Lorsqu'un génotype regroupait une souche isolée d'un patient et des souches isolées sur des surfaces, celui-ci montrait alors un lien entre la contamination environnementale et le patient. Certains génotypes n'étaient composés que de souches isolées sur des surfaces et ne pouvaient donc être reliés à aucune source de contamination (eau ou patient). Ce fait peut s'expliquer par les limites de notre

étude. Tout d'abord les souches isolées uniquement sur des surfaces pourraient être en faible inoculum et donc non détectées. De plus, au sein d'un même prélèvement, un même morphotype pourrait correspondre à deux génotypes différents mais seulement un aurait été identifié et analysé, sous-estimant ainsi la diversité intra-échantillon. L'étude de la diversité de plusieurs morphotypes identiques de *P. aeruginosa* a notamment été analysée dans des échantillons cliniques de patients atteints de mucoviscidose. Par exemple Darch et al. (2015) ont analysé 22 colonies de même morphotype de *P. aeruginosa* issu d'un même échantillon respiratoire. Ils ont pu observer une diversité génétique de ces isolats qui était notamment due aux phénomènes de recombinaison (Darch et al. 2015). Ces limites ne permettent pas d'exclure que les souches isolées sur les surfaces soient d'origine hydrique et non détectées dans l'eau ou d'origine humaine et non détectée chez le patient, soit colonisant un soignant ou un visiteur et donc non recherchées.

De plus en plus d'études ont montré que l'origine exogène des colonisations/infections à *P. aeruginosa* ne peut être négligée et que l'environnement joue un rôle majeur dans la transmission de *P. aeruginosa* aux patients aussi bien en période épidémique (Engelhart et al. 2002) que hors-épidémique (Venier et al. 2014) (Coppry et al. 2019). Ainsi, certains auteurs ont démontré que l'eau contaminée par *P. aeruginosa* était la source de la contamination des patients (Romano et al. 2013) (Garvey et al. 2018) (Coppry et al. 2019), mais que des surfaces humides (Davis et al. 2015) ou sèches (Bicking Kinsey et al. 2017) contaminées par *P. aeruginosa* pouvaient aussi être à la source de contamination des patients. Dans notre étude, nous n'avons pas pu démontrer de transmission directe de *P. aeruginosa* de l'eau d'un point d'eau au patient, bien que l'eau du service soit fortement contaminée par une grande diversité de génotypes de *P. aeruginosa*. De plus, nous n'avons pas démontré que des surfaces humides ou sèches étaient à l'origine de la contamination de patients malgré la circulation de nombreux génotypes de *P. aeruginosa* sur les surfaces et dans certains cas la forte contamination des surfaces (humides et sèches) de la chambre du patient. Ce fort taux de contamination des surfaces peut en partie être expliqué par une observance de l'hygiène des mains insuffisante entraînant par manuportage une contamination de l'environnement et expliquant la diffusion de souches bactériennes sur les surfaces (Johnson et al. 2009) (Cholley et al. 2010). De plus, l'eau contaminée par *P.*

*aeruginosa* utilisée dans les pratiques du service comme pour l'hygiène des mains pourrait contaminer les mains des soignants puis contaminer l'environnement par manutention. Il est en de même pour l'entretien de l'environnement réalisé à partir d'eau contaminée, qui pourrait contaminer l'environnement lors de l'entretien.

Dans ce service malgré cette forte contamination des surfaces, aucun cas d'infection n'a été recensé. Ceci peut en partie être expliqué par les facteurs de risque propres aux patients qui sont considérés comme moins à risque d'infections opportunistes par rapport à d'autres patients comme ceux d'hématologie ou de réanimation (Viasus et al. 2019).

De plus, notre étude montre l'intérêt d'étudier les surfaces, en plus de l'eau, pour mieux décrire la circulation de *P. aeruginosa* dans un service. La connaissance des circuits de *P. aeruginosa* sur les surfaces permettra d'évaluer le risque de contamination des patients et d'IAS d'origine exogène et pourra permettre de résoudre les phénomènes épidémiques.

L'étude des surfaces présente un avantage supplémentaire, car prélever les surfaces permet d'avoir le reflet des génotypes contaminant l'eau et ayant eu un succès de diffusion ou de persistance dans l'environnement et donc les plus à risque d'exposer les patients, ceci d'autant plus que prélever une seule fois l'eau d'un point d'eau ne permet pas d'avoir le reflet de la contamination de l'eau d'un point d'eau dans le temps. En effet, dans notre étude, nous avons observé une variation de la contamination de l'eau des points d'eau entre le mois de juillet 2016 (où a été réalisé l'état des lieux de la contamination de l'eau) et notre étude de septembre 2016 à mars 2017. Cette variabilité démontre la nécessité de prélever plusieurs fois l'eau d'un même point d'eau pour avoir une idée de la contamination de l'eau dans le temps. Cette variabilité temporelle de la contamination de l'eau des points d'eau a déjà été démontrée pour d'autres PROPRES tels que *Legionella pneumophila* (Benkirate et al. 2019). Dans cette étude, les inocula de *L. pneumophila* pouvaient varier d'un facteur allant jusqu'à 1000 sur le suivi hebdomadaire pendant 12 semaines, alors qu'aucune action pouvant expliquer ces variations n'était réalisée sur le réseau d'eau (Benkirate et al. 2019). Cette étude démontre bien la dimension dynamique de la contamination d'un réseau d'eau et la nécessité de réaliser plusieurs prélèvements d'eau pour en avoir une vision approchant la réalité. Face à cette variabilité de la contamination de l'eau d'un point d'eau, les prélèvements de surface autour des points d'eau à proximité des patients présentent tout

leur intérêt. En effet ils permettent d'identifier les géotypes ayant le plus grand succès de persistance et de diffusion dans l'environnement. Une hypothèse est que ces derniers, en contaminant ainsi durablement leur environnement proche, seraient les plus à risque d'exposition des patients et donc les plus susceptibles de les contaminer. Pour autant, ce n'est pas ce que nous avons observé dans notre étude. Ceci pourrait être dû au fait que les patients souffrant de pathologie ORL sont moins à risque d'infections opportunistes que des patients plus vulnérables comme ceux souffrant de cancers hématologiques ou hospitalisés en réanimation (SF2H 2016).

Dans notre étude, nous avons montré que les géotypes qui circulaient le plus sur les surfaces appartenaient au ST253. Ce ST253 est connu comme ayant eu une diffusion mondiale et circulant dans les hôpitaux Français (Treepong et *al.* 2018) (Slekovec et *al.* 2019). Notre étude nous permet d'émettre l'hypothèse que la diversité génétique en MR-PCR au sein de ce ST253 pourrait être une piste pour son succès de diffusion voire son succès épidémique comme pour le ST308 (Abdouchakour et *al.* 2018). En effet dans l'article de Abdouchakour et *al.* (2018), l'hypothèse est que le succès de diffusion du ST308 dans l'ES était en partie dû à la diversité génomique et phénotypique des souches colonisant le réseau d'eau, lui permettant de résister aux différentes pressions environnementales. Ce phénomène est sûrement dû à l'évolution de plusieurs lignées de ST308 adaptées aux différentes niches qui forment l'écosystème hospitalier. Afin de mieux connaître les souches les plus à risque pour les patients, il pourrait être intéressant de trouver des marqueurs phénotypiques au sein de cette population de ST253 qui a eu le succès de diffusion, afin d'identifier une sous-population ayant des caractéristiques phénotypiques comme leur capacité à former du biofilm, leur motilité, leur fitness, ou leur résistance aux antibiotiques/biocides qui pourrait prédire un risque de diffusion et/ou de phénomène épidémique (Abdouchakour et *al.* 2018).

**Tableau 1:** Tableau listant les différents sites contaminés par *P. aeruginosa* et les différents géotypes de *P. aeruginosa* isolés sur ces sites.

Les souches notées Hx sont d'origine hydrique, Px sont d'origine clinique et Sx ont été isolées sur une surface.

Date de prélèvement	Lieu de prélèvement ou Nom du patient	Site de prélèvement où <i>P. aeruginosa</i> a été isolé	Nom de la souche	Nom du géotype défini par MR-PCR	Séquence type
juil-16	Chambre 03-04	Eau de la douche	H <sub>1</sub>	A	17
juil-16	Vidoir 2	Eau du vidoir	H <sub>2</sub>	A	17
juil-16	Chambre 05-06	Eau de la douche	H <sub>3</sub>	B	253
juil-16	Chambre 14-15	Eau de la douche	H <sub>4</sub>	B	253
juil-16	Chambre 18-19	Eau de la douche	H <sub>5</sub>	B	253
juil-16	Chambre 22	Eau du lavabo	H <sub>6</sub>	B	253
juil-16	Chambre 23	Eau du lavabo	H <sub>7</sub>	B	253
juil-16	Chambre 24-25	Eau de la douche	H <sub>8</sub>	B	253
juil-16	Chambre 31-32	Eau de la douche	H <sub>9</sub>	B	253
juil-16	Chambre 33	Eau de la douche	H <sub>10</sub>	B	253
juil-16	Salle de bain commune	Eau de la douche	H <sub>11</sub>	B	253
juil-16	Vidoir 1	Eau du vidoir	H <sub>12</sub>	B	253
juil-16	Chambre 28	Eau de la douche	H <sub>13</sub>	B'	253
juil-16	Chambre 29-30	Eau de la douche	H <sub>14</sub>	C	308
juil-16	Chambre 29-30	Eau du lavabo	H <sub>15</sub>	D	27
juil-16	Salle de détente du personnel	Eau du lavabo	H <sub>16</sub>	D	27
juil-16	Chambre 16-17	Eau de la douche	H <sub>17</sub>	E	564
juil-16	Chambre 22	Eau de la douche	H <sub>18</sub>	F	395
juil-16	Chambre 21	Eau de la douche	H <sub>19</sub>	G	308
juil-16	Chambre 20	Eau de la douche	H <sub>20</sub>	H	1665
juil-16	Chambre 07-08	Eau de la douche	H <sub>21</sub>	I	308
juil-16	Chambre 11	Eau du lavabo	H <sub>22</sub>	J	395
sept-16	Office alimentaire	Brise jet	S <sub>1</sub>	K	27
sept-16	Office alimentaire	Siphon	S <sub>2</sub>	L	308
sept-16	Office alimentaire	Surface humide autour du lavabo	S <sub>3</sub>	K	27
sept-16	Office alimentaire	Robinet	S <sub>4</sub>	K	27
sept-16	Office alimentaire	Armoire	S <sub>5</sub>	K	27
sept-16	Office alimentaire	Interrupteur lumière	S <sub>6</sub>	K	27
sept-16	Office alimentaire	Glaçons	S <sub>7</sub>	M	381

Partie I : Diffusion et persistance de bactéries d'origine hydrique sur les surfaces des unités de soins

sept-16	Vidoir n°2	Eau du vidoir	H <sub>23</sub>	N	17
sept-16	Pièce dédiée à l'entretien de l'environnement	Siphon	S <sub>8</sub>	O	348
sept-16	Pièce dédiée à l'entretien des canules de trachéotomie	Brise jet	S <sub>9</sub>	O	348
sept-16	Pièce dédiée à l'entretien des canules de trachéotomie	Eau du lavabo	H <sub>24</sub>	P	348
sept-16	Pièce dédiée à l'entretien des canules de trachéotomie	Surface humide autour du lavabo	S <sub>10</sub>	P	348
sept-16	Pièce dédiée à l'entretien des canules de trachéotomie	Siphon	S <sub>11</sub>	Q	10 001
sept-16	Chambre 18-19	Eau du lavabo	H <sub>25</sub>	R	253
sept-16	Chambre 18-19	Eau du lavabo	H <sub>26</sub>	S	253
sept-16	Chambre 18-19	Eau de la douche	H <sub>27</sub>	T	395
sept-16	Chambre 18-19	Distributeur de papier pour les mains	S <sub>12</sub>	T	395
sept-16	Chambre 18-19	Pommeau de douche	S <sub>13</sub>	T	395
sept-16	Chambre 18-19	Pare-douche	S <sub>14</sub>	T	395
sept-16	Chambre 18-19	Pommeau de douche	S <sub>15</sub>	U	167
sept-16	Chambre 18-19	Porte serviette	S <sub>16</sub>	U	167
sept-16	Chambre 18-19	Siphon douche	S <sub>17</sub>	U	167
sept-16	Chambre 21	Eau lavabo	H <sub>28</sub>	V	253
sept-16	Chambre 21	Eau de la douche	H <sub>29</sub>	V	253
sept-16	Chambre 21	Siphon	S <sub>18</sub>	W	252
sept-16	Chambre 21	Robinet	S <sub>19</sub>	W	252
sept-16	Chambre 21	Tablette murale	S <sub>20</sub>	W	252
sept-16	Chambre 21	Siphon douche	S <sub>21</sub>	W	252
sept-16	Chambre 21	Bassine	S <sub>22</sub>	X	308
sept-16	Chambre 21	Siphon	S <sub>23</sub>	X	308

## Partie I : Diffusion et persistance de bactéries d'origine hydrique sur les surfaces des unités de soins

sept-16	Chambre 34	Eau de la douche	H <sub>30</sub>	Y	1750
sept-16	Chambre 34	Poignée de porte de la SDB	S <sub>24</sub>	Z	253
sept-16	Chambre 34	Siphon	S <sub>25</sub>	Z	253
sept-16	Chambre 34	Robinet	S <sub>26</sub>	Z	253
sept-16	Chambre 34	Bassine	S <sub>27</sub>	Z	253
sept-16	Chambre 34	Distributeur de savon doux	S <sub>28</sub>	Z	253
nov-16	Patient 1	Buccal	P <sub>A</sub>	AA	2850
nov-16	Chambre 33	Eau du lavabo	H <sub>31</sub>	AA	2850
nov-16	Chambre 33	Eau de la douche	H <sub>32</sub>	AB	253
nov-16	Chambre 33	Siphon douche	S <sub>29</sub>	AB	253
nov-16	Chambre 14-15	Eau de la douche	H <sub>33</sub>	AA	2850
nov-16	Chambre 14-15	Sonnette d'appel du lit	S <sub>30</sub>	AA	2850
nov-16	Chambre 14-15	Siphon douche	S <sub>31</sub>	AB	253
nov-16	Chambre 14-15	Robinet de douche	S <sub>32</sub>	AC	253
nov-16	Patient 2	Buccal	P <sub>B</sub>	AD	272
nov-16	Chambre 11	Robinet	S <sub>33</sub>	AE	395
nov-16	Chambre 11	Brise jet lavabo	S <sub>34</sub>	AE	395
nov-16	Chambre 11	Siphon	S <sub>35</sub>	AA	2850
nov-16	Chambre 11	Eau du lavabo	H <sub>34</sub>	F	395
janv-17	Patient 3	Buccal	P <sub>C</sub>	AF	1651
janv-17	Chambre 11	Siphon	S <sub>36</sub>	AN	1651
janv-17	Chambre 11	WC	S <sub>37</sub>	AG	1651
janv-17	Chambre 11	Eau lavabo (2UFC)	H <sub>35</sub>	AH	1753
janv-17	Patient 4	Buccal	P <sub>D</sub>	AI	10 000
janv-17	Chambre 33	Eau de la douche	H <sub>36</sub>	AB	253
janv-17	Chambre 33	Chaise	S <sub>38</sub>	AI	10 000
janv-17	Chambre 33	Table	S <sub>39</sub>	AI	10 000
janv-17	Chambre 33	Robinet	S <sub>40</sub>	AI	10 000
janv-17	Chambre 33	Siphon	S <sub>41</sub>	AI	10 000
janv-17	Chambre 33	Tablette murale	S <sub>42</sub>	AI	10 000
janv-17	Chambre 33	Pommeau de douche	S <sub>43</sub>	AB	253
mars-17	Patient 5	Buccal	P <sub>E</sub>	AJ	209
mars-17	Chambre 05-06	Eau de la douche	H <sub>37</sub>	AK	253
mars-17	Chambre 05-06	Eau du lavabo	H <sub>38</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 05-06	Poignée de porte de la salle de bain	S <sub>44</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 05-06	Robinet	S <sub>45</sub>	AL	253

Partie I : Diffusion et persistance de bactéries d'origine hydrique sur les surfaces des unités de soins

mars-17	Chambre 05-06	Siphon	S <sub>46</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 05-06	Siphon douche	S <sub>47</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 21	Eau de la douche	H <sub>39</sub>	AM	308
mars-17	Chambre 21	Brise jet lavabo	S <sub>48</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 21	Adaptable	S <sub>49</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 21	Poignée de porte de la salle de bain	S <sub>50</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 21	Porte de la salle de bain	S <sub>51</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 21	Robinet	S <sub>52</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 21	Tablette murale	S <sub>53</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 21	Chasse d'eau	S <sub>54</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 21	Pare douche	S <sub>55</sub>	AL	253
mars-17	Chambre 21	Adaptable	S <sub>56</sub>	AJ	209

## Conclusion de la partie expérimentale 1

Cette étude avait pour objectif de décrire la circulation et la diffusion des PROPRES, avec *P. aeruginosa* comme chef de file, dans deux unités de soins afin d'avoir une vision plus large de leur diffusion environnementale et de l'exposition des patients. Dans le service d'hématologie considéré comme à risque et dont le réseau d'eau est partiellement filtré, une faible circulation de *P. aeruginosa* et de bactéries indicatrices *Pseudomonas* spp. a été observée. Dans le service d'ORL considéré non à risque, dont le réseau d'eau n'est pas filtré, une grande diversité de génotypes de *P. aeruginosa* a circulé mais ni l'eau, ni les surfaces n'ont pu être incriminées comme la source directe de la contamination à *P. aeruginosa* des patients. Ce dernier constat justifie que ce service d'ORL ne soit pas considéré comme à risque, et qu'aucune surveillance microbiologique environnementale ne soit réalisée.

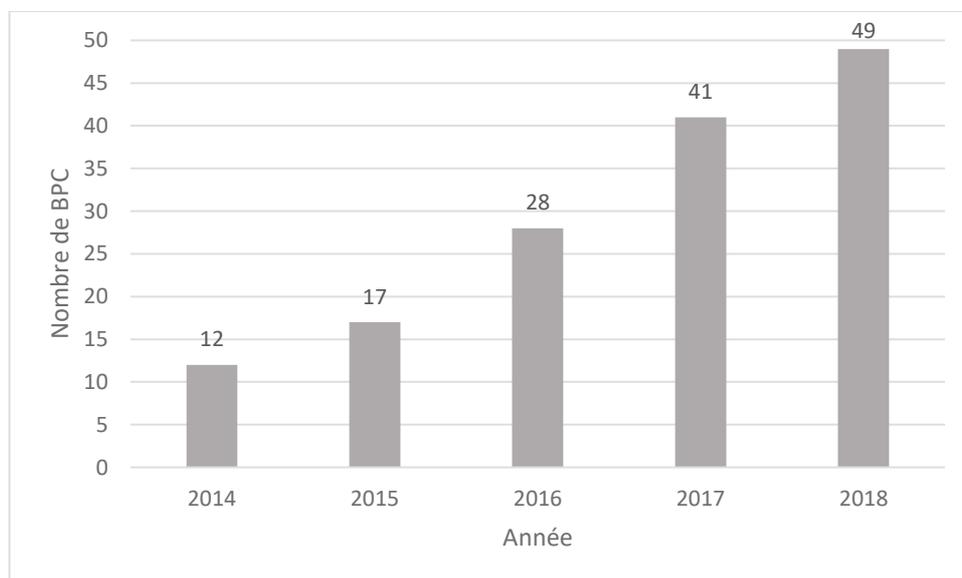
Cette étude a démontré que *P. aeruginosa* pouvait circuler d'une source environnementale, de l'eau du point d'eau aux surfaces de soins. Il a aussi été démontré que des patients colonisés par *P. aeruginosa* pouvaient contaminer les surfaces de soins. Une question peut alors se poser : si des patients sont infectés/colonisés par d'autres microorganismes ayant une origine non-environnementale, ces microorganismes peuvent-ils contaminer l'environnement de soins ? Quelle serait la circulation de ces microorganismes sur les surfaces de soins ? Et quelle serait leur implication dans les IAS et/ou les phénomènes épidémiques ?

Pour répondre à ces questions, la 2<sup>ème</sup> partie expérimentale de cette thèse s'est intéressée à la circulation des bactéries d'origine humaine sur les surfaces de soins et plus particulièrement aux bacilles à gram négatif résistants aux antibiotiques et émergents.

**Partie II : Diffusion et persistance**  
**de bactéries d'origine humaine**  
**sur les surfaces des unités de**  
**soins**

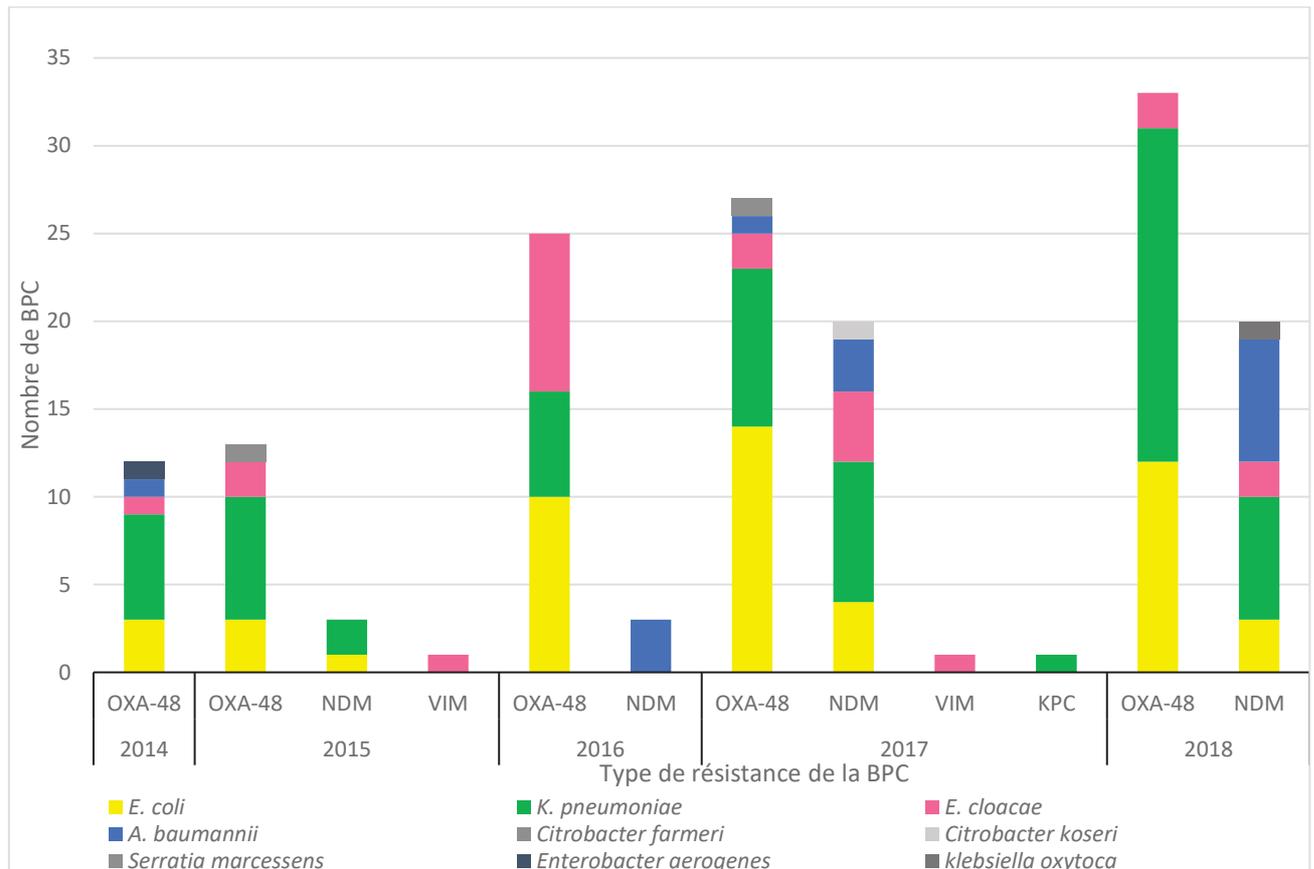
## Introduction et contexte général du CHU de Montpellier

Depuis la mise sur le marché des carbapénèmes, on observe l'émergence des bactéries productrices de carbapénémases (BPC) aussi bien au niveau mondial qu'en France (ECDC, 2017) (Logan et *al.* 2017). Au CHU de Montpellier, nous avons pu observer localement cette augmentation du nombre d'hospitalisations de patients porteurs/infectés par une BPC. Ainsi en 5 ans, le nombre de BPC isolées chez les patients hospitalisés dans notre CHU a été multiplié par 4,1, passant de 12 à 49 BPC entre 2014 et 2018 (Figure 16).



**Figure 16 :** Nombre de bactéries productrices de carbapénémases (BPC) isolées chez les patients hospitalisés au CHU de Montpellier de 2014 à 2018.

Au CHU de Montpellier, les BPC les plus fréquemment isolées sont des *E. coli* OXA-48 et des *K. pneumoniae* OXA-48. Cette observation est en accord avec la littérature où les BPC de type OXA-48 sont considérées comme majoritaires en France (Friedman et *al.* 2017). En 2017, au CHU de Montpellier on a également observé une augmentation du nombre de BPC de type NDM passant de 3 à 20. Cette augmentation s'explique en partie par une épidémie de BPC de type NDM-1 survenue en 2017. Dans notre CHU, 4 types de carbapénémases ont été identifiées : OXA-48, NDM, VIM et KPC (Figure 17), ce qui est également comparable avec des études publiées dans d'autres ES français (Logan et *al.* 2017) (Friedman et *al.* 2017).



**Figure 17 :** Nombre de BPC, selon leur type de résistance, isolées chez des patients hospitalisés au CHU de Montpellier de 2014 à 2018.

Au CHU de Montpellier, nous avons pu aussi remarquer comme décrit dans la littérature que l'environnement joue un rôle majeur dans la diffusion de ces BPC et dans les phénomènes épidémiques en servant de réservoir/relais (Vonberg et *al.* 2011) (Bouguenoun et *al.* 2016). Par exemple, au CHU de Montpellier, le siphon d'une chambre a été le réservoir/relais d'une épidémie de *K. pneumoniae* de 2012-2014, impliquant 17 patients dont 6 avaient été hospitalisés dans cette chambre (Clarivet et *al.* 2016). Mieux tracer la diffusion des BPC dans l'environnement apparaît donc comme un axe majeur de recherche pour mieux évaluer les risques de transmissions croisées et les phénomènes épidémiques.

### **Objectif : Diffusion des BPC sur les surfaces des unités de soins ?**

L'objectif principal de cette deuxième partie expérimentale est de mieux comprendre la diffusion dans l'environnement de soins des BPC et de définir leurs niches environnementales de persistance sur les surfaces de soins autour de cas de patients porteurs/infectés par une BPC, et afin de mieux comprendre le succès de diffusion de certaines sous-populations de BPC.

Pour cela, une analyse de la circulation des BPC a été réalisée avec des prélèvements intensifs de l'environnement hospitalier dans deux situations : dans les chambres de patients porteurs/infectés par une BPC hors situation épidémique et dans une unité de soins lors d'un épisode épidémique.

### **Stratégie générale d'étude**

Ce travail a été réalisé dans 18 services de soins différents entre novembre 2015 et mai 2018 lors de l'accueil de 32 patients porteurs/infectés par une BPC. Les différents patients inclus dans l'étude sont listés dans le tableau 2.

Dans un premier temps, dans chaque service, une période d'observation (avant la réalisation des prélèvements de surfaces) a permis d'auditer et ajuster les pratiques de soins, la compliance à l'hygiène des mains, les PS et PC, et l'entretien de l'environnement, afin être homogènes et d'éviter tout biais lié aux pratiques de soins.

Des données de clinique, d'écologie microbienne et d'épidémiologie ont été collectées pour chaque situation correspondant respectivement :

- aux caractéristiques du patient, la pathologie, l'autonomie, les traitements anti-infectieux, le mode et les conditions d'hospitalisation
- à l'entretien de l'environnement, les pratiques de soins, l'organisation du service
- à la situation infectieuse actuelle et ancienne des patients accueillis dans le service, l'histoire épidémique du service, la qualité des pratiques de prévention.

Les souches environnementales ont été collectées dans des services de soins en activité, ce qui est le reflet réel de la contamination des surfaces pouvant être reliée à ces données cliniques, écologiques et épidémiologiques.

Puis une cartographie des sites contaminés dans l'environnement hospitalier a été réalisée. Pour cela des prélèvements intensifs de surfaces ont été effectués dans les services de soins en activité et particulièrement dans les chambres de patients porteurs/infectés par une BPC, à l'aide d'écouvillons secs en coton stérile. Les prélèvements de surfaces dans la chambre des patients ont tous été réalisés 24 h après l'entretien de la chambre et en présence des patients dans la chambre. Une trentaine de surfaces ont été prélevées, les zones de manuportage, les objets relais et les réservoirs environnementaux ont été ciblés (Tableau 3). Dans chaque chambre, et pour un même patient, plusieurs séries de prélèvements ont été réalisées à quelques jours d'intervalle. Le nombre de prélèvements et de séries réalisés dans chaque chambre est listé dans le tableau 2. Les écouvillons ont été ensemencés dans des bouillons d'enrichissement trypticase soja (Difco®), incubés 24h à 37°C puis repiqués sur des géloses sélectives des bactéries à Gram négatif, MacConkey (Difco®). Chaque morphotype obtenu a été identifié par Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) (Bruker®). Puis la résistance aux antibiotiques des souches environnementales et cliniques a été recherchée par antibiogramme et par PCR spécifique des gènes OXA-48, NDM. Et un typage intra-spécifique des souches environnementales et cliniques a été réalisé par rep-PCR, RFLP en ECP et MLST. Ces approches génotypiques permettent d'évaluer la diversité des BPC et de tracer la diffusion des bactéries humaines et environnementales au sein de l'unité de transmission que représente le patient dans son environnement de soins.

Ce travail est structuré en trois parties : dans la première partie nous étudierons les caractères cliniques des patients porteurs/infectés par des BPC en lien avec la diffusion des BPC dans l'environnement de soins; dans la seconde partie nous définirons les différents réservoirs de BPC dans l'environnement de soins et enfin nous étudierons l'intérêt de réaliser des prélèvements intensifs afin de mieux comprendre les transmissions des BPC entre les patients et entre les patients et l'environnement de soins.

**Tableau 2 :** Liste des patients inclus dans l'étude et données sur les prélèvements de surface réalisés dans leur chambre

Numéro du patient	Type de BPC clinique	ST des souches clinique	Service d'hospitalisation	Date entrée de sortie dans la chambre	Numéro de chambre	Portage/ Infection	Nombre de BPC	Nombre de prélèvements	Nombre de série de prélèvements	Moyenne du taux de contamination des chambres par les mêmes espèces bactériennes que les BPC infectant/colonisant le patient (%)
Patient 1	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST101	Endocrinologie	16/05/16 au 23/08/16	389	Portage	48	259	11	19,7
Patient 2	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST273	Maladies infectieuses et tropicales	29/12/16 au 23/05/17	1	Infection	14	236	8	5,9
Patient 3	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST1419	Hépatogastro-entérologie B	08/01/17 au 11/01/17	2116	Portage	0	56	2	5,4
Patient 4	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST405	Brûlés	29/03/18 au 21/04/18	38	Infection	3	107	3	3,7
Patient 5	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST395	Orthopédie-Traumatologie	23/10/15 au 10/12/15 29/05/16 au 10/06/16	840/842	Portage	4	160	5	3,1
Patient 6	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST395	Maladies infectieuses et tropicales	30/01/16 au 17/02/16	16	Portage	1	60	2	1,7
Patient 7	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST395	Orthopédie-Membre inférieur et rachis	03/12/15 au 28/12/15	844	Portage	0	33	1	0,0
Patient 8	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST395	Maladies infectieuses et tropicales	20/01/16 au 02/02/16	17	Infection	0	24	1	0,0
Patient 9	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST101	Gériatrie	04/02/16 au 10/02/16	181	Portage	0	20	1	0,0

## Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins

Patient 10	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST45	Rhumatologie	04/02/17 au 14/02/17	511	Portage	0	100	3	0,0
Patient 11	<i>K. pneumoniae</i> NDM-1	ST11	Maladies infectieuses et tropicales	13/07/16 au 28/07/16	15	Infection	3	129	4	4,7
Patient 12	<i>K. pneumoniae</i> KPC-2	ST147	Hépatogastro-entérologie A	30/04/17 au 05/05/17	2164	Infection	0	33	1	0,0
Patient 13	<i>E. coli</i> OXA-48	ST10	Chirurgie plastique pédiatrique	22/11/16 au 23/11/16 20/12/16 au 21/12/16	909 /919	Portage	0	74	3	6,8
Patient 14	<i>E. coli</i> OXA-48	ST410	Dermatologie	21/12/16 au 21/01/17	1602	Portage	0	33	1	6,1
Patient 15	<i>E. coli</i> OXA-48	ST10	Hépatogastro-entérologie B	31/12/16 au 19/02/17	2113	Portage	0	204	8	1,5
Patient 16	<i>E. coli</i> OXA-48	ST100000	Médecine vasculaire	19/11/16 au 14/12/16	1262	Portage	0	48	2	0,0
Patient 17	<i>E. coli</i> OXA-48	ST3835	Orthopédie-Traumatologie	25/01/16 au 04/02/16	759	Portage	0	27	1	0,0
Patient 18	<i>E. coli</i> OXA-48	ST70	Maladies infectieuses et tropicales	30/01/16 au 21/03/16	15	Portage	0	111	5	0,0
Patient 19	<i>E. coli</i> NDM-1	ST404	Brûlés	09/03/18 au 06/04/18	35	Infection	0	26	1	0,0
Patient 20	<i>E. cloacae</i> OXA-48	ST1152	Endocrinologie	14/12/16 au 22/12/16	400	Portage	14	69	3	26,1
Patient 21	<i>E. cloacae</i> OXA-48	ST114	Plaies et cicatrisation	26/10/15 au 03/11/15	138	Portage	0	40	1	0,0
Patient 22	<i>E. cloacae</i> OXA-48		Hématologie à temps complet	20/12/15 au 09/02/16	220	Portage	0	9	1	0,0
Patient 23	<i>E. cloacae</i> OXA-48	ST127	Maladies infectieuses et tropicales	23/11/16 au 07/12/16	15	Portage	0	74	3	0,0
Patient 24	<i>A. baumannii</i> NDM-1	ST231, ST10000 et ST10001	Brûlés	13/06/17 au 18/07/17	33	Portage	29	131	6	23,7

## Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins

Patient 25	<i>A. baumannii</i> NDM-1 et <i>E. cloacae</i> NDM-1	<i>A. baumannii</i> ST10000 <i>E. cloacae</i> ST66	Brûlés	15/02/18 au 09/03/18	34	Portage	37	119	4	31,1
Patient 26	<i>A. baumannii</i> NDM-1 <i>K. pneumoniae</i> NDM-1 et OXA-48 <i>E. cloacae</i> NDM-1 et <i>E. coli</i> NDM-1	<i>A. baumannii</i> ST231, ST1089, ST10000 <i>K. pneumoniae</i> ST45 <i>E. cloacae</i> ST66 <i>E. coli</i> ST69	Brûlés	08/06/17 au 27/07/17	34	Infection	22	85	5	30,6
Patient 27	<i>E. cloacae</i> NDM-1 et <i>E. coli</i> NDM-1	<i>E. cloacae</i> ST78 <i>E. coli</i> ST2599	Chirurgie cardiaque et vasculaire	08/01/17 au 11/01/17	3280	Portage	4	26	1	26,9
Patient 28	<i>E. coli</i> OXA-48 et <i>K. pneumoniae</i> NDM-5	<i>E. coli</i> ST410 <i>K. pneumoniae</i> ST15	Hépatogastro-entérologie A	27/04/18 au 06/05/18	1166	Portage	9	168	5	5,4
Patient 29	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48 et <i>E. coli</i> NDM-1	<i>K. pneumoniae</i> ST70 <i>E. coli</i> ST58	Orthopédie-Traumatologie	10/04/17 au 18/04/17	0760	Portage	1	28	1	3,6
Patient 30	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48, <i>E. cloacae</i> OXA-48 et <i>A. baumannii</i> NDM-1	<i>K. pneumoniae</i> ST13 <i>E. cloacae</i> ST121 <i>A. baumannii</i> ST10003	Réanimation-Traumatologie	22/02/17 au 15/03/17	0598	Portage	3	122	5	2,5
Patient 31	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48 et <i>E. coli</i> OXA-48		Oncologie hématologie pédiatrique	29/12/16 au 23/05/17	1308	Infection	0	41	2	0,0
Patient 32	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48 et <i>E. coli</i> OXA-48	<i>K. pneumoniae</i> ST35 <i>E. coli</i> ST10	Chirurgie pédiatrique	09/02/17 au 19/02/17	919	Portage	0	25	1	0,0

**Tableau 3 :** Sites de prélèvements dans la chambre des patients

Lieu	Catégorie	Sous-Catégorie	Surfaces
Chambre	Objets relais	Objets polymanipulés	Interrupteur lumière de la chambre, Manivelle fenêtre, Poignée de porte de la chambre
		Communication	Clavier ordinateur, Télécommande de la télévision, Téléphone
		Réglage de la température et aérolique	Climatisation, Radiateur, Ventilateur, Système de traitement d'air type Plasmair®
		Chambre	Bandeau lumineux, Etagère, Patère
		Autres	Pichet d'eau
	Objets relais dédiés aux soins	Matériel médical	Brassard à tension, Dispositif anti escarre, Lecteur de glycémie, Manomètre de prise de tension pression du ballonnet, Pousse seringue, Respirateur, Stéthoscope, Support perfusion, Tensiomètre, Thermomètre
		Matériel de kinésithérapie	Béquille, Déambulateur, Fauteuil roulant, Sangle du lève personne
		Gestion des Précautions standard et complémentaires	Boite à gants, Console de précaution complémentaire, Flacon de détergent désinfectant, Flacon de solution hydroalcoolique, Poubelle, Bassin, Bassine, Pistolet
	Lit	Literie	Coussin, Matelas surface extérieure
		Structure	Montant de lit, Sonnette d'appel, Télécommande de lit, Télécommande du matelas
	Mobilier	Mobilier	Adaptable, Armoire, Chaise, Chariot Médimat, Relax, Repose pieds, Table, Table de chevet, Lit d'appoint, Matelas visiteur

Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins

Salle de bain	WC	WC	Bouton de la chasse d'eau, Douchette, Eau des WC, WC
	Douche	Douche	Pare douche, Pommeau de douche, Robinet de la douche, Siège de douche pliant, Siphon douche
	Lavabo	Lavabo	Brise jet, Filtre, Lavabo, Meuble lavabo, Siphon, Surface autour du lavabo
	Eléments muraux de la salle de bain	Eléments muraux de la salle de bain	Distributeur de papier WC, Distributeur de savon, Distributeur essuie-mains, Etagère du lavabo, Porte serviette, Poignée de porte de la salle de bain, Poignée d'aide WC, Poignée d'aide dans la salle de bain, Sonnette d'appel des WC, Interrupteur lumière de la salle de bain

## I) Influence des caractères cliniques des patients porteurs/infectés par des BPC dans la diffusion des BPC dans l'environnement de soins

### A) Introduction

Mieux comprendre la diffusion des BPC dans l'environnement de soins passe d'abord par une bonne connaissance des réservoirs de BPC dans un ES. Certaines BPC étant d'origine humaine, comme c'est le cas des EPC, leur principal réservoir est donc constitué par les patients. En effet, comme les entérobactéries sont commensales du microbiote digestif, les patients ayant contracté une infection ou ayant été colonisés par une entérobactérie résistante aux antibiotiques peuvent rester porteurs et lors d'une réadmission à l'hôpital, transmettre leurs entérobactéries à d'autres patients. Ainsi, une étude nantaise a évalué le portage de 102 patients précédemment porteurs/ infectés par une EPC lors de leur réadmission et après une semaine d'hospitalisation (Evain et al. 2019). Elle a démontré que 86,3 % des patients étaient dépistés négatifs contre 13,7% patients dépistés positifs. Après une semaine d'hospitalisation, le statut des patients positifs n'avait pas changé, alors que 23,1% des patients initialement dépistés négatifs à leur réadmission redevaient positifs. Ce changement de statut de non-colonisé à colonisé par une EPC pendant l'hospitalisation, était significativement associé à une antibiothérapie ( $p < 0,001$ ). Cette étude démontre que les patients antérieurement colonisés par une EPC peuvent constituer un réservoir d'EPC qui, sous pression sélective antibiotique, permet la résurgence des bactéries en cause lors d'une hospitalisation ultérieure (Evain et al. 2019). Peuvent donc être considérés comme réservoir de BPC, les patients porteurs/infectés par une BPC et les patients précédemment porteurs/infectés par une BPC. Ce « réservoir patients » pose donc de nombreuses questions de gestion des risques d'IAS. Comment faire pour mieux caractériser ces patients porteurs/infectés par une BPC dès leur hospitalisation ? Tous les patients porteurs/infectés par une BPC présentent-ils le même risque de diffusion de BPC dans leur environnement et donc de transmission aux autres patients ?

Afin de mieux répondre à ces questions, il serait intéressant de définir un profil type de patient, correspondant à des « super-spreaders », définis comme des patients transmettant leurs microorganismes à un large nombre d'individus (James et *al.* 2007). L'étude de Lerner et *al.* 2015 a défini les patients « super-spreader » de BPC de type *K. pneumoniae* KPC comme des patients diffusant plus de BPC dans leur environnement que les autres patients aussi porteurs. Ces patients ont des caractéristiques cliniques spécifiques et sont colonisés par une charge en BPC plus importante dans leur microbiote (Lerner et *al.* 2015). Définir des caractéristiques particulières aux patients susceptibles d'émettre plus de BPC dans leur environnement et donc de contaminer plus largement l'environnement de soins et d'autres patients permettra de mieux comprendre la diffusion de BPC dans l'environnement de soins. Dans notre étude, nous avons comparé les caractéristiques cliniques des patients porteurs/colonisés par des BPC de différentes espèces (*A. baumannii*, *E. cloacae*, *E. coli*, et/ou *K. pneumoniae* ) et de différents résistotypes (NDM-1, OXA-48, ou KPC) ainsi que le taux de contamination des surfaces de leur chambre.

## **B) Matériel et méthodes**

### **1-Détermination du taux de contamination des surfaces des chambres**

Lors de l'hospitalisation de patients porteur/infectés par une BPC, une 30aine de prélèvements de surfaces sont réalisés par écouvillonnage coton, dans leur chambre, 24h après l'entretien et après avoir ajusté les pratiques de soins d'hygiène hospitalière pour chaque patient. Les échantillons de surfaces sont analysés comme décrit dans la stratégie d'étude. Plusieurs séries d'une 30aine de prélèvements sont réalisées dans la chambre d'un même patient à différents jours. Puis, une moyenne des taux de contaminations de ces différentes séries de prélèvements est réalisée. Nous avons analysé les caractéristiques cliniques et de séjour de 21 patients pour lesquels plus de 40 surfaces ont été prélevées dans la chambre.

## **2-Analyse statistique**

Des tests non-paramétriques ont été utilisés : Fisher's exact, Chi-square, Kruskal-Wallis et Mann Whitney. Pour tous les tests, un intervalle de confiance à 95% a été choisi. Les tests ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism<sup>®</sup>.

## **C) Résultats**

### **1-Détermination des groupes de patients**

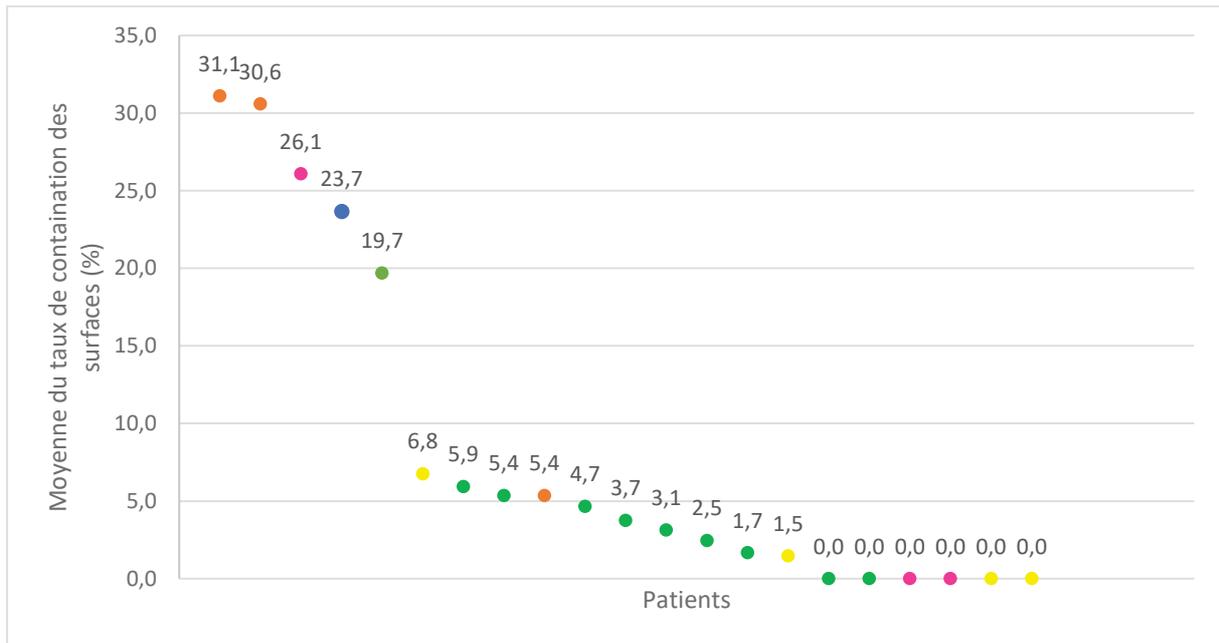
Parmi les 21 patients choisis, trois groupes de patients se distinguent (Figure 18) selon la moyenne du taux de contamination de leur chambre par la même espèce bactérienne que les BPC infectant/colonisant le patient.

La moyenne du taux de contamination des surfaces de la chambres est de :

- 31,1% à 19,7% pour les patients « fortement diffuseurs », correspondant à 5 patients ;
- 6,8% à 1,5% pour les patients « faiblement diffuseurs », regroupant 10 patients ;
- 0% pour les patients « non-diffuseurs » que sont les 6 patients restant.

Les données sur les prélèvements réalisés dans les chambres des patients porteurs/infectés par des BPC sont décrites dans le tableau 2 inséré dans la stratégie d'étude de la partie expérimentale 2.

- Les patients « fortement diffuseurs » sont les patients n° 1, 20, 24, 25 et 26.
- Les patients « faiblement diffuseurs » sont les patients n° 2, 3, 4, 5, 6, 11, 13, 15, 28, 30.
- Les patients « non-diffuseurs » sont les patients n° 10, 16, 18, 21, 23 et 31.



**Figure 18:** Moyenne en pourcentage du taux de contamination des surfaces de la chambre de patients porteurs/infectés par une BPC. Sont représentés, en orange, les taux de contamination des chambres de patients infectés/colonisés par plusieurs BPC, en rose par *E. cloacae*, en bleu par *A. baumannii*, en vert par *K. pneumoniae*, en jaune par *E. coli*.

## 2-Analyse des caractéristiques des patients

Les différentes caractéristiques cliniques et de séjour des patients sont listées dans le tableau 4 ci-dessous. Des données générales (âge/sexe) sur les patients, des données sur leur hospitalisation et sur les pathologies les affectant ont été recueillies. D'autre part, des données sur des facteurs pouvant entraîner la contamination de l'environnement notamment via le manuportage et concernant la gestion des excréta ainsi que l'hygiène corporelle ont aussi été récoltées.

Une analyse statistique a été réalisée pour comparer les 3 groupes de patients puis une autre pour comparer le groupe de patients « fortement diffuseur » aux autres patients.

Les différents tests statistiques réalisés n'ont pas mis en évidence de caractéristique clinique significativement différente entre les différents groupes de patients, même en considérant le groupe de patients « fortement diffuseurs » par rapport aux autres patients (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Caractéristiques cliniques et d'hospitalisation des patients porteurs/infectés par une BPC, regroupées selon leur capacité de diffusion dans l'environnement de soins.

Données sur les patients	Non diffuseur n=6	Faiblement diffuseur n=10	Fortement diffuseur n = 5	Comparaison des 3 groupes (p values)	Comparaison du groupe fortement diffuseur par rapport aux autres (p values)
Age moyen (écart type)	52,6 (23,5)	57,1 (16,3)	58,6 (29,9)	0,5862	0,342
<i>Homme, n (%)</i>	4 (67)	8 (80)	3 (60)	0,6884	0,5975
Infection à BPC, n (%)	1 (17)	2 (20)	0 (0)	0,569	0,5489
<b>Caractérisation du séjour</b>					
Moyenne de la durée de jour d'hospitalisation dans l'année précédent d'hospitalisation en jours (écart type)	24,2 (57,0)	19,1 (59,8)	19,8 (69,9)	0,7105	0,9623
<i>Moyenne de la durée du séjour, en jours (écart type)</i>	74,6 (139,1)	66,6 (145,2)	65,9 (172,4)	0,3911	0,3214
<i>Chirurgie pendant le séjour, n (%)</i>	1 (17)	3 (30)	3 (60)	0,3012	0,28
<b>Maladie chronique</b>					
<i>Hypertension, n (%)</i>	1 (17)	1 (10)	2 (40)	0,5003	0,2281
<i>Obésité, n (%)</i>	0 (0)	0 (0)	2 (40)	0,0818	0,083
<i>Diabète, n (%)</i>	3 (50)	3 (30)	1 (20)	0,5488	0,6244
<i>Pathologie respiratoire, n (%)</i>	0 (0)	0 (0)	1 (20)	0,1864	0,2381
<i>Pathologie rénale, n (%)</i>	0 (0)	2 (20)	0 (0)	0,2965	1
<i>Pathologie cardiovasculaire, n (%)</i>	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0,5613	1
<i>Éthylisme chronique, n (%)</i>	0 (0)	2 (20)	0 (0)	0,2965	1
<b>Affection maligne, n (%)</b>	1 (17)	1 (10)	0 (0)	0,6427	1
<b>Facteurs liés à la gestion des excréta et l'hygiène corporelle</b>					

<i>Stomie, n (%)</i>	0 (0)	2 (20)	2 (40)	0,2416	0,2281
<i>Diarrhée, n (%)</i>	3 (50)	1 (10)	1 (20)	0,1864	1
<i>Mobilité pour les toilettes, n (%)</i>	2 (33)	2 (20)	1 (20)	0,8106	1
<i>Toilette au lit, n (%)</i>	4 (67)	8 (80)	4 (80)	0,8106	1
<b>Dispositifs invasifs, n (%)</b>	5 (83)	9 (90)	5 (100)	0,6427	1
<b>Traitements antibiotiques pendant le séjour</b>	6 (100)	10 (100)	5 (100)		

## D) Discussion

Une étude de ce type a déjà été réalisée chez les patients porteurs de *K. pneumoniae* KPC (Lerner et al. 2015). Dans cette étude, les auteurs ont recherché pour 34 patients, la corrélation entre la concentration de *K. pneumoniae* KPC dans les selles, les caractéristiques cliniques des patients et la contamination des surfaces des chambres des patients. Parmi ces patients, 18% (6/34) ont été classés comme des « super-spreaders ». Pour ces patients définis comme « super-spreaders », plus de 50 colonies de *K. pneumoniae* KPC ont été détectées sur les surfaces de leurs chambres. Dans chaque chambre, 5 prélèvements ont été réalisés avec des géloses contact de 20 cm<sup>2</sup>. Le caractère « super-spreader » est corrélé à certaines caractéristiques cliniques comme l'admission pour une pathologie respiratoire ( $p=0,005$ ), une pathologie secondaire cardiovasculaire ( $p=0,07$ ) ou la démence ( $p=0,01$ ). Les patients « super-spreaders » ont aussi un taux de BPC dans les selles plus important que les patients non « super-spreaders » (0,381 versus 0,126) ( $p=0,049$ ). (Lerner et al. 2015). Dans notre étude, aucun lien significatif n'a été obtenu entre les caractéristiques cliniques ou de séjour et les patients que nous avons défini comme « super-spreaders » de BPC et donc la diffusion dans l'environnement. Parmi, les patients de notre étude un seul avait une pathologie secondaire cardiovasculaire et il était un faible diffuseur de BPC dans l'environnement. Nous n'avons aucun patient atteint de pathologie respiratoire ou de démence.

Dans notre étude, nous n'avons pas pu déterminer le taux de BPC dans les selles des patients car l'analyse bactériologique de routine est uniquement qualitative. Il aurait été

intéressant de vérifier si ce taux est relié à la contamination de l'environnement de soins comme dans l'étude de Lerner et *al.* (2015).

Il aurait aussi été intéressant de réaliser une étude à plus grande échelle afin de comparer les deux définitions de patients « super spreader » : celle de notre étude et celle de l'étude de Lerner et *al.* (2015). Dans notre étude nous avons réalisé un grand nombre de prélèvements (de 40 à 259 prélèvements par chambre) et les patients « super spreader » ont été définis selon la moyenne du taux de contamination des surfaces. Dans l'étude de Lerner et *al.* (2015), ils ont réalisé un faible nombre de prélèvements (5 prélèvements par chambre) mais ont quantifié le nombre de BPC contaminant l'environnement. Ainsi, afin de pouvoir mieux comparer les 2 études et d'avoir une vision plus juste de ce « réservoir patient » qui contamine l'environnement de soins et donc des « super- spreader » de *K. pneumoniae* KPC, il serait intéressant de renouveler l'étude de Lerner et *al.* (2015) en réalisant au moins une 40<sup>aines</sup> de prélèvements dans les chambres de patients porteurs de *K. pneumoniae* KPC afin de vérifier leurs résultats avec notre définition de patient « super spreader »

## E) Conclusion

Nous n'avons pas pu déterminer un profil type de patient porteur/infecté par une BPC contaminant fortement son environnement de soins. L'autre piste serait d'étudier des caractéristiques bactériennes pouvant expliquer les divers niveaux de diffusion et de transmission des BPC dans l'environnement de soins

## **II) Réservoirs et modes de diffusion des populations de BPC autour des patients porteurs**

Cette partie est présentée sous forme d'un article à soumettre pour publication dans *Emerging microbes and infections* ou dans *Epidemics*. Cet article a pour objectif de décrire les différents réservoirs de BPC dans les chambres de patients porteurs/infectés par des BPC. Afin de détecter les habitats environnementaux de BPC, des prélèvements de surfaces ont été réalisés dans les chambres des patients, en leur présence avant entretien de l'environnement. Puis, des tests *in vitro* ont été réalisés afin d'étudier la persistance des BPC sur des surfaces tests et de la comparer à la diffusion/persistance en conditions réelles. Dans cet article, nous avons pu montrer que la diffusion/persistance sur les surfaces de soins dépendait de l'espèce bactérienne, du génotype et du résistotype. On observe une plus grande diffusion/persistance des BPC dans l'environnement en période épidémique et les caractéristiques cliniques du patient ne semblent pas y être reliées. Cet article démontre ainsi que l'environnement de soins constitue un réservoir de BPC et qu'une meilleure connaissance de toute la complexité de diffusion des BPC dans l'environnement de soins permettrait de mieux lutter contre l'émergence des BPC.

### **Article 3 : Carbapenemase-producing bacteria in hospital rooms: diversity of spreading modes**

**Baranovsky S. , Aujoulat F., Marchandin H., Pantel A., Romano-Bertrand S., Jumas-Bilak E.**

## **Carbapenemase-producing bacteria in hospital rooms: diversity and spreading modes**

Sophie Baranovsky<sup>a</sup>, Fabien Aujoulat<sup>b</sup>, Hélène Marchandin<sup>c</sup>, Alix Pantel<sup>d</sup>,  
Sara Romano-Bertrand<sup>a</sup>, Estelle Jumas-Bilak<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> HydroSciences Montpellier, IRD, CNRS, Univ Montpellier, Département d'Hygiène Hospitalière, CHU de Montpellier, Montpellier, France.

<sup>b</sup> HydroSciences Montpellier, IRD, CNRS, Univ Montpellier, Montpellier, France.

<sup>c</sup> HydroSciences Montpellier, CNRS, IRD, University of Montpellier, Department of Microbiology, Nîmes University Hospital, France.

<sup>d</sup>U1047, INSERM, Montpellier University, Department of Microbiology, Nîmes University Hospital, Nîmes, France.

\* Corresponding author: Pr Estelle Jumas-Bilak, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491 34093 Montpellier cedex 5, France, Phone: +33 4 11 75 94 30, Fax: +33 4 67 63 45 11, email: [estelle.bilak@umontpellier.fr](mailto:estelle.bilak@umontpellier.fr)

## ABSTRACT

Resistance to antibiotics by carbapenemase production in Gram-negative bacteria is worrisome and represents a global threat. Natural and hospital environments are described as potential reservoir for carbapenemase-producing bacteria (CPB). In order to improve knowledge on CPB behaviour in hospital environment, diversity (genotype and resistotype) and persistence/diffusion (in room and *in vitro*) of CPB from rooms that accommodated CPB carriers were studied, in both outbreak/non-outbreak contexts. Results showed the successful diffusion of CPB in rooms. The CPB contamination ratio in rooms depended on bacterial traits (species, genotype and resistotype) and type of surfaces (wet or dry) rather than patients' clinical traits. NDM- or OXA-48-*E. coli* generally failed to diffuse/persist in room while NDM-A. *baumannii* highly diffused/persisted and NDM- or OXA-48-K. *pneumoniae* or *E. cloacae* showed an intermediate behaviour. As a result and probably also a cause, outbreak context in the ward led to higher CPB contamination of CPB-carriers rooms than observed in non-outbreak context. Results of *in vitro* tests assessing CPB persistence onto stainless steel, latex and nitrile were congruent on the whole with contamination ratio observed in real conditions. Finally, the data reinforced the growing corpus of clue in favour of hospital environment as a major reservoir of CPB. A better knowledge on CPB behaviour in hospital rooms helps to construct an integrative fight against CPB and resistance to antibiotics.

Keywords: hospital environment; surface contamination; outbreak; carbapenemase; NDM; OXA-48; *Enterobacteria*; *Acinetobacter baumannii*

## INTRODUCTION

Resistance to antibiotics is considered as a major threat for human health in the 21st century because it both compromises our ability to treat infectious diseases and undermines major advances in health and medicine (surgery, graft, resuscitation, cancer treatment...). Multidrug-resistant Gram-negative bacteria are of concern, even more when they resist to last resorts antibiotics such as the carbapenems (Willyard, 2017). Antibiotics options for eradicating carbapenem-resistant *Enterobacteriales*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* are today very limited (Sheu et al, 2019). Carbapenemase production is the most worrying mechanism of resistance to carbapenems because carbapenemase-encoding genes are often plasmid-mediated and therefore can spread among bacteria by horizontal gene transfer (Diene and Rolain, 2014).

In hospital-associated infections (HAI), the most prevalent plasmid-mediated carbapenemase genes included variants of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM), and oxacillinase-48-type carbapenemases (OXA-48) (Diene and Rolain, 2014). These genes and the corresponding carbapenemase-producing bacteria (CPB) are increasingly detected in natural (Almakki et al, 2017) (Mills and Lee, 2019) (Mahon et al, 2019) (Mairi et al, 2019) and hospital environments (Cahill et al, 2019) (Clarivet et al, 2016) (Fernando et al, 2019) (Khan et al, 2018), which are now presented as potential reservoir for carbapenem-resistance (Weingarten et al, 2018) (Zurfluh et al, 2018) (Mills and Lee, 2019). Moreover, the transmission of CRB from environment to patient has been described (Laurens et al, 2018) while the involvement of hospital surfaces in persisting outbreaks of CRB is more and more demonstrated (Kotsanas et al, 2013)

(Vergara-Lopez et al, 2013) (Leitner et al, 2015) (Kizny Gordon et al, 2017) (Clarivet et al, 2016) (Carling, 2018) (Decraene et al, 2018).

Despite the revival in interest for environment as reservoir for resistant pathogens and the increasing number of publications underlining the role of environment in CPB infections and outbreaks, studies focused onto the behaviour of CPB in hospital environment remain scarce. Robust data about the “hidden life” of CPB in hospital environment are needed to minimize the increasing impact of CPB in HAI and public health. Thereby, the objective of this study is to describe persistence and spread of CPB in hospital rooms that accommodate CPB carriers. Results are interpreted according to the CPB diversity at species, genotype and resistotype levels, as well as to the patients' characteristics and type of room surfaces. An *in vitro* test that assesses the persistence of isolates observed in real conditions is proposed.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Settings***

The University Hospital of Montpellier, France, is a 2500-bed tertiary care teaching hospital. A systematic screening for Multi-Drug Resistant (MDR) bacteria considered as endemic in our hospital i.e. meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and cephalosporin-resistant *Enterobacteriales* is performed for all patients admitted to intensive care units for more than 48 h and weekly thereafter. In other units, screening of MDR bacteria including CPB is warranted in patients presenting risk factors: previous carriage (alert in patient file), previous contact with a carrying patient (alert in patient file), transfer from a long-term care facility, chronic wounds and/or indwelling medical device, patients transferred from a foreign hospital or with a previous hospitalization abroad in the last 12 months (alert in

patient file). A daily automatic report from the microbiology laboratory informs the infection control team for CPB-positive clinical or screening samples. CPB-positive patients are immediately put under reinforced contact precautions for the duration of their hospitalization. Immediately after the entrance or the detection of CPB-positive patients in wards, healthcare workers were audited and the infection control team readjusted hygiene practices if necessary.

### ***Clinical and infection control data***

Patients hospitalized between November 2015 and May 2018 in the University Hospital of Montpellier, and positive for CPB were included prospectively in the study when the length of their stays permitted to do sampling at least one campaign in their rooms. Patients were defined as carrier of CPB in case of positive microbiological screening for CPB from a rectal or stool swabbing. Infected patients were defined when a CPB-positive culture was obtained from any other body site, according to clinical data and the start of an antibiotic therapy. An outbreak was defined as at least two CPB carriers, colonized and/or infected patients, were identified in a same ward, and the epidemiologic link between CPB-positive patients was then investigated by genotyping and resistotyping, as described thereafter. The patients' characteristics were collected from their medical file and are compiled in the Table 1.

### ***Clinical and environmental sampling, bacterial isolation and species identification***

Clinical sampling and clinical microbiology analysis is performed according to the good laboratory practices of the hospital in case of suspected infection. When a CPB-positive

patient is included in the study, intensive environmental sampling is performed in the rooms in the presence of the patient 24h after the daily room cleaning. The infection control practices were audited and optimized just after the entrance or the detection of a CPB-positive patient and before sampling in the patient room. A sampling campaign corresponded to about 30 dry and wet surfaces sampled using sterile cotton swabs (Copan Diagnostics Inc, Murrieta, CA, USA) collected the same day. For a room/patient, the total number of samples depended on the number of sampling campaigns and thereby on the length of patient stay. Swabs were pre-incubated 12h at 37°C into a Soybean Typticase broth (Difco, Bordeaux, France) before streaking onto Gram-negative selective medium MacConkey agar (Difco, Bordeaux, France), 24 hours at 37°C. Each growing colony was identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) (Brucker, Champs sur Marne, France).

### ***Genotyping and resistotyping***

Multiplex rep-PCR anchored on REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetition Intergenic Consensus) and BOX sequences was performed as previously described (Abdouchakour et al., 2015) for comparison of strains of the same species isolated in a single room. MultiLocus Sequence Typing was performed as previously described for *K. pneumoniae* (Drancourt et al., 2005), *E. coli* (Wirth et al., 2006), *E. cloacae* (Miyoshi-Akiyama et al., 2013) and *A. baumannii* (Bartual et al., 2005) for population typing within a species. The *bla* genes encoding carbapenemases (OXA-48, KPC and NDM) were detected and characterised by PCR and sequencing (Poirel et al. 2011).

***Bacterial survival onto dry surfaces***

BPC from stationary phase were incubated at 22 °C onto Soybean Typticase Agar plates (Difco, Bordeaux, France). Survival of BPC strains was tested onto sterile surfaces: stainless steel slides (2 cm<sup>2</sup>), latex gloves fragment (~2 cm<sup>2</sup>) and nitrile gloves fragment (~2 cm<sup>2</sup>). Stainless steel slides were sterilized by autoclaving (121°C during 20 min). Latex and nitrile gloves were purchased in individual wrap, sterilized by gamma irradiation. Fragments of gloves were cut aseptically. Every sterile surface was inoculated by a 50 µL-drop of CPB suspension at 0.8 OD in sterile water. For every bacterial strain and type of surface, test was performed 5 times. Therefore, 40 sterile surfaces were inoculated, then dried and placed in sterile plastic boxes at room temperature, 22±0.5 °C. Five of them corresponding to the control were analysed before drying in order to number the bacteria deposited onto each sterile surface. The others were analysed 5 by 5 after drying in order to number the survival bacteria at 1, 6, 24, 30, 48 and 54 hours.

For control and survival bacteria numbering, CPB were recovered by placing the inoculated fragment of material into 10 mL of sterile water, incubating 10 min at room temperature and then vortexing vigorously during 2 min. The suspension was then serially diluted in sterile water and used to inoculate McConkey and McConkey with ertapenem (1 mg/L) agar plates in order to determine the total number of colony-forming units (CFUs) and the number of cefotaxime-resistant CFUs, respectively.

### ***Contamination ratios and statistical analysis***

The surface contamination ratio (CR%) corresponded to the number of positive surface samples / the total number of samples collected onto these surfaces. CR% was obtained for every sampling campaign in a room accommodating a CPB-positive patient. Mean CR% were also calculated for all sampling campaigns i) in a room occupied by a CPB-positive patient, ii) for a CPB-positive patient, iii) at a sampling site or type of sampling site in all rooms, iv) for a species and v) for a genotype or resistotype. Of note, 2 patients were each accommodated in two different rooms in the same ward during their stays (Table 1). For data analysis, the sampling campaigns were not differentiated according to the room in a ward.

Graphical representations and statistical analysis were performed with GraphPad Prism 5. The Kolmogorov and Smirnov test were used to determine the normality of distribution of data for each variable. Fisher's test was used to determine Equality of variances for variables compared two by two. Variables were compared using the Mann Whitney test and the Kruskal-Wallis test for continuous variables and using the Fisher's exact test and the Chi-square test for dichotomized variables. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

**Table 1:** Characteristics of CPB strains isolated and studied herein. \*mean contamination ratio in % per CPB-positive patient or per room (or pair of rooms for patients 5 and 13) ; \*\*classification of patients as high-, low- and no-spreaders and corresponding bacterial strains as high-, low- and no-spreading; \*\*\*the species is noted when several species are detected for a patient or a room. NA, not available for genotyping.

Patient (i) for infection	Patient admission to exit dd/mm/yy	Patient's CPB species and resistotype	Patient's CPB MLST genotype***	Outbreak context	Ward/Room	Number of samples (number of sampling campaigns)	Mean CR%* (type of spreaders or spreading)**	MLST genotypes in rooms*** (CR%)
1	16/05/16 to 23/08/16	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST101	No	A/389	259(11)	19,7 (high)	ST101 (17%) ST45 (2.7%)
2(i)	29/12/16 to 23/05/17	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST273	No	B/1	236(8)	5.9 (low)	ST273 (5.9%)
3	08/01/17 to 11/01/17	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST1419	No	C/2116	56(2)	5.4 (low)	ST1419 (5.4%)
4(i)	29/03/18 to 21/04/18	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST405	No	D/38	107(3)	3.7 (low)	ST405 (1.9%) ST37 (1.9%)
5	23/10/15 to 10/12/15 29/05/16 to 10/06/16	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST395	No	E/840 and 842	160(5)	3.1 (low)	ST395 (3.1%)
6	30/01/16 to 17/02/16	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST395	No	B/16	60(2)	1.7 (low)	ST395 (1.7%)
7	03/12/15 to 28/12/15	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST395	No	E/844	33(1)	0.0 (no)	NA
8(i)	20/01/16 to 02/02/16	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST395	No	B/17	24(1)	0.0 (no)	NA
9	04/02/16 to 10/02/16	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST101	No	F/181	20(1)	0.0 (no)	NA
10	04/02/17 to 14/02/17	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	ST45	No	G/511	100(3)	0.0 (no)	NA
11(i)	13/07/16 to 28/07/16	<i>K. pneumoniae</i> NDM-1	ST11	No	B/15	129(4)	4.7 (low)	ST11 (3.1%) ST231 (1.6%)
12(i)	30/04/17 to 05/05/17	<i>K. pneumoniae</i> KPC-2	ST147	No	H/2164	33(1)	0.0 (no)	NA
13	22/11/16 to 23/11/16 20/12/16 to 21/12/16	<i>E. coli</i> OXA-48	ST10	No	I/909 and 919	74(3)	6.8 (low)	ST10 (4.1%) ST1011 (1.4%) ST2766 (1.4%)
14	21/12/16 to 21/01/17	<i>E. coli</i> OXA-48	ST410	No	J/1602	33(1)	6.1 (low)	ST410 (6.1%)
15	31/12/16 to 19/02/17	<i>E. coli</i> OXA-48	ST10	No	C/2113	204(8)	1.5 (low)	ST648 (1.5%)
16	19/11/16 to 14/12/16	<i>E. coli</i> OXA-48	newST1	No	K/1262	48(2)	0.0 (no)	NA
17	25/01/16 to 04/02/16	<i>E. coli</i> OXA-48	ST3835	No	E/759	27(1)	0.0 (no)	NA
18	30/01/16 to 21/03/16	<i>E. coli</i> OXA-48	ST70	No	B/15	111(5)	0.0 (no)	NA

Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins

19(i)	09/03/18 to 06/04/18	<i>E. coli</i> NDM-1	ST404	Yes	D/35	26(1)	0.0 (no)	NA
20	14/12/16 to 22/12/16	<i>E. cloacae</i> OXA-48	ST1152	No	A/400	69(3)	26.1 (high)	ST1152 (5.8%) ST104 (2.9%) ST78 (17.4%)
21	26/10/15 to 03/11/15	<i>E. cloacae</i> OXA-48	ST114	No	L/138	40(1)	0.0 (no)	NA
22	20/12/15 to 09/02/16	<i>E. cloacae</i> OXA-48	NA	No	M/220	9(1)	0.0 (no)	NA
23	23/11/16 to 07/12/16	<i>E. cloacae</i> OXA-48	ST127	No	B/15	74(3)	0.0 (no)	NA
24	13/06/17 to 18/07/17	<i>A. baumannii</i> NDM-1	ST231. newST1. newST2	Yes	D/33	131(6)	23.7 (high)	ST231 (7.6%) newST1 (14.5%) ST585 (1.5%)
25	15/02/18 to 09/03/18	<i>A. baumannii</i> NDM-1 <i>E. cloacae</i> NDM-1	<i>A. baumannii</i> newST1 <i>E. cloacae</i> ST66	Yes	D/34	119(4)	31.1 (high)	<i>A. baumannii</i> newST1 (8.4%) <i>A. baumannii</i> newST3 (3.4%) <i>E. cloacae</i> ST66 (19.3%)
26(i)	08/06/17 to 27/07/17	<i>A. baumannii</i> NDM-1 <i>K. pneumoniae</i> NDM-1 OXA-48 <i>E. cloacae</i> NDM-1 <i>E. coli</i> NDM-1	<i>A. baumannii</i> ST231. ST1089. newST1 <i>K. pneumoniae</i> ST45 <i>E. cloacae</i> ST66 <i>E. coli</i> ST69	Yes	D/34	85(5)	30.6 (high)	<i>A. baumannii</i> ST231 (3.5%) <i>A. baumannii</i> ST1089 (1.2%) <i>A. baumannii</i> newST1 (4.7%) <i>K. pneumoniae</i> ST45 (11.8%) <i>K. pneumoniae</i> ST397 (3.5%) <i>E. cloacae</i> ST66 (4.7%) <i>E. cloacae</i> ST168 (1.2%)
27	08/01/17 to 11/01/17	<i>E. cloacae</i> NDM-1 <i>E. coli</i> NDM-1	<i>E. cloacae</i> ST78 <i>E. coli</i> ST2599	No	N/3280	26(1)	26.9 (high)	<i>E. cloacae</i> ST78 (7.7%) <i>E. cloacae</i> ST133 (7.7%) <i>E. coli</i> ST2599 (11.5%)
28	27/04/18 to 06/05/18	<i>E. coli</i> OXA-48 <i>K. pneumoniae</i> NDM-5	<i>E. coli</i> ST410 <i>K. pneumoniae</i> ST15	No	H/1166	168(5)	5.4 (low)	<i>E. coli</i> ST410 (5.4%)
29	10/04/17 to 18/04/17	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48 <i>E. coli</i> NDM-1	<i>K. pneumoniae</i> ST70 <i>E. coli</i> ST58	No	E/760	28(1)	3.6 (low)	<i>K. pneumoniae</i> ST13 (3.6%)
30	22/02/17 to 15/03/17	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48 <i>E. cloacae</i> OXA-48 <i>A. baumannii</i> NDM-1	<i>K. pneumoniae</i> ST13 <i>E. cloacae</i> ST121 <i>A. baumannii</i> newST4	No	O/598	122(5)	2.5 (low)	<i>K. pneumoniae</i> ST13 (0.8%) <i>E. cloacae</i> ST121 (0.8%) <i>E. cloacae</i> ST114 (0.8%)
31(i)	29/12/16 to 23/05/17	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48 <i>E. coli</i> OXA-48	NA	No	P/1308	41(2)	0.0 (no)	NA
32	09/02/17 to 19/02/17	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48 <i>E. coli</i> OXA-48	<i>K. pneumoniae</i> ST35 <i>E. coli</i> ST10	No	Q/919	25(1)	0.0 (no)	NA

## RESULTS

### ***Variation of surface contamination in CPB-positive patients rooms***

Thirty-two CPB-positive patients (24 with rectal carriage and 8 with infection) were included in the study (Table 1). They carried 44 strains of CPB belonging to 4 different species and producing 3 types of carbapenemases: *K. pneumoniae* OXA-48 (n=15), *K. pneumoniae* NDM-1 (n=3), *K. pneumoniae* KPC (n=1), *E. coli* OXA-48 (n=8), *E. coli* NDM-1 (n=4), *E. cloacae* OXA-48 (n=5), *E. cloacae* NDM-1 (n=3) and *A. baumannii* NDM-1 (n=5). Eight patients were positive for several CPB (Table 1).

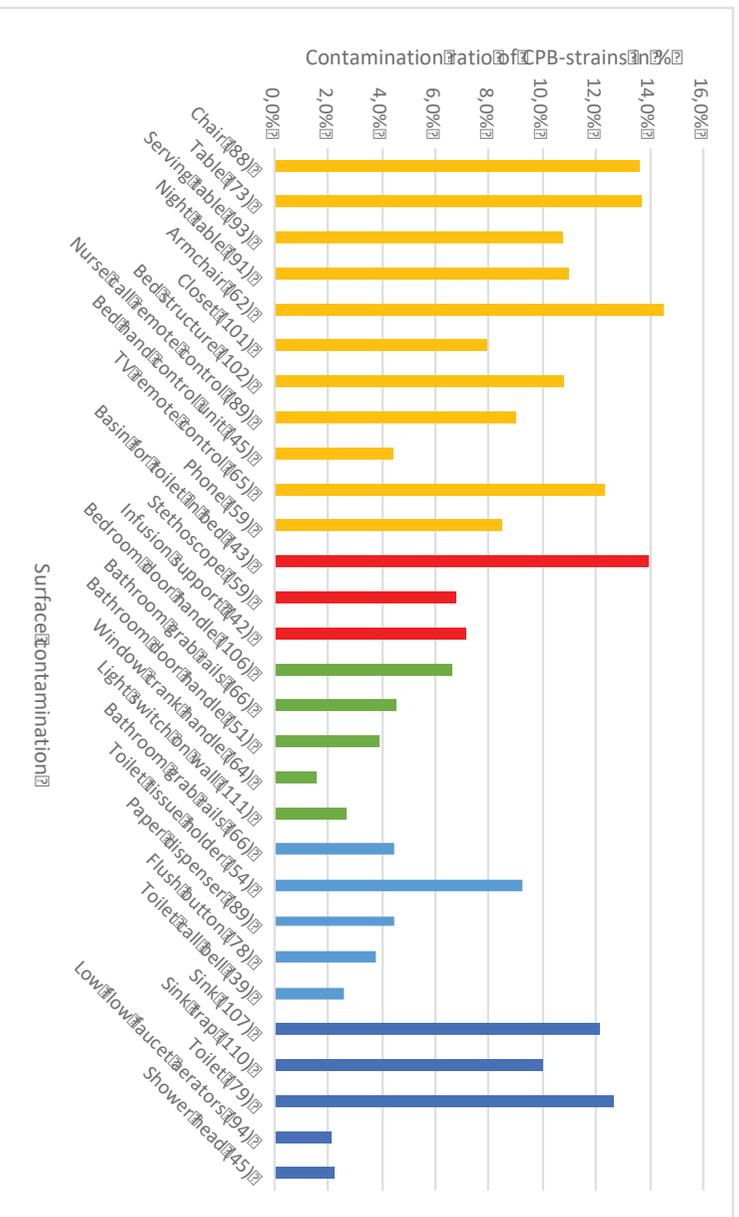
The bacterial contamination of 34 rooms accommodating the 32 CPB-positive patients was studied by intensive sampling (2677 samples during 101 campaigns) and culturing onto Gram-negative selective medium without carbapenem selection. From 9 to 259 samples were collected per room (mean=84). Regarding the strains of the 4 species isolated without carbapenem selection, mean CR% per rooms are presented in Table 1 and showed high diversity from 0.0% to 31.1%. In the same ward D (Table 1), the contamination level could be of 0.0%, 3.7% and 31.1% according to the bacteria/patient/room. The influence of healthcare workers practices were considered as limited because practices were audited and adjusted by the infection control team as soon as a CPB-positive patient was admitted in the ward. However, when several campaigns were performed for a unique room/patient and for a unique CPB, a large range of variation in CR% among campaign was observed (Supplementary Figure). This suggested that various parameters could influence CR% and justified intensive and repetitive sampling of the same patient's room.

We considered thereafter the contamination level to be linked either to patients with particular healthcare, or to bacteria. The spreader character of patients and/or the

spreading character of the patient associated bacteria were evaluated as high (mean CR% from 19,7 to 31,1%), low (mean CR% from 1,5% to 6,8%) or no (mean CR% of 0%) (Table 1).

### ***Tracking down CPB habitat in hospital rooms***

The Figure 1 detailed the number of CPB strains recovered onto the diverse sites sampled in rooms and bathrooms of CPB-positive patients. Bed and furniture close to the patient were the most contaminated sites in the room as well as items highly touch by the patient such as TV and alarm/light remote controls. Items highly-touched by healthcare workers such as mural switch and healthcare material were relatively less contaminated, confirming the global good level of healthcare workers hand hygiene during the study. In bathroom, surface and siphon of sinks, and toilets surfaces were the most contaminated. Of note, the basin classified in healthcare items in Figure 1 had a similar function than sink and could be also classified among bathroom items. Its CR% was higher than healthcare items (in red) but similar to sink (in bright blue).



**Figure 1:** Mean contamination ratio per sampling sites. In yellow, furniture and items highly touched by patients (or visitors); in red, healthcare material; in green, items highly touched on walls; in blue, bathroom items, dry or occasionally wet in light blue, wet or filled with water in dark blue.

**Tableau 2:** Mean ratios of surface contamination by CPB in rooms accommodating CPB-positive patients according to the bacterial species and, the type and the site of sampled surfaces. CPB% (blue font) corresponded to the % of CP-strains among all the strains isolated onto Gram-negative selective medium without carbapenem selection. NR for not relevant.

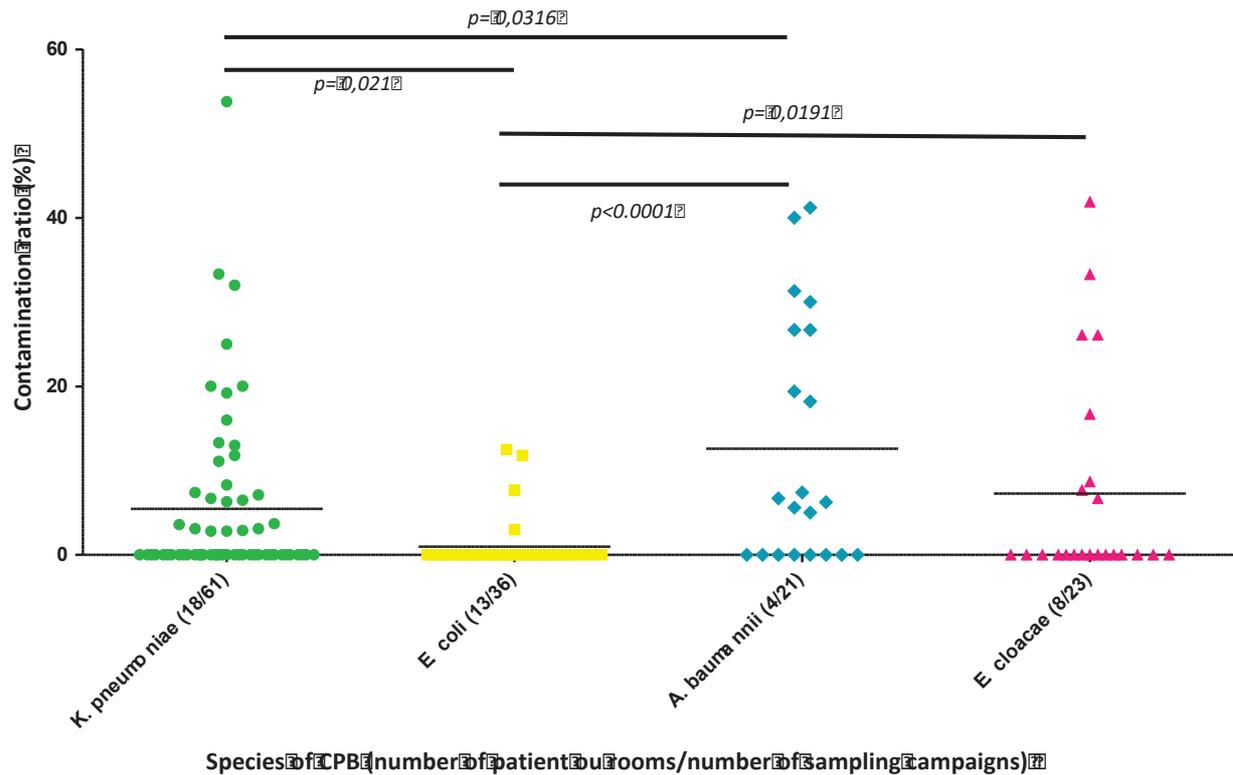
Type of surface	Sites	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>A. baumannii</i>
Room (dry surfaces)	highly-touch items (all) CPB%	3,8% (14/372) 95%	0,5% (1/218) 100%	3,7% (5/135) 71%	8,9% (9/101) 90%
	Items for care CPB%	1,8% (4/226) 67%	0% (0/76) NR	7,7% (4/52) 100%	10,3% (6/58) 100%
	Bed CPB%	7,1% (13/183) 68%	0% (0/95) NR	9,8% (6/61) 85%	14,8% (8/54) 100%
	Furniture CPB%	8,7% (27/312) 93%	0,6% (1/174) 35%	9,2% (10/109) 72%	21,1% (19/90) 100%
	All CPB%	5,3% (58/1093) 84%	0,4% (2/563) 57%	7% (25/357) 78%	13,6% (41/303) 96%
Bathroom (mostly wet surfaces)	Toilets CPB%	5,8% (7/120) 67%	4,2% (3/71) 50%	14% (6/43) 100%	3,7% (1/27) 100%
	Shower CPB%	0% (0/71) NR	6,5% (3/46) 43%	7,1% (1/14) 100%	16,7% (2/12) 100%
	Sink CPB%	7,3% (16/219) 94%	0,8% (1/131) 35%	9,3% (9/97) 100%	4,8% (5/104) 100%
	Items on wall in bathrooms CPB%	2,9% (4/137) 66%	2,5% (2/80) 100%	11,1% (4/36) 100%	16,7% (2/12) 100%
	All CPB%	4,9% (27/547) 89%	2,7% (9/328) 49%	10,5% (20/190) 100%	6,5% (10/155) 100%
Room and bathroom	All sites CPB%	5,2% (85/1640) 87%	1,2% (11/891) 50%	8,2% (45/547) 86%	11,1% (51/458) 96%

Table 2 shows the mean ratio of surfaces contamination by CPB according to the type sampling sites and species. Considering all surfaces, mean CR% varied from 1.2% to 11.1% according to species, the lower for *E. coli* and the higher for *A. baumannii*. The mean CR% varied according to dry or wet surfaces. Surfaces in rooms corresponded mostly to dry surfaces (except the basin) while most surfaces in bathrooms were considered as wet or occasionally wet. *K. pneumoniae* and *E. cloacae* contaminated equally dry surfaces while *E. coli* was detected in only 0.4% of dry surface samples and *A. baumannii* was the most frequent species isolated in rooms with a CR% of 13.6% onto dry surfaces (Table 2). *A. baumannii* was not so prevalent onto wet surfaces in bathrooms (6.5%). *E. cloacae* and *K. pneumoniae* contaminated equally dry and wet surfaces (Table 2).

***Influence of bacterial species and genotypes on the contamination of CPB-positive patients rooms***

The contamination ratios per sampling campaign were compared among species in Figure 2. *E. coli* contaminated significantly less the rooms of CPB-positive patients than the 3 other species. Conversely, *A. baumannii* presented contamination ratio higher than *E. coli* and *K. pneumoniae*. There was no significant difference between *E. cloacae* contamination ratios and *K. pneumoniae* or *A. baumannii*.

All the strains (n=226) of the 4 species were collected because the culture medium was not selective for carbapenem resistance. This strategy allowed comparing the spread of CPB versus non-CPB strains of the same species. In Table 2, CPB% corresponded to the % of CPB-strains among all the collected strains of the corresponding species. The main result was that CPB-strains dominated the environment of rooms accommodating CPB-positive patients. Again, *E. coli* behaviour differed from that of other species. Only 50% of *E. coli* strains isolated in *E. coli*-positive patient rooms were CPB-strains. By contrast, the large majority of *K. pneumoniae*, *E. cloacae* and *A. baumannii* isolated in positive patient rooms were CPB-strains. For the two latter species, most sites and particularly wet sites were contaminated by 100% of CPB-strains (Table 2).

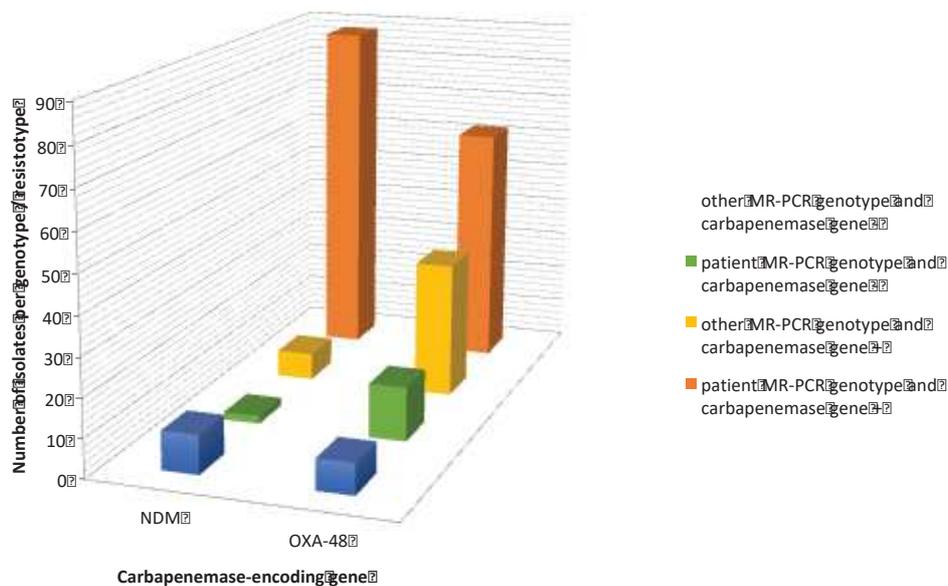


**Figure 2:** Contamination ratio according to the CPB species. Contamination ratio corresponds to the % of positive sites on the total of sampled sites. Every point in the graph corresponded to a contamination ratio from a single sampling campaign. (x/y) for number of patients or rooms / total number of sampling campaigns. Only significant differences are showed on the graph.

All the collected strains were then submitted to molecular typing in order to determine the presence and type of carbapenemase-encoding genes and, to identify and compare the genotypes circulating into a room by MR-PCR. The Figure 3 combining MR-PCR genotypes and resistotypes shows the genetic diversity among strains isolated in CPB-positive patient rooms. Only *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>NDM</sub> were detected in environmental strains. *Bla*<sub>KPC</sub> infecting the patient 12 was not detected in his room. The majority of NDM- (88%) and OXA-48-producing strains (62%) in rooms presented the MR-PCR genotype of the patients' strains (orange bars in Figure 3) but for some environmental strains with patient genotype, the carbapenemase-producing gene was not detected (green bars in Figure 3). Particularly, 14% of isolates from

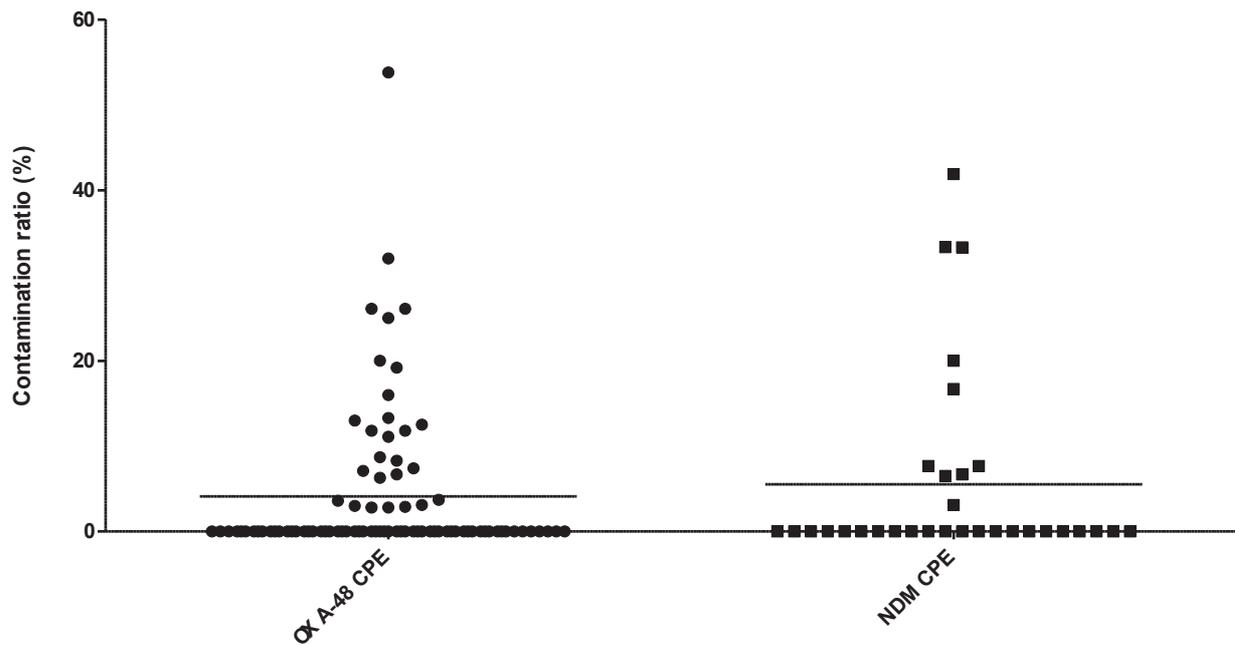
rooms of OXA-48-CPB positive patients presented the patient MR-PCR genotype but the OXA-48 gene was absent. This was observed for only 2% of the strains from NDM-CPB rooms and suggested the relative instability of OXA-48 gene in environment.

Unexpectedly, several NDM- and OXA-48-producing environmental strains presented another genotype than that of the patient occupying the room (yellow bars in Figure 3). This was particularly the case for 35% of the OXA-48-CPB detected in rooms, suggesting a higher diversity in the environmental population of OXA-48-CPB than detected in patient samples (Figure 3). Finally, the CPB population detected in rooms of OXA-48-positive patients appeared more diversified, at both MR-PCR genotype and resistotype levels, than CPB population contaminating rooms of NDM-positive patients.



**Figure 3:** Number of isolates per genotype / resistotype in NDM and OXA-48 carriers rooms. Genotype / resistotype combines MR-PCR genotype (patient or other) and carbapenemase-encoding gene (presence or absence).

Comparison of CR% per sampling campaign according to the carbapenemase gene among enterobacteria showed no significant differences between NDM-CP-enterobacteria and OXA-48-CP-enterobacteria (Figure 4). The type of resistance gene carried by enterobacteria did not influence CR% in rooms accommodating CPB carriers.

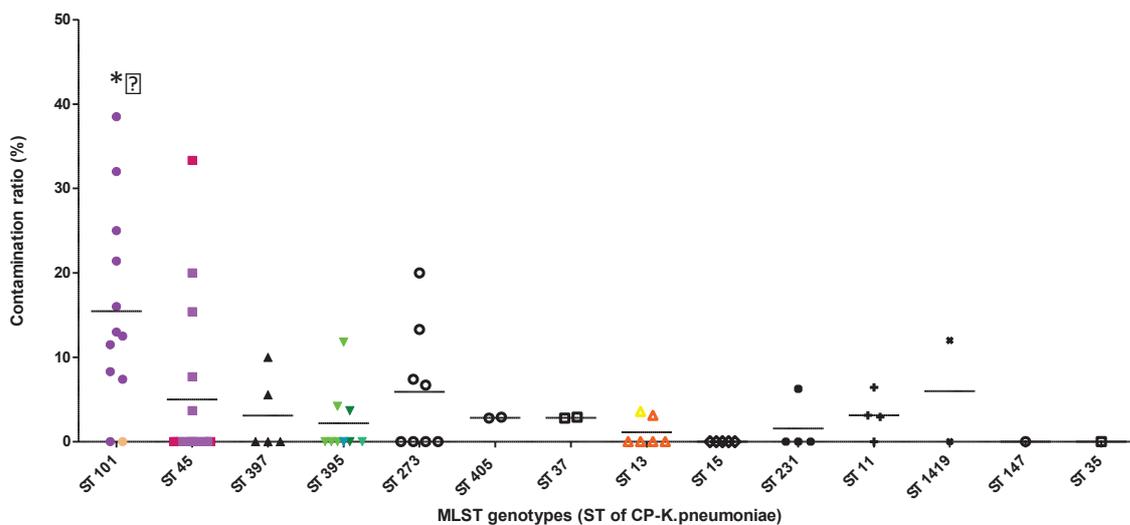


**Figure 4:** Contamination ratio per sampling campaign according to the gene encoding carbapenemase and among enterobacteria (*E. coli*, *K. pneumoniae* and *E. cloacae*). Contamination ratio corresponded to the % of positive sites on the total of sampled sites. Every contamination ratio (point in the graph) corresponded to a single sampling campaign. CPE for carbapenemase-producing enterobacteria.

Owing to the high diversity in MR-PCR of the CPB isolated in patient's rooms, MLST typing was performed and results are presented in Table 1. Yet non-described MLST genotypes were detected for *E. coli* and *A. baumannii* and temporary named "newST". For all species, additional STs not detected in patients were found in their rooms (5 additional STs for *K. pneumoniae*, 3 for *E. coli*; 4 for *E. cloacae*; 2 for *A. baumannii*) (Table 1). For instance, 3 STs of *E. coli* (ST10, ST1011 et ST2766) were found in the room of the patient 13 for which only

the ST10 was detected. CP-*A. baumannii* positive patients were colonized or infected by diverse STs also detected in their rooms.

The influence of ST on CR% was tested among *K. pneumoniae* STs for which the number of strains allowed statistic tests (Figure 5). The CP-*K. pneumoniae* from 18 carriers and their rooms belonged to 14 STs, indicating a high genetic diversity CP-*K. pneumoniae* in the hospital (Figure 5). The ST101, ST45, ST395 and ST13 were detected in two rooms/patients each. The Figure 5 showed that ST101 contaminated significantly more surfaces than other STs suggesting that CPB spreading in CPB-positive patient rooms could depend of sub-population within a species.



**Figure 5:** Contamination ratio according to the MLST genotype (ST) of CP-*K. pneumoniae*. Contamination ratio corresponds to the % of positive sites on the total of sampled sites. Every contamination ratio (point in the graph) corresponds to a single sampling campaign. Graphs with black points when a ST corresponded to single a room/patient. Graphs with coloured points when the same ST was found in several rooms/patients. \* Contamination ratio of ST101 significantly higher than all other STs ( $p$  from 0,0049 to 0.0448), except ST273 ( $p=0.605$ ) and ST1419, ST147, ST35 because too low number of strains.

***Influence of patients' characteristics and epidemiology on CPB spreading in CPB-positive patients rooms***

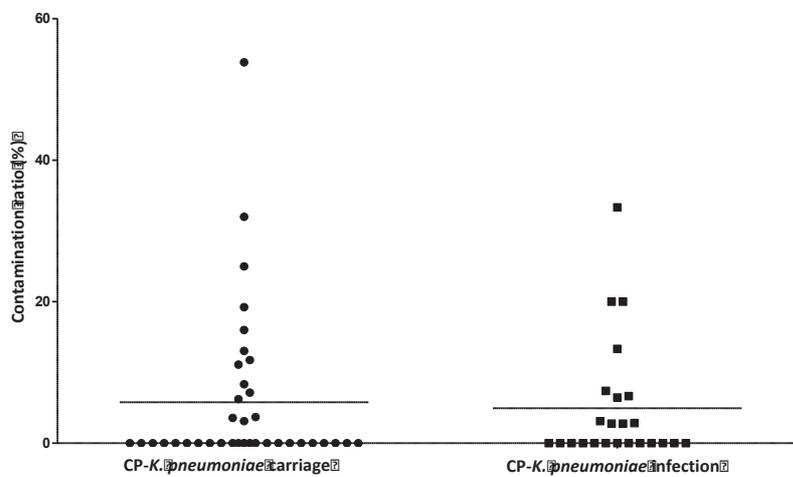
The classification of patients as “high spreader”, “low spreader” or “non spreader” (Table 1) depended only on the observed contamination ratios in their rooms. The load of CPB in patients' microbiota samples was not evaluated in this study.

The Table 1 showed that the spreading character of the CPB species carried by a patient did not explain by itself the spreader character of this patient. For instance, the “high spreader” patients mostly carried *E. cloacae* and *A. baumannii*, but *E. cloacae* was also found in “non-spreader” patients (Table 1).

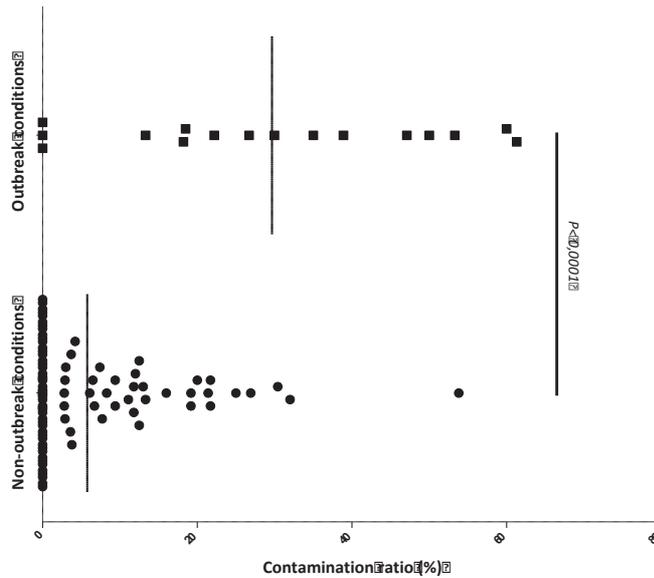
The eight patients (patients 25 to 32) who carried multiple CPB gave the opportunity to compare the contamination ratio of every CPB for a single patient, which permitted to evaluate the CPB-species spreading regardless of the spreader characteristic of the patient, except the carriage inoculum of each species not available in this study (Table 1). Again, the mean CR% described above for every species was not predictive of the spreading level of these species from a single patient. It was noteworthy that, for a given species, a single patient could carry various MLST genotypes (ST) of CPB that spread differently in the room environment (Table 1). Finally, the spreading of CPB around a patient was hardly predicted by the mean contamination ratio observed for each species.

For further statistical analysis of the influence of patients' characteristics onto CPB spreading, only the 21 patients/rooms for which at least 40 samples had been collected, were considered (Table 1). The comparison of the 3 groups of patients and particularly the “high-spreaders” or the “non spreaders” to others did not show significant links between the spread of CPB in the room and the patients' characteristics (data not shown).

The number of rooms accommodating CP-K. *pneumoniae* positive patients allowed to directly compare the impact of colonization or infection status (Figure 5). No significant difference was observed ( $p= 0,7974$ ). Conversely, the epidemiological conditions in the ward influenced the surface contamination ratio, which was significantly higher in outbreak context ( $p<0.0001$ ) (Figure 6).



**Figure 5:** Contamination ratio according to the clinical relationships between CP-K. *pneumoniae* and the host (carriage or infection). Contamination ratio corresponded to the % of positive sites on the total of sampled sites. Every contamination ratio (point in the graph) corresponded to a single sampling campaign. (x/y) for number of different patients or rooms / number of sampling campaigns.



**Figure 6:** Contamination ratio of CP-*K. pneumoniae* and according to the epidemiological conditions in the ward: outbreak conditions (transmission of the same CP-*K. pneumoniae* between two or more patients) or not. Contamination ratio corresponded to the % of positive sites on the total of sampled sites. Every contamination ratio (point in the graph) corresponded to a single sampling campaign.

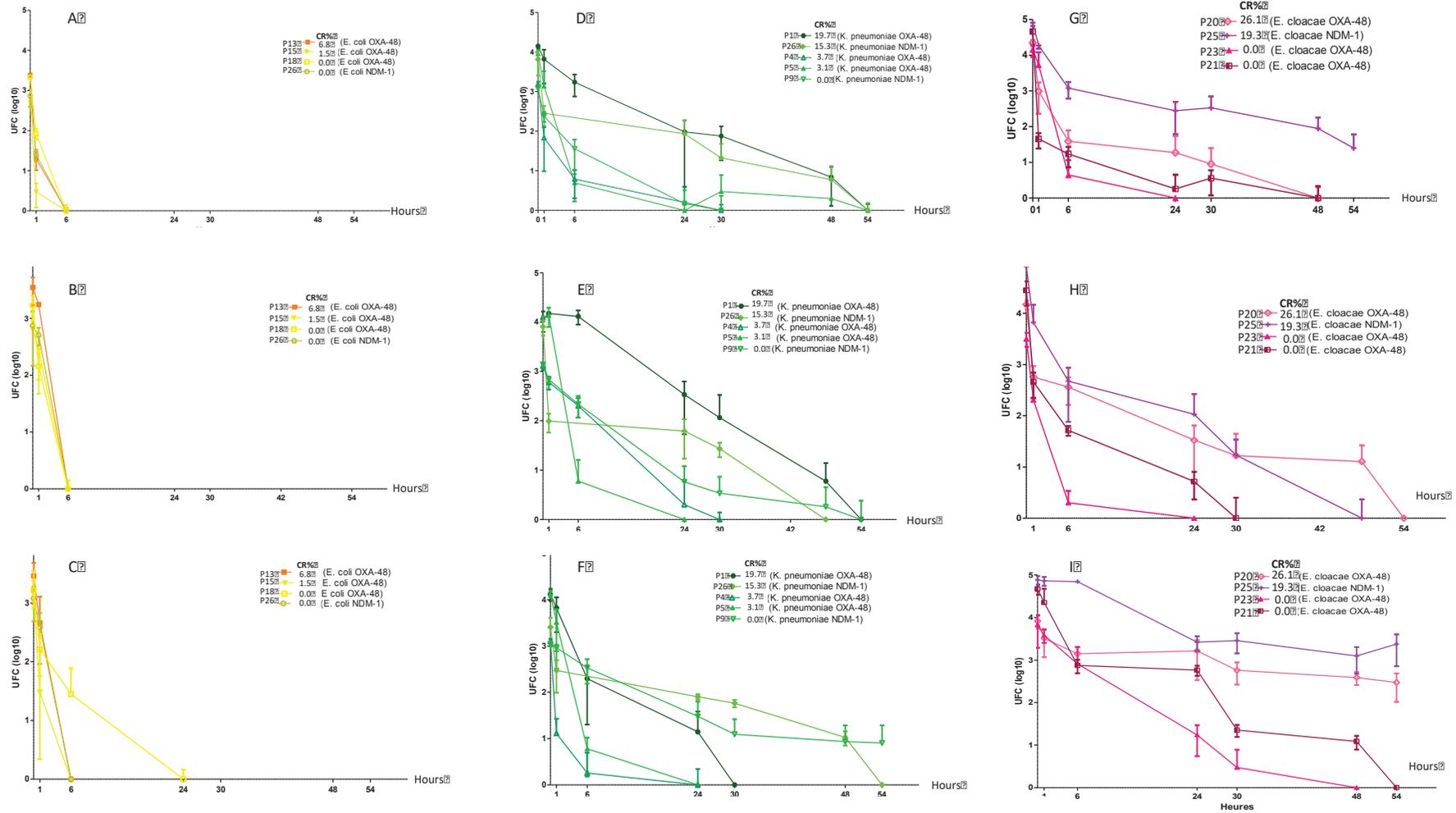
### ***CP-enterobacteria survival onto dry surfaces in experimental conditions***

The survival of natural isolates of CP-enterobacteria (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*) was tested onto 3 materials used in hospital rooms and for cares: stainless steel, latex and nitrile. Four to five strains were selected per species according to various behaviours onto rooms surfaces. The survival curves presented in Figure 6 showed various profiles according to species and strains. *E. coli* survived no more than 6 hours except one strain from the room of patient 18 onto stainless steel (Figures 6A, 6B, 6C). In contrast, *K. pneumoniae* and *E. cloacae* that presented higher contaminations ratios than *E. coli* survived from 24 h to more than 54 h (Figures 6F, 6G and 6I) in experimental conditions. For *E. cloacae*, the two strains showing higher contaminations ratios (patient 20 and patient 25) survived significantly longer in experimental conditions than the two strains presenting contaminations ratios at 0%

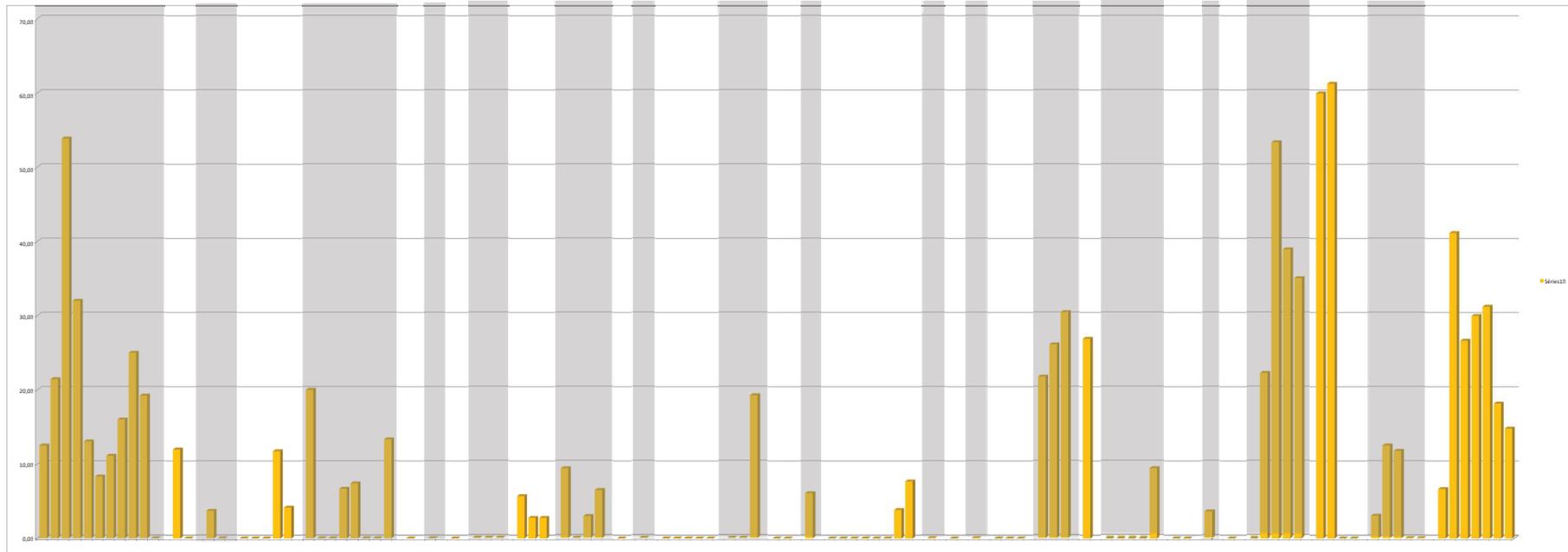
(patient 21 and patient 23). The two CP-*K. pneumoniae* presenting the higher contaminations ratios in rooms showed both long survival of 54 h onto latex and nitrile (patient 1 and patient 26) but only one onto stainless steel during 48 h (patient 26). The survival of CP-*K. pneumoniae* strains onto stainless steel was poorly correlated with their contamination ratios in real conditions. Moreover, for the strains tested, in real conditions, *K. pneumoniae* strains and *E. cloacae* strains contaminated dry surfaces and *E. coli* strains didn't contaminated dry surfaces (data not show). This observation was concurred with experimental tests.

Finally, the survival onto experimental surfaces roughly linked to the contamination ratios observed in real conditions in CPB-positive patients rooms mainly for CP-*E. coli* and CP-*E. cloacae*.

Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins



**Figure 6:** Persistence in hours of CP-*E. coli* (A, B, C), CP-*K. pneumoniae* (D, E, F) and CP-*E. cloacae* (G, H, I) onto nitrile (A, D, G), latex (B, E, H) and stainless steel (C, F, I). Strains corresponding to patient (P); CR% for contamination ratio; species and carbapenemase-encoding gene in parenthesis;



**Supplementary Figure:** Contamination ratio per sampling campaign. Each bar corresponded to a single sampling campaign. Sampling campaigns in the same patient room are gathered by grey and white background.

## DISCUSSION

The fight against the antimicrobial resistance is today a global priority that includes the fight against HAI because most new resistances emerge in hospital or healthcare settings and then diffuse in the community (WHO, 2017). HAI control is mainly based onto barrier measures that avoid or limit the exposure of patient to pathogens. The universal and ultimate barrier measure is healthcare workers hand hygiene just before contact with patients (Vermeil et *al.*, 2019) but it's now admitted that multi-component infection control measures often named "bundle of measures" with emphasis onto universal precautions, particularly hand hygiene, wearing of gloves, excreta elimination, patient isolation, use of dedicated medical devices, etc. (French et *al.*, 2017) (Lepelletier et *al.*, 2015).

Quality and frequency of environmental cleaning and disinfection in order to eliminate pathogens, or at least to decrease their inoculum, belongs to HAI control measures. Cleaning environment is generally presented as secondary behind hand hygiene and care practices. For instance, in the review presenting the French recommandation for the prevention of emerging extensively drug-resistant bacteria, only one occurrence of "environment" appears in the text (Lepelletier et *al.*, 2015). Together, evidences that contaminated surfaces contribute to the transmission of HAI are growing (Weber et *al.*, 2013) (Otter et *al.*, 2013). Several very recent studies (Nseir et *al.*, 2011) (Blixt et *al.*, 2017), one large case-control study (Cohen et *al.*, 2018) and one recent meta-analysis (Wu et *al.*, 2019) showed the association between infected/colonized roommates or prior room occupants and HAI acquisition.

In most recommendations for fight against HAI, there is a requirement for clinical environment to be safe but no more precisions are given. Particularly, the role of surface sampling for microbiological analysis of hospital environment is minimized and weakly recommended only in outbreak settings. In most cases, visual audit is recommended for assessing hospital cleaning (National Patient Safety Agency, 2019). The consequence is a general lack of data and literature about hospital microbial ecology that creates a black box impairing the understanding of HAI transmission. With the global emergence of CPB, the role of environment in their diffusion is more and more underlined and deciphering the content of hospital environment black box becomes an emergency in order to limit the diffusion of life-threatening antimicrobial resistances. Owing to the progress of microbial ecology and the availability of efficient tools for bacterial identification such as MALDI-TOF, there are today no true limitations for environmental investigation in hospital settings. In this context, this study propose intensive sampling around patients in their rooms in order to cartography CPB habitats and, to characterize and compare clinical and environmental populations circulating in a hospital unit when a CPB-carrier is hospitalized.

Concerning reservoirs, the main result was that once a CPB-carrier is accommodated in a room, the room became a habitat for CPB and thereby a potential source of transmission. Samples culture was first performed onto non-selective medium in order to recover all enterobacteria and then to detect CP-enterobacteria. This original strategy gives us data, which are, to our knowledge, non available in previous publications: the part of CPB among enterobacteria contaminating a room occupied by a CPB-positive patient. We detected a very high rate of CPB from 50% to 100% according to the species. These results underline the

frequency of CPB-contaminated sites in CPB-positive patients' rooms and thereby the associate risk of transmission from environment to other patients via healthcare workers. In addition, the ratios of contaminated surfaces (CR%) in a CPB-carrier room could be considered as another indicator for a risk of spread in the ward and then for a risk of outbreak. First, the CR% varied according to CPB species. CP-A. *baumannii* and CP-E. *cloacae* persisted and spread significantly more than CP-E. *coli*. This result confirmed previous data obtained on non-CPB strains. Indeed, *A. baumannii* is well known to be challenging to control because it survives in the hospital environment for prolonged periods of time (Jawad et al., 1998). This persistence has been linked to the propensity of the bacteria to cause sustained outbreaks in hospital (Jawad et al., 1998). *A. baumannii* presented some intrinsic traits that favour persistence onto dry surfaces such as biofilm formation (Greene et al., 2016) and *in vitro* survival under nutrient-deprived conditions independently from a viable but non-cultivate state (Bravo et al., 2016). Of note, the virulence of *A. baumannii* is maintained after long-time starvation (Chapartegui-Gonzalez et al., 2018). Green et al. (2016) showed the influence of the level of biofilm formation and MDR traits according to strains on the resistance to desiccation *in vitro*. In this study, we observed a general but not systematic high persistence and spread of *A. baumannii* in environment and the resistance by carbapenemase production was maintained in environment. The spread could depend on the genotype of the strain, as observed when several genotypes were carried by the same patient. It would be informative to compare the various genotypes for their ability to form biofilm and to resist to desiccation onto inert surfaces. The latter property has been studied only for enterobacteria in this study.

Concerning *E. coli*, this bacterium is well known as indicator of faecal contamination in environment due to its ability to persist out of human or animal guts, particularly in water. The emergence and global spreading of some sub-population such as extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producers of the genotype ST131 suggested a potential environmental reservoir. However, publications focused onto this issue failed to discover such reservoir and concluded that the environment is probably not the main route of diffusion of ESBL-producing *E. coli*, even during a hospital outbreak (Gbaguidi-Haore et al., 2013) (Guet-Revillet et al., 2012). The low persistence of *E. coli* virulent strains from human origin in environment has been also described in natural waters (Petit et al., 2017). Herein, we show the low spread of CP-*E. coli* in hospital rooms as well as its low persistence onto dry artificial surfaces, suggesting that *E. coli* is a weakly persisting and spreading species whatever its resistance phenotype.

Conversely, *K. pneumoniae* is increasingly described as a highly persisting in environment and as a potential shuttle of resistance genes between environment and patients (Wyre et al., 2018). It is also the case for CP- *K. pneumoniae* (Mills et al., 2019) (Clarivet et al., 2016). Moreover, the contamination of the hospital environment near patients carrying ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* was respectively of 4% and 19% of environment samples (Gbaguidi-Haore et al., 2013) (Guet-Revillet et al., 2012). We confirmed herein the persistence and spread of CP- *K. pneumoniae* in room environment, mainly in wet sites, but we observed a wide variability of behaviour in rooms and *in vitro* according the strain.

Despite their description in hospital environment and the potential involvement of environment in HAI outbreaks (Wendel et al., 2016), the persistence of *E. cloacae* in hospital

or natural environment is less described. In this study, the CR% representing the persistence and spread of *E. cloacae* in the room of a positive-carrier is significantly higher than that of *E. coli* and similar to that of *K. pneumoniae*. Moreover, *in vitro* persistence on dry surfaces was high, confirming previous publication (Weber et al., 2016).

Beside microbiological trait, the spread and the contamination of CPB in environment can be correlated with clinical characteristics of patients. For example, in the study of Lerner et al. 2015, authors analysed clinical characteristics of patients carrying KPC *K. pneumoniae*. Super-spreaders patients had a high-concentration of CPB in their rectal microbiota ( $p=0,049$ ) or had been admitted with respiratory disease ( $p=0,005$ ) or had co-morbidity like dementia ( $p=0,01$ ) or cardiovascular disease ( $p=0,07$ ). In our study, we didn't identify clinical characteristics correlate with super-spreaders patients but CPB concentrations in patients' microbiota would have been interesting to analyse.

This study describes the habitat and transient reservoir of CPB in hospital rooms accommodating CPB-positive patients. Data suggested the role of hospital environment as relay for transmission of CPB. The significantly higher contamination ratio in CPB-positive patients rooms when a care unit encounters outbreak confirms the role of environment as reservoir for transmission. Applying the same strategy of intensive environmental sampling focused on an outbreak could provide additional arguments about the role of hospital environment in CPB transmission dynamics.

## REFERENCES

- Almakki A, Maure A, Pantel A, Romano-Bertrand S, Masnou A, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Licznar-Fajardo P. NDM-5-producing *Escherichia coli* in an urban river in Montpellier, France. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Jul;50(1):123-124.
- Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep;43(9):4382-90. Erratum in: *J Clin Microbiol*. 2007 Jun;45(6):2101.
- Blixt T., K.O. Gradel, C. Homann, J.B. Seidelin, K. Schønning, A. Lester et al. Asymptomatic carriers contribute to nosocomial *Clostridium difficile* infection: a cohort study of 4508 patients. *Gastroenterology*, 152 (2017)1031-41.e2
- Bravo Z, Orruño M, Parada C, Kaberdin VR, Barcina I, Arana I. The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606(T) under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. *Arch Microbiol*. 2016 Jul;198(5):399-407.
- Cahill N, O'Connor L, Mahon B, Varley Á, McGrath E, Ryan P, Cormican M, Brehony C, Jolley KA, Maiden MC, Brisse S, Morris D. Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing Enterobacterales? *Sci Total Environ*. 2019 Jul 1;672:618-624.
- Carling PC. 2018. Wastewater drains: epidemiology and interventions in 23 carbapenem-resistant organism outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol* 39:972–979.
- Chapartegui-González I, Lázaro-Díez M, Bravo Z, Navas J, Icardo JM, Ramos-Vivas J. *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. *PLoS One*. 2018 Aug 22;13(8):e0201961.
- Clarivet B, Grau D, Jumas-Bilak E, Jean-Pierre H, Pantel A, Parer S, Lotthé A. Persisting transmission of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* due to an environmental reservoir in a university hospital, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill*. 2016 Apr 28;21(17).
- Cohen B., J. Liu, A.R. Cohen and E. Larson. Association between healthcare-associated infection and exposure to hospital roommates and previous bed occupants with the same organism. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 39 (2018), pp. 541-546
- Drancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P. A. D., Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates *J Clin Microbiol*. 2005 Aug; 43(8): 4178–4182.

- Decraene V, Phan HTT, George R, Wyllie DH, Akinremi O, Aiken Z, Cleary P, Dodgson A, Pankhurst L, Crook DW, Lenney C, Walker AS, Woodford N, Sebra R, Fath-Ordoubadi F, Mathers AJ, Seale AC, Guiver M, McEwan A, Watts V, Welfare W, Stoesser N, Cawthorne J; TRACE Investigators' Group. A Large, Refractory Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* demonstrates carbapenemase gene outbreaks Involving Sink Sites Require Novel Approaches to Infection Control. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Nov 26;62(12).
- Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep;20(9):831-8.
- Fernando SA, Phan T, Parker C, Cai T, Gottlieb T. Increased detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* on post-clean sampling of a burns unit's wet surfaces. *J Hosp Infect*. 2019 Feb;101(2):179-182.
- French CE, Coope C, Conway L, Higgins JP, McCulloch J, Okoli G, Patel BC, Oliver I. Control of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* outbreaks in acute settings: an evidence review. *J Hosp Infect*. 2017 Jan;95(1):3-45.
- Gbaguidi-Haore H, Talon D, Hocquet D, Bertrand X. Hospital environmental contamination with *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Am J Infect Control*. 2013 Jul;41(7):664-5.
- Greene C, Vadlamudi G, Newton D, Foxman B, Xi C. The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Am J Infect Control*. 2016 May 1;44(5):e65-71.
- Guet-Revillet H, Le Monnier A, Breton N, Descamps P, Lecuyer H, Alaabouche I, Bureau C, Nassif X, Zahar JR. Environmental contamination with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: is there any difference between *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp? *Am J Infect Control*. 2012 Nov;40(9):845-8.
- Khan FA, Hellmark B, Ehricht R, Söderquist B, Jass J. Related carbapenemase-producing *Klebsiella* isolates detected in both a hospital and associated aquatic environment in Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Dec;37(12):2241-2251.
- Kizny Gordon AE, Mathers AJ, Cheong EY, Gottlieb T, Kotay S, Walker AS, Peto TEA, Crook DW, Stoesser N. 2017. The hospital water environment as a reservoir for carbapenem-resistant organisms causing hospital acquired infections: a systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 64:1435–1444.

- Kotsanas D, Wijesooriya WR, Korman TM, Gillespie EE, Wright L, Snook K, Williams N, Bell JM, Li HY, Stuart RL. 2013. "Down the drain": carbapenem-resistant bacteria in intensive care unit patients and handwashing sinks. *Med J Aust* 198:267–269.
- Laurens C, Jean-Pierre H, Licznar-Fajardo P, Hantova S, Godreuil S, Martinez O, Jumas-Bilak E. Transmission of IMI-2 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from river water to human. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018 Dec;15:88-92.
- Leitner E, Zarfel G, Luxner J, Herzog K, Pekard-Amenitsch S, Hoenigl M, Valentin T, Feierl G, Grisold AJ, Hogenauer C, Sill H, Krause R, Zollner-Schwetz I. 2015. Contaminated handwashing sinks as the source of a clonal outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* on a hematology ward. *Antimicrob Agents Chemother* 59:714 –716.
- Lepelletier D, Berthelot P, Lucet JC, Fournier S, Jarlier V, Grandbastien B; National Working Group. French recommendations for the prevention of 'emerging extensively drug-resistant bacteria' (eXDR) cross-transmission. *J Hosp Infect*. 2015 Jul;90(3):186-95.
- Mahon BM, Brehony C, Cahill N, McGrath E, O'Connor L, Varley A, Cormican M, Ryan S, Hickey P, Keane S, Mulligan M, Ruane B, Jolley KA, Maiden MC, Brisse S, Morris D. Detection of OXA-48-like-producing Enterobacterales in Irish recreational water. *Sci Total Environ*. 2019 Nov 10;690:1-6.
- Mairi A, Pantel A, Ousalem F, Sotto A, Touati A, Lavigne JP. OXA-48-producing Enterobacterales in different ecological niches in Algeria: clonal expansion, plasmid characteristics and virulence traits. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Jul 1;74(7):1848-1855.
- Mills MC, Lee J. The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environ Pollut*. 2019 Sep 9;255(Pt 1):113143.
- Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One*. 2013 Jun 11;8(6):e66358.
- Nseir S., C. Blazejewski, R. Lubret, F. Wallet, R. Courcol and A. Durocher. Risk of acquiring multidrug-resistant Gram-negative bacilli from prior room occupants in the intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*, 17 (2011), pp. 1201-1208.
- National Patient Safety Agency. The national specifications for cleanliness in the NHS: a framework for setting and measuring performance outcomes. London: NPSA; 2007. [https://www.rdehospital.nhs.uk/docs/patients/services/housekeeping\\_services/2007%20National%20Spec%20for%20cleanliness%20in%20the%20NHS.pdf](https://www.rdehospital.nhs.uk/docs/patients/services/housekeeping_services/2007%20National%20Spec%20for%20cleanliness%20in%20the%20NHS.pdf)
- Otter J.A., S. Yezli, J.A. Salkeld and G.L. French. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control*, 41 (2013), pp. S1-S11

- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 May;70(1):119-23.
- Sheu CC, Chang YT, Lin SY, Chen YH, Hsueh PR. Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Update on Therapeutic Options. *Front Microbiol*. 2019 Jan 30;10:80.
- Vergara-López S, Domínguez MC, Conejo MC, Pascual Á, Rodríguez-Baño J. 2013. Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*. *Clin Microbiol Infect* 19:E490 –E498.
- Vermeil T, Peters A, Kilpatrick C, Pires D, Allegranzi B, Pittet D. Hand hygiene in hospitals: anatomy of a revolution. *J Hosp Infect*. 2019 Apr;101(4):383-392.
- Weber D.J, D. Anderson and W.A. Rutala. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr Opin Infect Dis*, 26 (2013), pp. 338-344
- Weber DJ, Rutala WA, Kanamori H, Gergen MF, Sickbert-Bennett EE. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: frequency of hospital room contamination and survival on various inoculated surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015 May;36(5):590-3.
- Weingarten RA, Johnson RC, Conlan S, Ramsburg AM, Dekker JP, Lau AF, Khil P, Odom RT, Deming C, Park M, Thomas PJ; NISC Comparative Sequencing Program, Henderson DK, Palmore TN, Segre JA, Frank KM. Genomic Analysis of Hospital Plumbing Reveals Diverse Reservoir of Bacterial Plasmids Conferring Carbapenem Resistance. *MBio*. 2018 Feb 6;9(1).
- Wendel AF, Ressina S, Kolbe-Busch S, Pfeffer K, MacKenzie CR. Species Diversity of Environmental GIM-1-Producing Bacteria Collected during a Long-Term Outbreak. *Appl Environ Microbiol*. 2016 May 31;82(12):3605-3610.
- WHO. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities. 2017 <https://www.who.int/infection-prevention/publications/guidelines-cre/en/> 2017.
- Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*. 2017 Feb 28; 543(7643):15.
- Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol*. 2006 Jun;60(5):1136-51.
- Wu YL, Yang XY, Ding XX, Li RJ, Pan MS, Zhao X, Hu XQ, Zhang JJ, Yang LQ. Exposure to infected/colonized roommates and prior room occupants increases the risks of healthcare-associated infections with the same organism. *J Hosp Infect*. 2019 Feb;101(2):231-239.

Zurfluh K, Bagutti C, Brodmann P, Alt M, Schulze J, Fanning S, Stephan R, Nüesch-Inderbinen M. Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16s rRNA methylase-producing Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Sep;50(3):436-440. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.04.017.

### III) Diffusion et transmission croisée des populations de BPC lors de situations épidémiques

Dans cette partie, nous évaluerons l'impact de l'étude de la diversité génétique des BPC dans la description des cas de transmissions croisées. Dans un premier temps, nous présenterons un article qui démontre l'intérêt d'étudier la diversité des BPC chez les patients à travers deux exemples simples de transmissions croisées entre deux patients. Puis nous présenterons, sous forme d'un autre article, le travail réalisé pendant une épidémie complexe impliquant 4 espèces de BPC et 6 patients, et démontrant l'intérêt d'étudier la diversité des BPC chez les patients et dans l'environnement hospitalier afin de mieux comprendre la circulation de BPC lors d'une épidémie.

#### A) Considérer la diversité des BPC cliniques afin de mieux détecter les évènements de transmissions croisées

L'article 4 décrit deux exemples simples de transmissions croisées entre deux patients infectés/colonisés par *K. pneumoniae* OXA-48 ou *A. baumannii* NDM-1. L'objectif de cet article est de démontrer l'impact de l'échantillonnage des souches cliniques sur les résultats du typage moléculaire réalisé lors d'épidémie nosocomiale. En effet, en pratique, quelle que soit la méthode de typage, une colonie par échantillon et par patient est étudiée, puis comparée. A travers cet article, est démontré l'intérêt de l'analyse de plusieurs souches par échantillon et/ou de plusieurs prélèvements par patient, et donc l'intérêt de considérer la diversité des BPC dans la résolution d'épidémies nosocomiales.

#### **Article 4 : Tracking carbapenemase-producing bacteria by molecular typing: Population diversity and sampling pitfall.**

**Baranovsky S. , Romano-Bertrand S. , Dumont Y. , Masnou A. , Hammer F. , Godreuil S. , Parer S. , Jumas-Bilak E.**

**Infection, Genetics and Evolution. 2018 Nov ;65 :104-106.**



## Short communication

## Tracking carbapenemase-producing bacteria by molecular typing: Population diversity and sampling pitfall



Sophie Baranovsky<sup>a</sup>, Sara Romano-Bertrand<sup>a</sup>, Yann Dumont<sup>b</sup>, Agnès Masnou<sup>a</sup>,  
 Florence Hammer<sup>a</sup>, Sylvain Godreuil<sup>b</sup>, Sylvie Parer<sup>a</sup>, Estelle Jumas-Bilak<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>HydroSciences Montpellier, IRD, CNRS, Univ Montpellier, Département d'Hygiène Hospitalière, CHU de Montpellier, Montpellier, France

<sup>b</sup>MIVEGEC, IRD, Univ Montpellier, Département de Bactériologie, Virologie, CHU de Montpellier, Montpellier, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Klebsiella pneumoniae*  
*Acinetobacter baumannii*  
 NDM-producing carbapenemase  
 OXA48-producing carbapenemase  
 Within-host diversity  
 Population typing

## ABSTRACT

While typing methods are increasingly refined, the sampling of bacteria to be typed in healthcare-associated infection context retains less attention. Through 2 emblematic cases of in-hospital transmission of extensively drug-resistant bacteria producing carbapenemases, we demonstrate the impact of colony sampling in typing results. Because of intra-population diversity, typing several colonies of same species and resistotype was needed to fully track the transmission among patients. Bacterial population studies could better decipher transmission routes of healthcare-associated bacteria, thereby improving outbreak control.

Since about 30 years, molecular typing methods are used in epidemiology for distinguishing or gathering strains within bacterial species causing infectious diseases (Sabat et al., 2013). According to their ability to detect slow or fast evolution events, they can identify and track worldwide or localized epidemics, mainly outbreaks of healthcare-associated infections (HAIs). While typing methods are increasingly performing thanks to genomic technologies (Barrangou and Dudley, 2016)(Martin et al., 2017), the sampling of strains to-be typed retains less attention. Isolating one colony per species and per sample onto a Petri dish is usually the rule in medical microbiology for identification and sub-species typing in infection control (IC) context. For antimicrobial resistance testing it is recommended to test a mix of few colonies (Islam et al., 2008) to avoid selecting an atypical variant. These approaches mask the presence of intra-species or intra-clonal variants in a sample, a well-known phenomenon especially described during the course of long-term colonisations or infections (Markussen et al., 2014) (Dupont et al., 2016) (Trauner et al., 2017). Within-host diversification was also described during nasal carriage of *Staphylococcus aureus* (Stanczak-Mrozek et al., 2015) with potential consequences on HAIs diagnosis and surveillance. Horizontal gene transfer within and between species can also confuse the issue (Sheppard et al., 2016). The aim of this report is to demonstrate the impact of colony sampling on typing results in the context of healthcare-associated transmission of carbapenemase producing bacteria (CPB).

Two patients, A and B, admitted in two different medicine units

(ward 1 and ward 2) were screened for CPB (D1 after admission) because of their previous hospitalisation in foreign countries, an associated risk factors for CPB carriage. CPB patient's carriage was search by rectal swabbing. Bacteria growing onto selective media (chromID CARBA SMART, bioMérieux, France) were identified by Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and *mpoB* sequencing for *Acinetobacter* sp. Colonial morphotypes corresponded to bacterial colonies of the same species that displayed visually slight differences in color, size or consistency. The resistance profile was performed and interpreted according to the recommendations of the Antibiogram Committee of the French Microbiology Society (CA-SFM). Carbapenemase genes were determined by Xpert Carba-R assay (Cepheid) and, by in-house PCR and sequencing (Almakki et al., 2017).

Two colonial morphotypes of OXA48-carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (OXA48-CPKp) and NDM1-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* (NDM1-CPAb) were detected in the first rectal swab for the patients A and B, respectively (Fig. 1). IC protocols recommend screening for patients hospitalized in contact (same room or same healthcare workers) with a patient carrying CPB. Despite IC measures such as contact precautions, secondary cases occurred among contact patients.

For the patients A in ward 1, two colonial morphotypes of OXA48-carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (OXA48-CPKp) were detected in the first rectal swab (Fig. 1) and 1 additional colony of OXA48-CPKp was isolated in a second rectal swab at D6. OXA48-CPKp

\* Corresponding author at: Hydrosciences Montpellier, UMR 5569, Équipe Pathogènes Hydriques Santé & Environnements, Faculté de Pharmacie, 15 avenue Charles Flahault BP14491, 34093 Montpellier, Cedex 5, France.

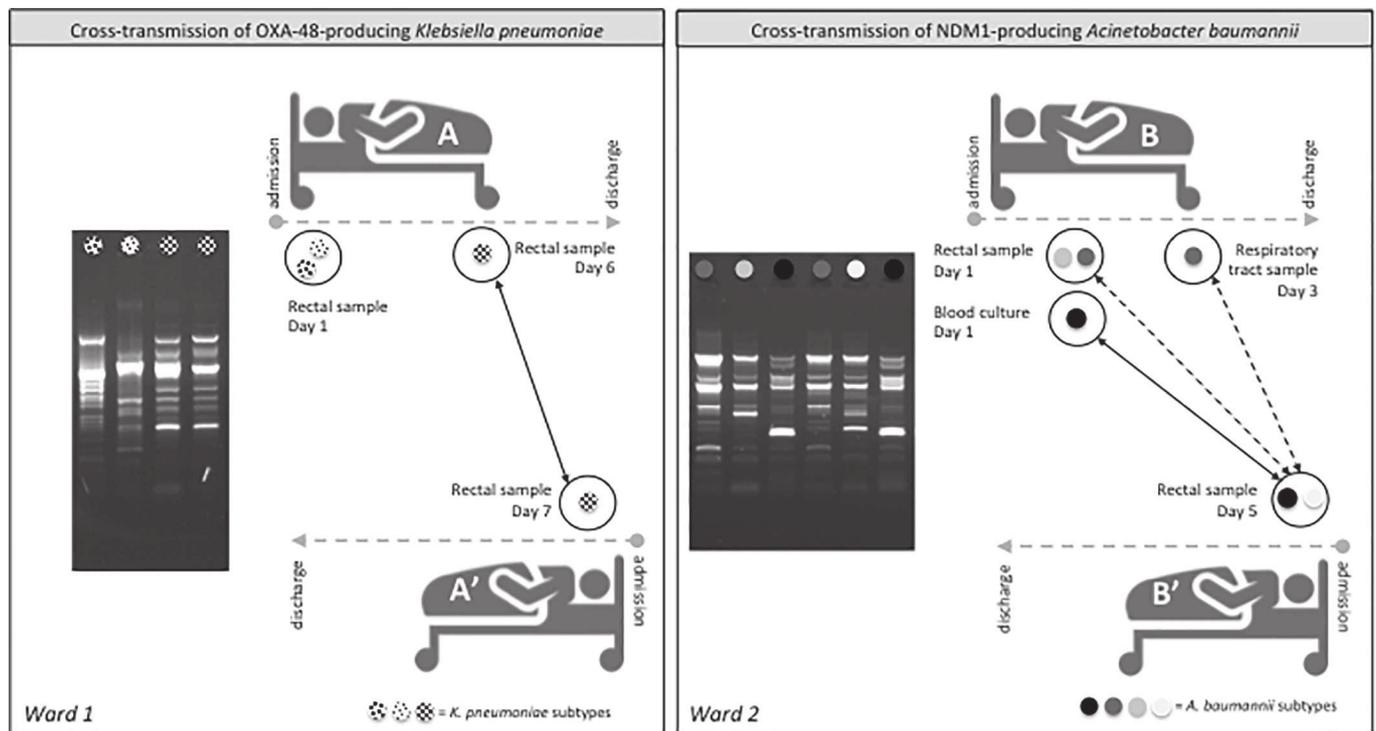
E-mail address: [estelle.bilak@umontpellier.fr](mailto:estelle.bilak@umontpellier.fr) (E. Jumas-Bilak).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.020>

Received 19 March 2018; Received in revised form 14 July 2018; Accepted 17 July 2018

Available online 17 July 2018

1567-1348/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.



**Fig. 1.** Schematic representation and multiplex-rep-PCR gels demonstrating the transmission routes between patients in ward 1 and 2. Clinical samples were replaced on a time scale from admission to discharge of patients A, A', B and B'. A/A' (ward 1) and B/B' (ward 2) are pairs of contact patients. Black circles and colored spots represented Petri dishes and colonies of the same species and resistotype but colors differed according to multiplex-rep-PCR profiles: OXA48-CPKp in ward 1 and NDM1-CPAb in ward 2. Color onto Petri dishes corresponded to the colors of multiplex-rep-PCR gel lanes. Two strictly identical isolates in multiplex-rep-PCR were linked by full arrows line and two related isolates by dotted arrow line.

was detected at D7 after the admission of patient A in a rectal sample from the patient A, a patient in contact with patient A. In order to precise the transmission links and to argument IC measures, strains of the same species and the same resistotype were compared by molecular mean. Multiplex-rep-PCR anchored on REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetition Intergenic Consensus) and BOX sequences was performed as described (Abdouchakour et al., 2015). Plasmid DNA was extracted using the NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) and digested by *HindIII* and *EcoRI* for RFLP experiments. The 3 strains of patient A differed in multiplex-rep-PCR (Fig. 1) and plasmid profiling (data not shown). One colony of OXA48-CPKp isolated in the second rectal swab at D6 was identical to OXA48-CPKp isolated in patient A' by both multiplex-rep-PCR (Fig. 1) and plasmid profiling (data not shown).

For patients B in ward 2, beside the 2 initial colonial morphotypes of NDM1-CPAb detected in rectal swab, 2 additional NDM1-CPAb strains were isolated at D1 in a blood culture and at D3 in a respiratory tract sample. One colonial morphotype from rectum was identical to the respiratory tract strain by genotyping but differed slightly from the other rectal morphotype. Rectal and respiratory tract strains (grey types) differed clearly from the strain isolated in blood culture (black type) (Fig. 1). Two colonial morphotypes of NDM1-CPAb was detected at Day 5 after the patient B admission in the rectal sample of the patient B'. One strain was identical by both multiplex-rep-PCR (Fig. 1) and plasmid profiling (data not shown) to blood culture strain (patient B) and the other was closely related by both rep-PCR and plasmid profiling to respiratory tract and rectal strains from patient B (Fig. 1). Typing several colonies of the same resistotype in carriage, colonization and infection settings from diverse body sites and within a single sample revealed the transmission of NDM1-CPAb between patient B and B' (black morphotype in figure) as well as the occurrence of a diversified population of closely related NDM1-CPAb strains (shaded grey and white types in figure) in patients B and B'.

At the genomic era, whole-genome sequencing (WGS) has theoretically the highest possible discriminatory power to address fast and slow genetic events by exploring both variable/accessory and house-keeping/core genomes (Martin et al., 2017) (Rossen et al., 2017). However, fingerprinting by macrorestriction and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) is still the « gold standard » for typing most bacteria causing HAI outbreaks because detecting fast evolution by genomic rearrangements is very efficient in short spatiotemporal context (Sabat et al., 2013). For many bacteria, particularly *Enterobacteria*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, rep-PCR can be almost as discriminatory as PFGE (Sabat et al., 2013).

It is usually admitted that the inherent resolution of typing method and the level of intra-species diversity should be considered to reconstruct epidemiological links from molecular typing data (Sabat et al., 2013). Moreover, molecular typing should be confronted to local data and to global epidemiology. With these precautions, identical genotypes can demonstrate epidemiological links such as cross-transmissions between patients. Conversely, epidemiological links could not be definitively excluded when different genotypes were observed in typing experiment, as demonstrated herein. The main reason is the overlooking of genotypes dynamics that occurred either by horizontal resistance gene transfer (HRGT) or by intra-clonal diversification. Herein, plasmid fingerprints rule-out HRGT and rather suggests fast intra-clonal diversification. This phenomenon is now considered in the microbiological follow-up of cystic fibrosis patients (Dupont et al., 2016), but the impact of within-host diversity in the management of HAI and the tracking of emerging multi- or extremely-resistant bacteria is less studied and/or rarely reported as such. Moreover, HRGT within and among HAI-associated bacteria is considered as a major driver for spread of carbapenemases within *Enterobacteriaceae* (Martin et al., 2017) (Sheppard et al., 2016). For instance, in a single centre, the gene *blaKPC* was found in 66 different strains of *Enterobacteriaceae* corresponding 13 different species (Sheppard et al., 2016). Moreover, same

species and plasmid are detected in only 30% of patients suspected to contact with a source patient. Authors concluded that standard practices of screening targeted onto an outbreak species are likely to grossly underestimate the true prevalence of a resistance marker in a centre (Sheppard et al., 2016). Herein, we show in pairs of contact patients that NDM1-CPAb and OXA48-CPKp corresponded to diversified population that should be sampled as extensively as possible in order to track CPB routes of transmission more accurately. A protocol for morphotypes and colonies sampling could be established after a global evaluation of the intra- and inter-sample diversity of genotypes according to bacterial species. Meanwhile, we recommend on the basis of our experience to sample every morphotype and if possible, at least 3 colonies per morphotype.

We show that diversifying sampling sites in patients and isolating several colonies per species and resistotype allow exploring more comprehensively the diversity of outbreak bacterial populations, and thereby decipher complex transmission routes between patients. As for other domains in clinical microbiology, the classical view of an outbreak as the linear transmission of a clonal pathogenic strain should move toward a population-based view that considers fast microbial diversification and HRGT. The promising concept of pathobiome could help to study the pathogens dynamically among their population and within their ecosystem (Romano-Bertrand et al., 2015). A pre-requisite to reach this aim is to develop new tools coupling efficient typing methods and metagenomics approaches for covering the whole diversity in the pathogen population (Zolfo et al., 2017).

#### Acknowledgments

This study was based on data obtained from the routine practice of the infection control team and the microbial ecology laboratory of the university hospital of Montpellier. We are particularly indebted to Elodie Bousquet, Hélène Brugui ere and Pascale Chaize for infection control investigations and to Charl ene Bormes, Sylvie Ivanoff and Myriam Roura for excellent technical assistance in microbiology.

All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

#### References

- Abdouchakour, F., Dupont, C., Grau, D., Aujoulat, F., Mournetas, P., Marchandin, H., Parer, S., Gibert, P., Valcarcel, J., Jumas-Bilak, E., 2015. *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. clonal selection leads to successive waves of contamination of water in dental care units. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7509–7524.
- Almakki, A., Maure, A., Pantel, A., Romano-Bertrand, S., Masnou, A., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Licznar-Fajardo, P., 2017. NDM-5-producing *Escherichia coli* in an urban river in Montpellier, France. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50, 123–124.
- Barrangou, R., Dudley, E.G., 2016. CRISPR-based typing and next-generation tracking technologies. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 7, 395–411.
- Dupont, C., Jumas-Bilak, E., Michon, A.L., Chiron, R., Marchandin, H., 2016. Impact of high diversity of *Achromobacter* populations within cystic fibrosis sputum samples on antimicrobial susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 55, 206–215.
- Islam, M.A., Alam, M.M., Choudhury, M.E., Kobayashi, N., Ahmed, M.U., 2008. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of cloxacillin for selected isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with their antibiogram. *Bangl J Vet Med* 6, 121–126.
- Markussen, T., Marvig, R.L., Gómez-Lozano, M., Aan as, K., Burleigh, A.E., H oyb, N., Johansen, H.K., Molin, S., Jelsbak, L., 2014. Environmental heterogeneity drives within-host diversification and evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 5 (e01592–14).
- Martin, J., Phan, H.T.T., Findlay, J., Stoesser, N., Pankhurst, L., Navickaite, I., De Maio, N., Eyre, D.W., Toogood, G., Orsi, N.M., Kirby, A., Young, N., Turton, J.F., Hill, R.L.R., Hopkins, K.L., Woodford, N., Peto, T.E.A., Walker, A.S., Crook, D.W., Wilcox, M.H., 2017. Covert dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) in a successfully controlled outbreak: long- and short-read whole-genome sequencing demonstrate multiple genetic modes of transmission. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 3025–3034.
- Romano-Bertrand, S., Dupont, C., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Licznar-Fajardo, P., 2015. Reducing pathobiomes could slow arms race between man and microbes. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Badajoz : Microbiology Series N  5 Formatex, pp. 698–716.
- Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for Genomic and Molecular Diagnostics (ESGMD). Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect*, 2017 pii: S1198-743X(17)30630–4.
- Sabat, A.J., Budimir, A., Nashev, D., S a-Le o, R., van Dijl, J.M., Laurent, F., Grundmann, H., 2013. Friedrich AW; ESCMID study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* 18, 20380.
- Sheppard, A.E., Stoesser, N., Wilson, D.J., Sebra, R., Kasarskis, A., Anson, L.W., Giess, A., Pankhurst, L.J., Vaughan, A., Grim, C.J., Cox, H.L., Yeh, A.J., Modernising Medical Microbiology (MMM) Informatics Group, Sifri, C.D., Walker, A.S., Peto, T.E., Crook, D.W., Mathers, A.J., 2016. Nested russian doll-like genetic mobility drives rapid dissemination of the carbapenem resistance gene *blaKPC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 3767–3778.
- Stanczak-Mrozek, K.I., Manne, A., Knight, G.M., Gould, K., Witney, A.A., Lindsay, J.A., 2015. Within-host diversity of MRSA antimicrobial resistances. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2191–2198.
- Trauner, A., Liu, Q., Via, L.E., Liu, X., Ruan, X., Liang, L., Shi, H., Chen, Y., Wang, Z., Liang, R., Zhang, W., Wei, W., Gao, J., Sun, G., Brites, D., England, K., Zhang, G., Gagneux, S., Barry 3rd, C.E., Gao, Q., 2017. The within-host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* vary with treatment efficacy. *Genome Biol.* 18, 71.
- Zolfo, M., Tett, A., Jousson, O., Donati, C., 2017. SegataMetaMLST: multi-locus strain-level bacterial typing from metagenomic samples. *Nucleic Acids Res.* 45 (p.e7).

**B) Evaluer l'impact de prélèvements intensifs des surfaces pour décrire les circuits de diffusion des BPC dans l'environnement : Exemple d'une épidémie de BPC.**

Précédemment, nous avons décrit l'intérêt de l'étude de la diversité des BPC lors de la description de cas de transmissions croisées entre deux patients. Dans, l'article 5, à soumettre pour publication, un échantillonnage intensif de l'environnement hospitalier a aussi été réalisé : 1802 prélèvements de surfaces au cours une épidémie de BPC impliquant 6 patients et 4 espèces de BPC. Cet article démontre toute la complexité de la transmission des BPC et des gènes codant les carbapénémases entre les patients et l'environnement au cours de phénomènes épidémiques.

**Article 5: The diversity of carbapenemase-producing community should be considered to unravel complex routes of transmission during hospital outbreak**

**Baranovsky S., Romano-Bertrand S., Licznar-Fajardo P., Dumont Y.; Masnou A.; Téot L., Parer S., Grau D., Jumas-Bilak E.**

Cette article est à soumettre pour publication dans International journal of antimicrobial agent

***The diversity of carbapenemase-producing community should be considered to unravel complex routes of transmission during hospital outbreak***

Authors: Sophie Baranovsky<sup>1</sup>, Sara Romano-Bertrand<sup>1</sup>, Patricia Licznar-Fajardo<sup>1</sup>, Yann Dumont<sup>2</sup>, Agnès Masnou<sup>3</sup>, Luc Téot<sup>4</sup>, Sylvie Parer<sup>1</sup>, Delphine Grau<sup>1</sup>, Estelle Jumas-Bilak<sup>1\*</sup>

1. HydroSciences Montpellier, IRD, CNRS, Univ Montpellier, Département d'Hygiène Hospitalière, CHU de Montpellier, Montpellier, France
2. MIVEGEC, IRD, Univ Montpellier, Département de Bactériologie, Virologie, CHU de Montpellier, Montpellier, France.
3. HydroSciences Montpellier, IRD, CNRS, Univ Montpellier, France
4. Département Médico-Chirurgicale Plaies et Cicatrisations, Brûlés, Chirurgie plastique et reconstructrice, CHU Montpellier, Montpellier, France

\*Corresponding author: Pr Estelle Jumas-Bilak, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491 34093 Montpellier cedex 5, France, Phone: +33 4 11 75 94 30, Fax: +33 4 67 63 45 11, email: Estelle.bilak@umontpellier.fr

**Abstract:**

Hospital environment can play an essential role in outbreak of healthcare-associated infections. In this study, we analyzed the cross-transmission between patients, the spreading and persistence of carbapenemase-producing bacteria (CPB) in hospital environment during an CPB outbreak involving 7 patients whose index case was infected by several CPB: NDM-1 *Acinetobacter baumannii*, NDM-1/OXA48 *Klebsiella pneumoniae*, NDM-1 *Enterobacter cloacae* and NDM-1 *Escherichia coli*. Strains from patients and ward were collected and identified by MALDI-TOF-MS. Genotypes were compared by multiplex rep-PCR, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and MultiLocus Sequence-Typing (MLST). The genes *bla<sub>OXA48</sub>* and *bla<sub>NDM</sub>* were studied by PCR and sequencing, and plasmids by conjugation assay, their incompatibility (Inc)group and genomic RFLP with *IncA/C* and *bla<sub>NDM-1</sub>* as probes.

A high diversity of CPB were isolated in patients: 4 species (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* and *E. coli*), in 12 MR-PCR profiles, 14 PFGE profiles and 10 sequence types. During the outbreak, the environment was incriminated as a reservoir. In order to investigate environmental reservoirs, intensive sampling (n=1802) was performed. We observed a high rate and high diversity of CPB in the bedroom occupied by CPB-carriers (25.2%). Moreover, 12.8% of the CPB genotypes and/or resistotypes collected in patients' rooms were not detected in the patients' samples showing that environmental microbiology completed the CPB repertory associated to patient. It also helps to reconstruct a transmission pathway displaying an unsuspected complexity. The outbreak involved transmission of NDM-1 strains among patients and/or NDM-1 plasmids among species and genotypes. Successful

transmission of NDM-1 from outbreak isolates *E. coli* to outbreak isolates *E. cloacae* and conversely was obtained *in vitro*.

Successful horizontal gene transfer, the high diversity of genotypes, resistotypes isolated in patients and in this close environment need to consider the notion CP-community during on CPB outbreak and to consider the patient with its close environment as a single entity for CPB transmission.

**Key-words:**

Enterobacteria; *Acintebacter baumannii*; NDM; OXA-48; hospital environment; plasmid typing; multi-locus sequence typing

## **Introduction**

Enterobacterales and *Acinetobacter baumannii* are bacteria able to produce carbapenemase encoded mainly by *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> or *bla*<sub>KPC</sub> genes. Carbapenemase-producing (CP) bacteria (CPB) break down most beta-lactam antibiotics including carbapenems (Diene and Rolain, 2014). In Enterobacterales and *P. aeruginosa*, *bla* genes are usually carried on mobile genetic elements (Cui et al. 2019) (Pang et al. 2019), while they can be located either on a plasmid or the chromosome of *A. baumannii* (Zarrilli et al. 2013) (Bonnin et al. 2012). Currently, CPB spread worldwide and became endemic in several countries, raising the problem of treatment options for CPB infections (Friedman et al. 2017). CPB are increasingly reported in healthcare settings and nosocomial outbreaks (Magiorakos et al. 2017). Hospital environment is described as a reservoir/relay for pathogens' transmission between patients relaying outbreak (Bouguenoun et al. 2016) (Pantel et al. 2017) (Clarivet et al. 2017).

Molecular tools are used to identify cross-transmission between patients, such as rep-PCR (Principe et al. 2014), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Neoh et al. 2019), MultiLocus Sequence Typing (MLST) (Woksepp et al. 2017) and Whole-Genome Sequencing (WGS) (Chen et al. 2019). Whatever the method, they are usually applied onto one colony per species isolated from one sample. However, this sampling underestimates the whole diversity of the CPB isolated from both colonized/infected patients and hospital environment. Indeed, a high diversity of CPB species and intra-species or intra-clonal variants is likely in a clinical sample (Baranovsky et al. 2018). Moreover, horizontal gene transfer can occur among different species of Enterobacterales (Hidalgo et al. 2019) and among Enterobacterales and other non-Enterobacterales. CPB (Yamamoto et al. 2016).

Interspecies transfer of a CPB plasmid during outbreak named “plasmidic outbreak” has already been described (Bosch et al. 2017)(Schweizer et al. 2019).

In the context of a outbreak involving 7 patients, 4 species of CPB and 2 *bla*-genes, the aim of this study was to evaluate the diversity of genotype and resistotypes isolated from bacteria in both patients and hospital environment in order to unravel the routes and mode of transmission of CPB.

## **Materials and methods**

### **Settings**

The carbapenemase-producing bacteria (CPB) outbreak took place in the burns unit of 11 beds, in an academic hospital: the University Hospital of Montpellier (France). The burns unit cares for semi-critical or non-critical burned patients. Critical patients are hospitalized in an intensive care unit separated from the main burns unit. Screening of MDR bacteria including CPB is warranted in patients presenting defined risk factors (Lepelletier et al., 2015). CPB-positive patients are signaled to infection control team (ICT) by the microbiology laboratory and are immediately put under reinforced contact precautions. The ICT audits and readjusts hygiene practices. Outbreak is defined when a second case caused by the same species and resistotype occurred in the ward. Since the outbreak alert, the ICT assessed hygiene practices and upgraded them when needed. Inadequate practices

concerning hands hygiene were notified to the staff and immediately corrected. Then, the IC team checked practices weekly.

When CPB carrying patient discharged, his rooms is decontaminated by a deep disinfection procedure combining a meticulous cleaning with 0.5% bleach followed by an airborne disinfection (peracetic acid, hydrogen peroxid). Then, the room is guaranteed CPB-free by sampling the room environment and bacterial culture targeted onto the CPB species colonizing/infecting the patient previously hospitalized. The admission of a new patient is allowed only once environmental samples are negative for the targeted CPB.

#### **Clinical and environmental samplings and bacterial species identification**

Clinical sampling was performed according to the clinical practices of the hospital, in case of suspected infection. Furthermore, weekly screenings were realized for all hospitalized patients in burns unit in order to identify patients carrying for CPB.

About 30 dry and wet surfaces are sampled using sterile cotton swabs (Copan Diagnostics Inc, Murrieta, CA, USA). Swabs were pre-incubated 12h at 37°C into a Soybean Typticase broth (Difco, Bordeaux, France) before streaking onto Gram-negative selective medium MacConkey agar (Difco, Bordeaux, France) and incubating 24 hours at 37°C. Every growing colony was identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) (Brucker, Champs sur Marne, France).

### **Infra-specific molecular typing**

Clinical or environmental isolates belonging to a same bacterial species were typed by multiplex rep-PCR combining 3 types of repeated sequences: BOX, REP and ERIC, as previously described by Dupont et al. (2015). Furthermore, Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) was used after macrorestriction with *Sma*I restriction enzyme for *A. baumannii* (Jeon et al. 2005), *Spe*I for *E. cloacae* (Schlesinger et al. 2005), and *Xba*I for *K. pneumoniae* (Turton et al. 2007). Multi-Locus Sequence Typing (MLST) was performed for isolates of *K. pneumoniae* (Diancourt et al. 2005), *E. cloacae* (Miyoshi-Akiyama et al. 2013), *E. coli* (Wirth et al. 2006) and *A. baumannii* (Bartual et al. 2005) in order to identify their Sequence Type (ST).

### **Susceptibility testing to antimicrobials**

Bacterial susceptibility was determined by the disk diffusion method (Bio-Rad) on Mueller Hinton agar plates, according to the recommendations of the Antibiogram Committee of the French Microbiology Society (CA-SFM) (<https://www.sfm-microbiologie.org/2018/01/07/casfm-eucast-2018/>). The *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub> genes encoding carbapenemases were identified by PCR and sequencing (Poirel et al. 2011).

### **Conjugative assays, location of *bla*<sub>NDM-1</sub> gene and plasmid typing**

For *A. baumannii* strains, chromosomal location of the *bla*<sub>NDM</sub> gene was investigated by using the *I-Ceu*I restriction enzyme, which cuts within 16S-RNA gene. The fragments were then hybridized with a *bla*<sub>NDM</sub> probe (De Belder et al. 2017).

For *Enterobacteriaceae* strains, plasmid location of the *bla*<sub>NDM</sub> gene was investigated using PCR based on their incompatibility (Inc)group as described previously by Carattoli et al. (2005). Comparative plasmids typing was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using *HindIII*, *XhoI* and *BamHI* followed by Southern blotting using *bla*<sub>NDM</sub> and IncA/C digoxigenin-labeled probes using (Digoxigenin Labelling Kit, Boehringer) (Koh et al. 2013).

Conjugative assays were realized by agar mating method in order to investigate transferability of carbapenem resistance from donor isolate carrying plasmidic *bla*<sub>NDM</sub> gene to a recipient susceptible isolate. The donor and recipient isolates came from patients or hospital environment. Donor and recipient strains were dropped onto Soybean Typticase Agar (%15) medium in Petri plate (bioMérieux France) and incubated overnight at 37 °C. Then transconjugants were recovered and were growed on to chromogenous media (chromID® CARBA SMART bioMérieux France). Successful conjugations were confirmed by PCR detection of the *bla*<sub>NDM</sub> gene in the recipient strains.

## **Results**

### **Dynamics of a CP-bacterial community outbreak**

The outbreak history is summarized in Figure 1 and detailed in Supplementary figure (Figure 19 of the thesis). The index case (Patient A) was admitted in room 34, on the 8 of June 2017. He was colonized or infected in various body sites with CPB belonging to diverse species and resistotypes: NDM-1 *A. baumannii*, NDM-1/OXA-48 *K. pneumoniae*, NDM-1 *E. cloacae* and NDM-1 *E. coli*. In the 4 species detected in Patient A, 7 MR-PCR genotypes were identified: A.

*baumannii* (A<sub>aAB</sub>, A<sub>cAB</sub>, B<sub>aAB</sub>), *K. pneumoniae* (A<sub>KP</sub>, B<sub>KP</sub>), *E. cloacae* (A<sub>EC</sub>) and *E. coli* (A<sub>ECOL</sub>) (Table 1). MR-PCR and PFGE typing then allowed to link several further patients to this index case because at least one genotype detected in the index patient was detected in each other patients. In June 2017, along with the index case, two other CPB positive patients were hospitalized in the rooms 33 and 35 beside the room 34 of the index case. The patient B, hospitalized in room 33, was colonized by 2 genotypes of NDM-1 *A. baumannii* (A<sub>aAB</sub> and B<sub>aAB</sub>) previously isolated in Patient A. The patient C hospitalized in bedroom 35 was colonized by the B<sub>KP</sub> genotype of NDM-1 *K. pneumoniae* but NDM-1 *A. baumannii* was not transmitted from Patient A to Patient C. In November 2017, the patient D was hospitalized in room 34 and was then detected positive for NDM-1 producing *E. cloacae* with the same genotype (A<sub>EC</sub>) than patient A. In February 2018, the patient E also hospitalized in the room 34 was colonized by MR-genotypes A<sub>aAB</sub> of NDM-1 *A. baumannii* and A<sub>EC</sub> of NDM-1 *E. cloacae*. At last, in March, the patient F was hospitalized in the room 35, and was colonized by NDM-1 *E. coli* (C<sub>ECOL</sub>) that differed from the MR-genotypes involved in the outbreak until that. So, in spite of a potential epidemiological link, the patient F was not included in the main outbreak event on the basis of MR-PCR and PFGE genotyping (*Supplementary figure, Figure 19 of thesis*). Finally, the patient index carried a CP-community, i.e. several CP-species and CP-genotypes, and the outbreak consisted in the transmission of one or two members of the index CP-community to other patients. Only NDM-1 producing strains were transmitted.

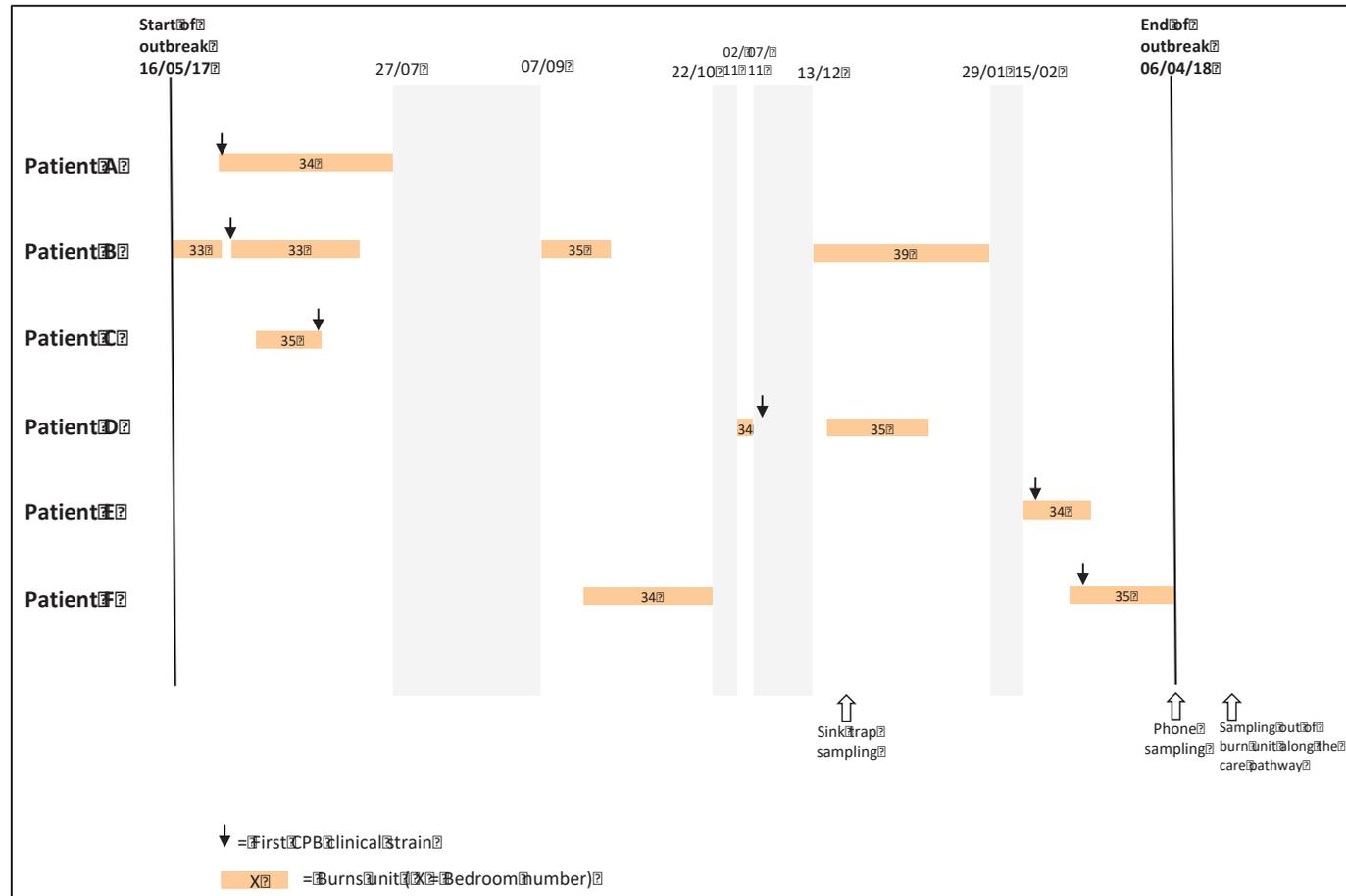
All the isolates of the 4 target species (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* and *E. coli*) isolated in the 7 CPB-positive patients hospitalized in the burns unit were further characterized by genotyping and resistotyping regardless their resistance phenotypes. Data

were presented in Table 1. Nine strains among the 30 isolates did not carry carbapenemase genes and was not transmitted among patients. The non-CP isolates of the 4 species presented MR-PCR, PFGE and MLST genotypes differing from CP-isolates, except for the ST231 of *A. baumannii*, which was found in both CP- (Patient A and B) and non CP-isolates (Patient B). Twenty-one CP clinical isolates clustered in 4 species, in 12 MR-PCR profiles, 14 PFGE profiles and 10 sequence types. This underlined the high diversity of CPB in patients (Table 1) and confirmed the notion CP-community proposed above. The transmission of a given genotype from Patient A to other patients (secondary patients) concerned only one or two genotypes per species but secondary patients also carried a CP-community with some members not detected in the index patient (Table 1). Of note, specific genotypes of secondary patients (absent from the index patient) were not transmitted during the outbreak (Table 1). The diversity of genotypes in secondary patients suggested either microevolution within clonal lineages in the secondary patients or the non-exhaustivity of genotype repertory in patients. Microevolution hypothesis were less likely because specific genotypes in secondary patients mostly belonged to different STs, MLST being known to define relatively large and stable lineages.

It was noteworthy that the non-exhaustivity of the genotypes repertory in patients could lead to misinterpretation of transmission routes in outbreak situations. The cross-transmission of NDM-1 *K. pneumoniae* between patients A and C was emblematic. For patient A, 2 genotypes of *K. pneumoniae*, A<sub>KP</sub> and B<sub>KP</sub>, were isolated in the same rectal sample and B<sub>KP</sub> was also isolated from a blood sample. For the patient B, B<sub>KP</sub> was isolated

from a rectal sample. So, cross-transmission between these two patients was revealed by typing several colonies of a same resistotype isolated from the same sample.

**Figure 1** : Schematic representation of the chronology of patients' stays in burn unit. Only patients included in the CPB outbreak event were represented. The room number is indicated in the orange bar representing every stays. Grey zones represented period without any CPB positive patient in the burn unit. Sampling in rooms and out of rooms in burn unit was performed during the patients' stays (orange bars). Additional specific sampling campaigns were indicated by white arrows.



**Table 1:** Clinical isolates and corresponding genotypes and resistotypes identified during the outbreak

Species	Patients / room	Origin	MR-PCR genotype	Number of sites in environment	PFGE genotype	Resistotype		Sequence typing (ST)	Date
						NDM-1	OXA-48		
<i>A. baumannii</i>	A/34	Rectal	Aa <sub>AB</sub>		I1 <sub>AB</sub>	+	-	NewST	17/06/08
			AC <sub>AB</sub>		I3 <sub>AB</sub>	+	-	1089	
		Blood	Ba <sub>AB</sub>		II1 <sub>AB</sub>	+	-	231	17/06/08
		Sputum	Aa <sub>AB</sub>		I1 <sub>AB</sub>	+	-	NewST	17/06/10
		Room	Aa <sub>AB</sub>	4	ND	+	-	NewST	17/06/29 17/07/06
		Room	Ad <sub>AB</sub>	1	ND	+	-	1089	17/06/29
		Room	Ba <sub>AB</sub>	3	ND	+	-	231	17/06/23 (29)
	B/33	Rectal	Ab <sub>AB</sub>		I2 <sub>AB</sub>	+	-	NewST	17/06/12
			Ba <sub>AB</sub>		II1 <sub>AB</sub>	+	-	231	17/06/12
		Rectal	Bb <sub>AB</sub>		II2 <sub>AB</sub>	-	-	231	17/09/04
		Rectal	Aa <sub>AB</sub>		I1 <sub>AB</sub>	+	-	NewST	17/12/13
		Wound	Bb <sub>AB</sub>		II2 <sub>AB</sub>	-	-	231	17/08/29
		Room	Ba <sub>AB</sub>	14	ND	+	-/+	231	17/07/05 (06,10)
		Room	Aa <sub>AB</sub>	20	ND	+	-	NewST	17/06/21 (23,29) 17/07/05 (06,10) 17/12/20
Room		C <sub>AB</sub>	2	ND	-	-	585	17/12/20	
E/34	Rectal	Aa <sub>AB</sub>		I1 <sub>AB</sub>	+	-	NewST	17/02/19	
	Room	Aa <sub>AB</sub>	10	ND	+	-	NewST	18/02/27 (28)	
	Room	Ae <sub>AB</sub>	4	ND	+	-	NewST	18/02/27 (28)	
F/35	Room	D <sub>AB</sub>	1	ND	-	-	1325	18/04/06	
34	Cleaned Room	Aa <sub>AB</sub>	5	ND	+	-	NewST	18/02/26	

## Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins

<i>K. pneumoniae</i>	A/34	Rectal	A <sub>KP</sub>		I <sub>KP</sub>	+	+	45	17/06/08
			B <sub>KP</sub>		II <sub>KP</sub>	+	+	45	
		Blood	B <sub>KP</sub>		II <sub>KP</sub>	+	-	45	17/06/23
		Room	B <sub>KP</sub>	10	ND/II <sub>KP</sub>	+	-/+	45	17/07/05 (06)
		Room	G <sub>KP</sub>	3	ND	-	-	397	17/07/05 (06)
	B/33	Room	B <sub>KP</sub>	1	ND	+	-	45	17/07/06
		Room	Ha <sub>KP</sub>	1	ND	-	-	442	17/12/20
	C/35	Rectal	B <sub>KP</sub>		II <sub>KP</sub>	+	-	45	17/07/05
	D/34	Sputum	E <sub>KP</sub>		IV <sub>KP</sub>	-	-	540	17/11/13
		Rectal	F <sub>KP</sub>		V <sub>KP</sub>	-	-	35	17/11/20
Wound		F <sub>KP</sub>		V <sub>KP</sub>	-	-	35	17/11/24	
Rectal		D <sub>KP</sub>		III <sub>KP</sub>	+	-	540	17/12/22	
F/35	Room	L <sub>KP</sub>	1	ND	-	-	307	18/04/06	
	Room	M <sub>KP</sub>	1	ND	-	-	307	18/04/06	
<i>E. cloacae</i>	A/34	Blood	A <sub>EC</sub>		I <sub>2EC</sub>	+	-	66	17/06/23
		Urine	A <sub>EC</sub>		I <sub>1EC</sub>	+	-	66	17/06/09
		Room	A <sub>EC</sub>	4	ND/ I <sub>1EC</sub>	+	-	66	17/06/23 (29)
		Room	B <sub>EC</sub>	1	ND	-	-	168	17/06/29
	B/33	Rectal	B <sub>EC</sub>		II <sub>EC</sub>	-	-	168	17/05/27
		Room	B <sub>EC</sub>	1	II <sub>EC</sub>	-	-	168	17/07/06
		Room	A <sub>EC</sub>	3	ND/ I <sub>1EC</sub>	+/-	-	66	17/06/21(29)
	D/34	Rectal	A <sub>EC</sub>		I <sub>1EC</sub>	+	-	66	17/11/09
	E/34	Rectal	A <sub>EC</sub>		I <sub>3EC</sub>	+	-	66	18/02/19
		Room	A <sub>EC</sub>	21	ND/ I <sub>1EC</sub>	+	-	66	18/02/27 (28)
		Room	D <sub>EC</sub>	2	ND	+	-	66	18/02/27(28)
	34	Cleaned Room	A <sub>EC</sub>	1	I <sub>1EC</sub>	+	-	66	18/02/26
	<i>E. coli</i>	A/34	Rectal	A <sub>ECOL</sub>		ND	+	-	69
B/33		Rectal	E <sub>ECOL</sub>		ND	-	-	410	17/05/27
		Urine	D <sub>ECOL</sub>		ND	-	-	73	17/06/08
C/35		Rectal	L <sub>ECOL</sub>		ND	+	-	420	17/07/05

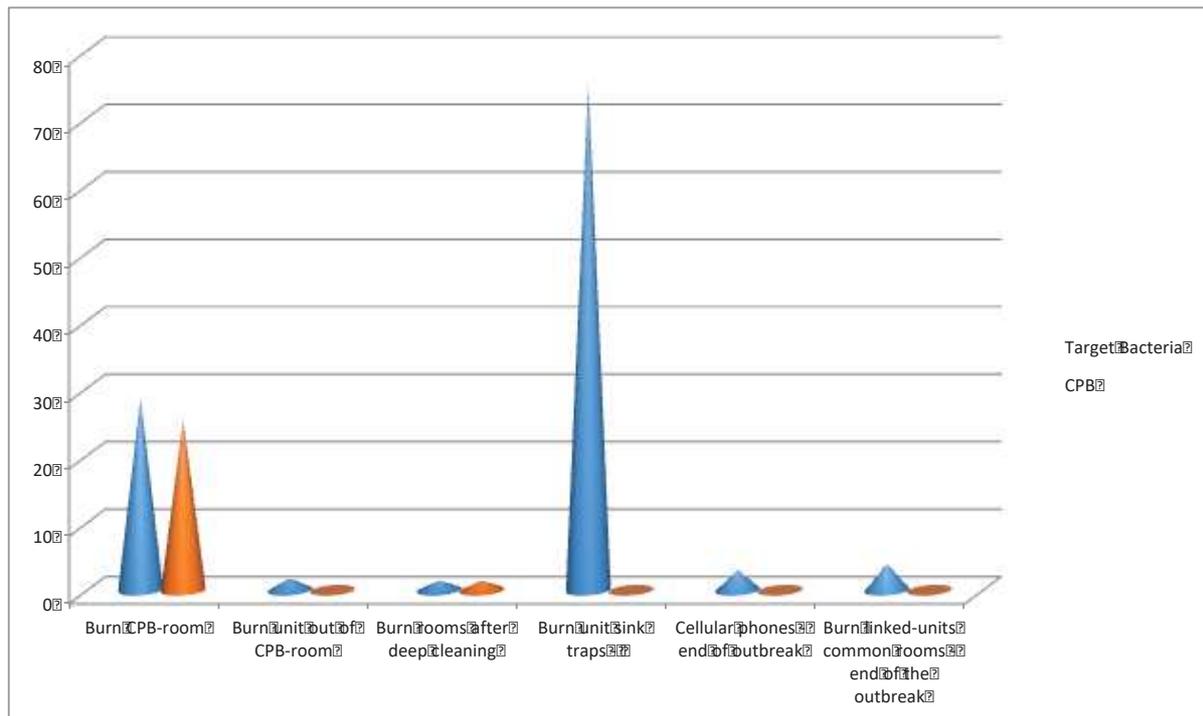
	D/34	Wound	B <sub>E</sub> COL		ND	-	-	998	17/11/24
		Rectal	B <sub>E</sub> COL		ND	+	-	998	17/12/22
	F/34	Urine	C <sub>E</sub> COL		ND	+	-	404	17/03/23
	34	Cleaned Room	F <sub>E</sub> COL	1	ND	-	-	162	18/02/26

### **Does burn unit environment a reservoir or relay for CPB outbreak?**

The course of the outbreak showed temporal gaps between CPB-positive patients (box in grey in Figure 1). These gaps suggested persistent reservoirs out of the patients involved in the outbreak. The room 34, where the index Patient A was hospitalized and then the patients D and E, was suspected for a CPB reservoir. Moreover, two other rooms (33 and 35) accommodating secondary cases of CPB-positive patients were contiguous to room 34. The room 39 away from the room 34 was also involved but during the re-hospitalization of the Patient B contaminated in room 33. At the patient E discharge, after an intensive disinfection (bleach, peracetic acid, hydrogen peroxid) of the room 34, the surfaces were sampled. One strain of NDM-1 *E. cloacae* was isolated on the pillow. Five strains of NDM-1 *A. baumannii* were isolated on the surfaces surrounding the bed, the water point-of-use, the patient's transfer board, and the wall on the entrance outside of the room. The persistence of CPB despite deep cleaning incriminated again the room 34 as a reservoir for patient's exposure.

In order to investigate environmental reservoirs, intensive sampling (n=1802) was performed in the burn unit but also in all the units belonging to the patients' care pathway. Two additional sampling campaigns in burn unit were focused on sink traps and healthcare workers cellular phones independently from the presence of a CPB-positive patient (Figure

1). The ratios of CPB positive samples among all samples for the target species and for CPB were presented in Figure 2. Not surprisingly, the higher ratios were observed close to the patients, in the bedroom occupied by CPB-carriers (25.2%) but less awaited was that CPB strains represented 88% of the target species strains recovered. In 1.6% of the cases, observed exclusively for *A. baumannii*, the bedroom still contaminated after the deep cleaning procedure applied when a CPB-carriers is discharged and before accommodating a new patient. Target species but no CPB were detected out of rooms occupied by CPB-positive patients both in the burns unit and the other units in the patients' care pathway. Finally, in presence of CPB-positive patients, the close room environment could form a massive reservoir for epidemic CPB. In the conditions of the burns unit, the occurrence of CPB-positive strains decreased dramatically out of the patients' rooms in the burn ward and along the patients' care pathways (Figure 2). The cellular phones, used as a proxy to evaluate healthcare workers carriage, were negative for CPB contamination (Figure 2). Sink traps appeared as an important habitat of Gram-negative bacteria but none trap was positive for CPB out of the room occupied by a CPB-carrier (Figure 2).



**Figure 2:** Ratios (%) of CPB positive samples among all the samples obtained according to the origin of samples for the 4 target species whatever their resistotype in blue and for CPB in orange.

### High diversity of CPB in close patient environment

In several cases the patients were colonized by genotypes not detected in Patient A suggesting that the repertory of genotypes circulating among patients was not exhaustive despite the study of several strains for every CPB species involved in the outbreak. To complete the repertory and decipher the routes of CPB transmission, 108 strains of *A. baumannii* (n=59), *K. pneumoniae* (n=17) and *E. cloacae* (n=32) isolated from 361 samples obtained in patient's bedrooms and bathrooms, in presence of patients, 24 h after cleaning, were genotyped. Only 5 rooms among 7 were sampled because of the short stay of patients C and delayed CPB alert for patient D (after his transfer in other care unit).

Ninety-three environmental strains belonged to a same genotype than clinical strains: 34 A<sub>aAB</sub>, 1 A<sub>CAB</sub>, 17 B<sub>aAB</sub>, 28 A<sub>EC</sub>, 2 B<sub>EC</sub> and 11 B<sub>KP</sub> (Table 1). Most of environmental strains (96.7%) with same MR-PCR genotype than CPB-clinical strains displayed the same resistotype, generally NDM-1 production. One *E. cloacae* strain, genotype A<sub>EC</sub>, isolated from a siphon, did not carry the gene *bla*<sub>NDM-1</sub>, suggesting a gene deletion or a lost of plasmid. Two *A. baumannii* strains (genotype B<sub>aAB</sub> isolated on the stethoscope of Patient B were positive for *bla*<sub>OXA-48</sub> together with *bla*<sub>NDM-1</sub> while the CPB strains of the patient occupying the room were positive for *bla*<sub>NDM-1</sub> only (Table 1 and Supplementary Table). The sole other strains carrying *bla*<sub>OXA-48</sub> among the collected strains were 2 strains of *K. pneumoniae* (A<sub>KP</sub> and B<sub>KP</sub>) isolated in the index Patient A and one strain (B<sub>KP</sub>) from his serving table. These strains of *K. pneumoniae* could be the donors for horizontal gene transfer of *bla*<sub>OXA-48</sub> to *A. baumannii* strain. Another hypothesis was the fail in detection of NDM-1/OXA-48 *A. baumannii* in index Patient A and Patient B. During the outbreak, the gene *bla*<sub>OXA-48</sub> appeared unstable in *K. pneumoniae* because the double resistance NDM-1/OXA-48 was detected in a rectal sample of Patient A (B<sub>KP</sub>) but not in the blood sample of the same patient. Moreover, the strain that was transmitted to Patient B lost OXA-48 marker (Table 1) as well as 9/10 of B<sub>KP</sub> *K. pneumoniae* detected in the room of Patient A and the B<sub>KP</sub> *K. pneumoniae* detected in the room of Patient B.

Among the 108 strains of the 4 target species isolated in patient's rooms, in presence of patients, 16 strains displayed genotypes differing from those of patients. Among them, 5 *A. baumannii* strains and 2 *E. cloacae* strains isolated on dry surfaces have different genotypes than clinical strains while harboring a *bla*<sub>NDM-1</sub> gene. This suggested either the horizontal

transfer of *bla*<sub>NDM-1</sub> in *A. baumannii* and *E. cloacae* populations or the detection of only some genotypes amongst a larger CP-community in patients. For instance, the patient B was only colonized by NDM-1 *A. baumannii*. But, in his bedroom environment, 2 strains of NDM-1 *E. cloacae* *A*<sub>EC</sub> (chair / stethoscope) and 1 strain of NDM-1 *K. pneumoniae* *B*<sub>KP</sub> (door handle) were detected. These strains had the same genotypes that the clinical strains of the patient A.

Genotyping confirmed the involvement of room 34 as a reservoir for the outbreak. Four strains *E. cloacae* genotype *A*<sub>EC</sub> were detected in room 34 occupied by Patient A and 21 *A*<sub>EC</sub> strains were detected this room, 8 months later when the room was occupied by Patient E. The index patient and 3 secondary patients hospitalized in room 34 were colonized or infected by NDM-1 *E. cloacae* genotype *A*<sub>EC</sub> and 2 of them (patients A and E) by NDM-1 *A. baumannii* genotype *A*<sub>AB</sub>. Patient D and E were contaminated by these genotypes in room 34 in absence of other CPB-positive patients in the burn unit (Figure 1). At last, *A. baumannii* genotype *A*<sub>AB</sub> contaminated the room 34 even after deep cleaning procedure at the end of the outbreak.

Finally, environmental strains isolated in patient's rooms were highly diverse, belonging to various genotypes and resistotypes, including strains that lost/ gained *bla*<sub>NDM-1</sub> / *bla*<sub>OXA-48</sub> genes. Analysis of patients' environment completed the CPB repertory associated to patient. Indeed, 12.8% of the CPB genotypes and/or resistotypes collected in patients' rooms were not detected in the patients' samples. These results suggest that the patient and his close environment should be considered as a whole unit of transmission.

### **The outbreak involved both strain and plasmid spreading**

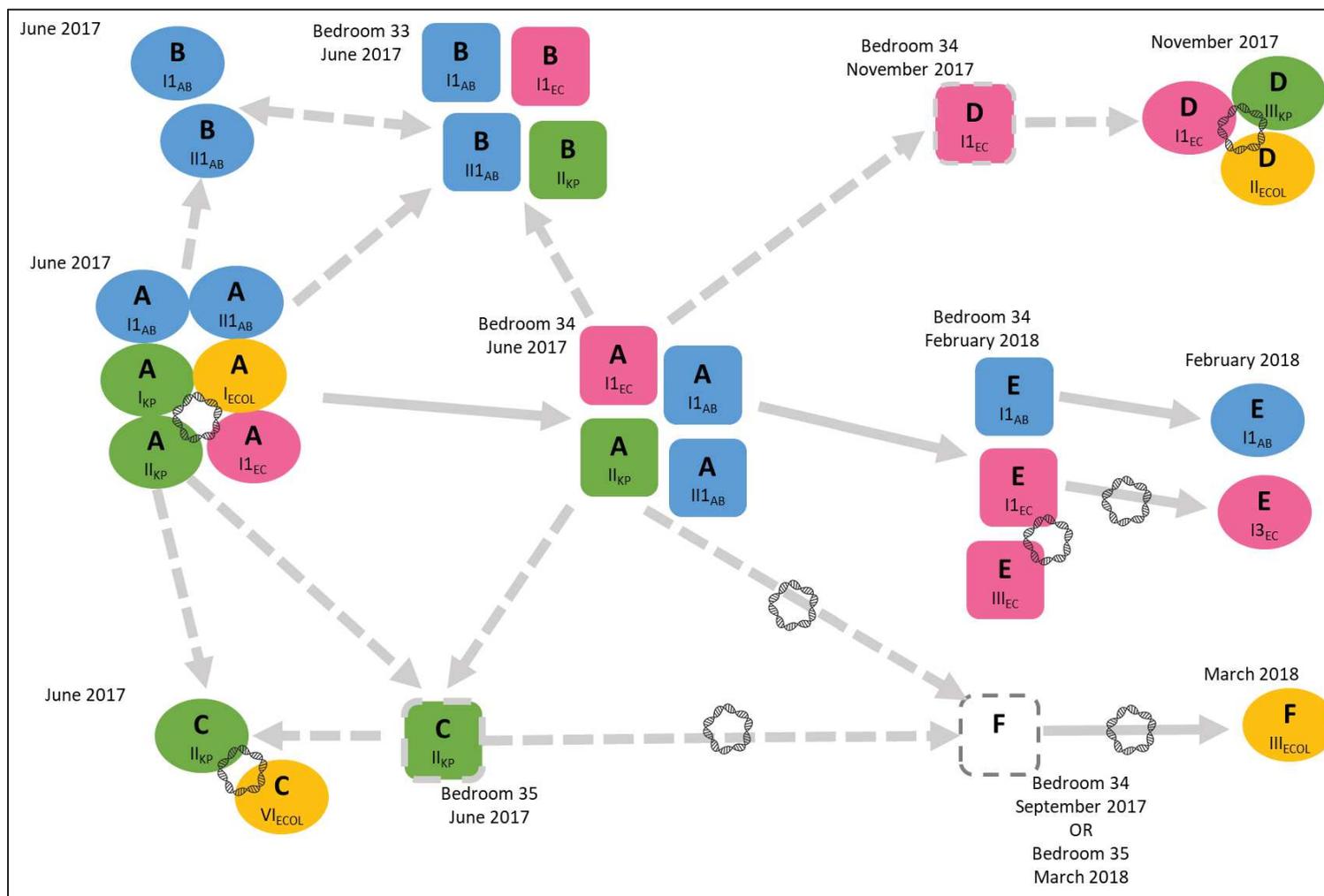
The common trait of CPB strains, even if very diverse, was that they all carried the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene. This gene was isolated in 124 strains of *A. baumannii* (69 strains), *K. pneumoniae* (17 strains), *E. cloacae* (34 strains) and *E. coli* (4 strains). Owing to the diversity of genotypes carrying *bla*<sub>NDM-1</sub> in every species, horizontal transfer of *bla*<sub>NDM-1</sub> gene could be hypothesized. The *bla*<sub>NDM-1</sub> gene was chromosomal in all *A. baumannii* strains as demonstrated by *bla*<sub>NDM-1</sub> hybridization onto I-CeuI digestion pattern, which corresponded to chromosomal fragments only, because I-CeuI cut the bacterial chromosome specifically at *rrn* sites. Therefore, gene transfer from *A. baumannii* was unlikely and the presence of *bla*<sub>NDM-1</sub> gene in various related MR-PCR genotypes (same ST) isolated onto dry surfaces (Table 1) suggested an underestimated diversity in the patients rather than gene diffusion among related strains of the same species.

Concerning the 3 species of CP-enterobacteria, all strains of the different genotypes presented a *bla*<sub>NDM-1</sub>-carrying plasmids belonging to IncA/C plasmid family and identical by RFLP-southern blotting to the plasmids carried by patient A. This suggested the spreading of an epidemic plasmid among members of the Patient A microbiota followed by the secondary spread of strains and/or plasmids among the other patients. The spread of strains concerned mainly *K. pneumoniae* and *E. cloacae* for which, B<sub>KP</sub> (ST45) and A<sub>EC</sub> (ST66) respectively, were transmitted among patients (Table 1). D<sub>KP</sub> (ST450) and D<sub>EC</sub> (ST66) strains carried *bla*<sub>NDM-1</sub> but was detected only in rooms of patients D and E, respectively. This suggested horizontal gene transfer between remoted lineages in *K. pneumoniae* and more related lineage in *E. cloacae*. Considering *E. coli*, there was no transmission of a same strain (genotype) among patient or

rooms. However, *bla*<sub>NDM-1</sub> carried by the same plasmid was detected in 4 different MR-PCR genotypes and STs suggesting the high-spread of *bla*<sub>NDM-1</sub> among *E. coli* populations despite the low-spread of each *E. coli* strain during the outbreak. Of note, the patient F was associated to the outbreak on the basis of plasmid transmission and not strain transmission (Figure 3).

To go farther with horizontal gene transfer involving *E. coli*, conjugative assays were performed with donor and recipient strains, which were natural isolates collected from patients or environment during the outbreak. Conjugations were observed from NDM-1 *E. coli* (*L*<sub>ECOL</sub>) (Patient B) and NDM-1 *E. coli* (*C*<sub>ECOL</sub>) (Patient F) to an environmental non-CP strain of *E. cloacae* (*A*<sub>EC</sub>) (siphon of the bedroom 33), confirming the ability of *E. coli* strains involved in this outbreak to efficiently transfer NDM-1 marker. Moreover, *bla*<sub>NDM-1</sub> was also transferred from NDM-1 *E. cloacae* (*A*<sub>EC</sub>) (Patient D) to a non-CP strain of *E. coli* (*B*<sub>ECOL</sub>) (Patient D). So, we demonstrated that NDM-1 plasmid can be transferred from *E. coli* to *E. cloacae*, and from *E. cloacae* to *E. coli* in experimental conditions and that *E. coli* strains isolated during the outbreak were good donors and recipients for NDM-1 marker.

**Figure 3: Hypothesized routes of spread of CPB between patients and environment based on PFGE and plasmidic analyzes.**



Each letter (A, B, C, D, E, F) denotes a patient. Circles represent clinical strains, square represent environmental strains. Dotted square outline represents a possible environmental reservoir.

Bacterial species are schematized by a color: bleu for *A. baumannii*; pink for *E. cloacae*; green for *K. pneumoniae* and yellow for *E. coli*.

PFGE genotypes of *A. baumannii* are represented by I<sub>1AB</sub>, II<sub>1AB</sub>

PFGE genotypes of *E. cloacae* are represented by I<sub>1EC</sub>, I<sub>3EC</sub>, III<sub>EC</sub>

PFGE genotypes of *K. pneumoniae* are represented by I<sub>KP</sub>, II<sub>KP</sub>, III<sub>KP</sub>

PFGE genotypes of *E. coli* are represented by I<sub>ECOL</sub>, II<sub>ECOL</sub>, III<sub>ECOL</sub>, VI<sub>ECOL</sub>

Arrows represent a route of spread demonstrated by genotype or plasmid analyze.

Dotted arrows denote a possible route of spread.



represents a route of spread demonstrated by plasmid analyze

## Discussion

In this study, the hospital environment close to patient was clearly a reservoir of CPB relaying the outbreak. Even if this is already described in the literature (Stoesser et al. 2015) (Dai et al. 2016) (Clarivet et al. 2016), the originality of our study is based on the intensive sampling of the hospital environment during the outbreak (nearly 2000 samples) and the molecular analyzes of both clinical (30 strains for 7 patients) and environmental strains. During a hospital outbreak, the usual approach for molecular typing is based on analyze and comparison of one strain by patient. The cross-transmission is then investigated by focusing onto clinical strains selected as one colony per sample, but this classical approach underestimates the diversity of genotypes colonizing/infecting patients. Sampling bias during molecular investigation of outbreaks was supposed but rarely demonstrated in literature (Baranovsky et al. 2018). A recent publication demonstrates that a diversified populations of NDM-1 *A. baumannii* and OXA-48 *K. pneumoniae* in patients microbiota can impair the molecular comparison and hide some CPB routes of transmission.

Moreover, several studies demonstrated the horizontal gene transfer of genes encoding carbapenemases in patients' microbiota in which different species can share a same plasmid that encodes carbapemase (Cavalié et al. 2016) (Yamamoto et al. 2019). Plasmids typing in addition to strains typing warrant a more complete vision of transmission modes and routes (Hidalgo et al. 2019). The present study demonstrated the transmission of plasmid harbouring CPB gene, between different enterobacterial species: *E. cloacae*, *E. coli* and *K. pneumoniae* as previously described (Potron et al. 2011) (Sheppard et al., 2016). Particularly,

experimental conjugation using burns outbreak isolates demonstrated the ability of natural isolates of CP-E. coli and CP-E. cloacae to transmit blaNDM-1 gene. Plasmid follow-up during the outbreak, also linked another patient (patients F) to the CPB outbreak while the usual genotyping excluded him. WGS not performed herein, would be very useful to unravel complex outbreak because it takes into account all genomic sequences whatever their plasmidic or chromosomal origin. For example Martin et al. (2017) described a large outbreak of *K. pneumoniae* KPC during 3 months, MLST analyzes permit to include 15 patients in the outbreak and WGS permits to link 20 patients. These 20 patients had the same plasmid and were colonized/infected by 6 different ST of *K. pneumoniae*. So WGS was a useful tool to both analyze the transfer of gene-associated plasmids and chromosomal single nucleotide polymorphism (Martin et al. 2017). In our study, the use WGS would have been helpful to better characterize plasmids carrying blaNDM-1 genes and would bring more information onto links between strains involved within the outbreak.

Reported outbreak investigations rarely include in-depth environmental sampling. Consequently, a large part of CPB routes and reservoir are hidden leading to the underestimation of the complexity of the outbreaks mechanisms. Moreover, to overshadow the environmental life of CPB can impair the appropriateness of infection control measures. When identified, eliminating environmental reservoir permits to prevent cross-transmission (Clarivet et al. 2016) (Pantel et al. 2016), along with other IC measures usually applied in bundles: for example cohorting of patients, patient screening, staff education... (Lepelletier et al. 2015) (French et al. 2017).

In order to approach its real diversity, the bacterial population should be considered as a whole that can group several species, genotypes, resistotypes, or plasmids... In our study, we observed a wide diversity in genotypes and resistotypes in CPB populations isolated in patients, in their rooms and in the unit. These results underline the need to consider the patient and its close environment as a single spacio-temporal reservoir for CPB transmission and a whole unit for CPB transmission. The hospital environment has already been described as a proxy for determining bacterial carriage status in hospitalized patients colonized by with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-Resistant Enterococcus (VRE) (Cassone et al. 2018). Authors proposed to analyze environment to monitor MRSA and VRE patients colonization. So hospital environment was considered that the mirror of patients microbiota. Our study confirmed the pertinence of this concept because environment reflect and complete the patient CP-community. We go further by proposing the concept of unit of transmission, which is a more operational concept. Indeed, during the hospitalization of a patient infected/colonized by CPB a screening of patients hospitalized in the same unit is realized to detect transmission and outbreak (French et al. 2017). This detection of secondary cases isn't a preventive action. Sampling both patients' microbiota and room CPB community permits to evaluate the risk of transmission and limit it appropriate cleaning procedures.

## References

- Baranovsky S, Romano-Bertrand S, Dumont Y, Masnou A, Hammer F, Godreuil S, Parer S, Jumas-Bilak E. Tracking carbapenemase-producing bacteria by molecular typing: Population diversity and sampling pitfall. *Infect Genet Evol.* 2018 Nov;65:104-106.
- Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep;43(9):4382-90.
- Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, Nordmann P. Dissemination of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Sep;18(9):E362-5.
- Bosch T, Lutgens SPM, Hermans MHA, Wever PC, Schneeberger PM, Renders NHM, Leenders ACAP, Kluytmans JAJW, Schoffelen A, Notermans D, Witteveen S, Bathoorn E, Schouls LM. Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Dutch Hospital, with Interspecies Transfer of the Resistance Plasmid and Unexpected Occurrence in Unrelated Health Care Centers. *J Clin Microbiol.* 2017 Aug;55(8):2380-2390.
- Bouguenoun W, Bakour S, Bentorki AA, Al Bayssari C, Merad T, Rolain JM. Molecular epidemiology of environmental and clinical carbapenemase-producing Gram-negative bacilli from hospitals in Guelma, Algeria: Multiple genetic lineages and first report of OXA-48 in *Enterobacter cloacae*. *J Glob Antimicrob Resist.* 2016 Dec;7:135-140.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005 Dec;63(3):219-28.
- Cassone M, Mantey J, Perri MB, Gibson K, Lansing B, McNamara S, Patel PK, Cheng VCC, Walters MS, Stone ND, Zervos MJ, Mody L. Environmental Panels as a Proxy for Nursing Facility Patients With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Colonization. *Clin Infect Dis.* 2018 Aug 31;67(6):861-868.
- Cavalié L, Manton B, Fayet O, Prère MF. blaNDM-1-positive *Citrobacter sedlakii*: emergence after horizontal gene transfer from *Klebsiella pneumoniae* in the human intestinal tract. *Int J Antimicrob Agents.* 2016 May;47(5):411-3.
- Chen C, Zhang Y, Yu SL, Zhou Y, Yang SY, Jin JL, Chen S, Cui P, Wu J, Jiang N, Zhang WH. Tracking Carbapenem-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak in an Intensive Care Unit by Whole Genome Sequencing. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 Aug 8;9:281.
- Clarivet B, Grau D, Jumas-Bilak E, Jean-Pierre H, Pantel A, Parer S, Lotthé A. Persisting transmission of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* due to an environmental reservoir in a university hospital, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill.* 2016 Apr 28;21(17).
- Cui X, Zhang H, Du H. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. *Front Microbiol.* 2019 Aug 20;10:1823.

- Dai Y, Zhang C, Ma X, Chang W, Hu S, Jia H, Huang J, Lu H, Li H, Zhou S, Qiu G, Liu J. Outbreak of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* neurosurgical site infections associated with a contaminated shaving razor used for preoperative scalp shaving. *Am J Infect Control*. 2014 Jul;42(7):805-6.
- De Belder D, Faccione D, Tijet N, Melano RG, Rapoport M, Petroni A, Lucero C, Pasteran F, Corso A, Gomez SA. Novel class 1 Integrins and sequence types in VIM-2 and VIM-11-producing clinical strains of *Enterobacter cloacae*. *Infect Genet Evol*. 2017 Oct;54:374-378.
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):4178-82.
- Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep;20(9):831-8.
- Dupont C, Michon A-L, Jumas-Bilak E, Nørskov-Lauritsen N, Chiron R, Marchandin H. Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of Cystic Fibrosis airways. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2015;32:214–23.
- French CE, Coope C, Conway L, Higgins JP, McCulloch J, Okoli G, Patel BC, Oliver I. Control of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* outbreaks in acute settings: an evidence review. *J Hosp Infect*. 2017 Jan;95(1):3-45.
- French CE, Coope C, Conway L, Higgins JP, McCulloch J, Okoli G, Patel BC, Oliver I. Control of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* outbreaks in acute settings: an evidence review. *J Hosp Infect*. 2017 Jan;95(1):3-45.
- Friedman ND, Carmeli Y, Walton AL, Schwaber MJ. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: A Strategic Roadmap for Infection Control. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017 May;38(5):580-594.
- Hidalgo L, de Been M, Rogers MRC, Schürch AC, Scharringa J, van der Zee A, Bonten MJM, Fluit AC. Sequence-based epidemiology of an OXA-48 plasmid during a hospital outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Oct 7.
- Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, Lee JH, Song JS, Lee SH. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. *J Clin Microbiol*. 2005 May;43(5):2241-5.
- Lepelletier D, Berthelot P, Lucet JC, Fournier S, Jarlier V, Grandbastien B; National Working Group. French recommendations for the prevention of 'emerging extensively drug-resistant bacteria' (eXDR) cross-transmission. *J Hosp Infect*. 2015 Jul;90(3):186-95.
- Martin J, Phan HTT, Findlay J, Stoesser N, Pankhurst L, Navickaite I, De Maio N, Eyre DW, Toogood G, Orsi NM, Kirby A, Young N, Turton JF, Hill RLR, Hopkins KL, Woodford N, Peto TEA, Walker AS, Crook DW, Wilcox MH. Covert dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) in a successfully controlled outbreak: long- and short-read whole-genome sequencing demonstrate multiple genetic modes of transmission. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Nov 1;72(11):3025-3034.
- Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One*. 2013 Jun 11;8(6):e66358.

- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019 Jan - Feb;37(1):177-192.
- Pantel A, Richaud-Morel B, Cazaban M, Bouziges N, Sotto A, Lavigne JP. Environmental persistence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a French intensive care unit. *Am J Infect Control.* 2016 Mar 1;44(3):366-8.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 May;70(1):119-23.
- Potron A, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated transfer of the bla(NDM-1) gene in Gram-negative rods. *FEMS Microbiol Lett.* 2011 Nov;324(2):111-6.
- Principe L, Piazza A, Giani T, Bracco S, Caltagirone MS, Arena F, Nucleo E, Tammaro F, Rossolini GM, Pagani L, Luzzaro F; AMCLI-CRAB Survey Participants. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. *J Clin Microbiol.* 2014 Aug;52(8):3004-10
- Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Hammer-Münz O, Leavitt A, Gold HS, Schwaber MJ, Carmeli Y. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacter* isolates obtained in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Mar;49(3):1150-6.
- Schweizer C, Bischoff P, Bender J, Kola A, Gastmeier P, Hummel M, Klefisch FR, Schoenrath F, Frühauf A, Pfeifer Y. Plasmid-Mediated Transmission of KPC-2 Carbapenemase in Enterobacteriaceae in Critically Ill Patients. *Front Microbiol.* 2019 Feb 19;10:276.
- Sheppard AE, Stoesser N, Wilson DJ, Sebra R, Kasarskis A, Anson LW, Giess A, Pankhurst LJ, Vaughan A, Grim CJ, Cox HL, Yeh AJ; Modernising Medical Microbiology(MMM) Informatics Group, Sifri CD, Walker AS, Peto TE, Crook DW, Mathers AJ. Nested russian doll-like genetic mobility drives rapid dissemination of the carbapenem resistance gene blaKPC. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:3767-78.
- Stoesser N, Sheppard AE, Shakya M, Sthapit B, Thorson S, Giess A, Kelly D, Pollard AJ, Peto TE, Walker AS, Crook DW 2015 Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Apr;70(4):1008-15.
- Turton JF, Engler H, Gabriel SN, Turton SE, Kaufmann ME, Pitt TL. Genetically similar isolates of *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 causing liver abscesses in three continents. *J Med Microbiol.* 2007 May;56(Pt 5):593-7.
- Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 2006 Jun;60(5):1136-51.
- Woksepp H, Ryberg A, Berglind L, Schön T, Söderman J. Epidemiological characterization of a nosocomial outbreak of extended spectrum  $\beta$ -lactamase *Escherichia coli* ST-131 confirms the clinical value of core genome multilocus sequence typing. *APMIS.* 2017 Dec;125(12):1117-1124.
- Yamamoto M, Matsumura Y, Gomi R, Matsuda T, Tanaka M, Nagao M, Takakura S, Uemoto S, Ichiyama S. Interspecies Dissemination of a Mobilizable Plasmid Harboring blaIMP-19 and the Possibility of Horizontal Gene Transfer in a Single Patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Aug 22;60(9):5412-9.

Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Jan;41(1):11-

**Supplementary table:** Strains isolated in hospital environment during outbreak

Strain's name	Species	MR-PCR genotype	Resistotype	Sites	Place	Ward	Sampling date
1	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Chair	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/23
2	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Stethoscope	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/23
3	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Infusion support	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/23
4	<i>E. cloacae</i>	B <sub>EC</sub>		Bedroom door handle	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/29
5	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Low flow faucet aerators	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/29
6	<i>K. pneumoniae</i>	G <sub>KP</sub>		Bed structure	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/05
7	<i>K. pneumoniae</i>	B <sub>KP</sub>	NDM-1	Nurse call remote control	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/05
8	<i>K. pneumoniae</i>	B <sub>KP</sub>	NDM-1	Night table	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/05
9	<i>K. pneumoniae</i>	B <sub>KP</sub>	NDM-1	Closet	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/05
10	<i>K. pneumoniae</i>	B <sub>KP</sub>	NDM-1	Armchair	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/05
11	<i>K. pneumoniae</i>	B <sub>KP</sub>	NDM-1	TV remote control	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/05
12	<i>K. pneumoniae</i>	B <sub>KP</sub>	NDM-1 and OXA-48	Serving table	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/05
13	<i>K. pneumoniae</i>	B <sub>KP</sub>	NDM-1	Bed structure	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/06
14	<i>K. pneumoniae</i>	G <sub>KP</sub>		Nurse call remote control	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/06
15	<i>K. pneumoniae</i>	B <sub>KP</sub>	NDM-1	Closet	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/06
16	<i>K. pneumoniae</i>	G <sub>KP</sub>		Infusion support	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/06
17	<i>K. pneumoniae</i>	B <sub>KP</sub>	NDM-1	TV remote control	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/06
18	<i>K. pneumoniae</i>	B <sub>KP</sub>	NDM-1	Sink trap	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/06
19	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Armchair	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/07/06
20	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Infusion support	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/23
21	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Bed structure	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/29
22	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Nurse call remote control	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/29
23	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Serving table	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/29
24	<i>A. baumannii</i>	A <sub>CAB</sub>	NDM-1	Armchair	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/29
25	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Chair	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/29
26	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Ventilator	Patient A' bedroom	Bruns unit	17/06/29
27	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Chair	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/21
28	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Stethoscope	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/23
29	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>		Sink trap	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/29
30	<i>E. cloacae</i>	B <sub>EC</sub>		Chair	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/06
31	<i>K. pneumoniae</i>	B <sub>KP</sub>	NDM-1	Bedroom door handle	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/06
32	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Bedroom door handle	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/21
33	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Bedroom door handle	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/21
34	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Bedroom door handle	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/23
35	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Bed structure	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/23
36	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Night table	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/23
37	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Closet	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/23
38	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Armchair	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/23
39	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Phone	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/23
40	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Sink	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/23

Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins

41	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Night table	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/29
42	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Closet	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/29
43	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Chair	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/29
44	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Chair	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/06/29
45	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Bed structure	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/05
46	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Nurse call remote control	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/05
47	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Serving table	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/05
48	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Chair	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/05
49	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1 and OXA-48	Stethoscope	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/05
50	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1 and OXA-48	Stethoscope	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/05
51	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Basin for toilet in bed	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/05
52	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Nurse call remote control	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/06
53	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Closet	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/06
54	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Basin for toilet in bed	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/06
55	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Phone	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/06
56	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Phone	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/06
57	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Sink	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/06
58	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Sink	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/06
59	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Infusion support	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/10
60	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Infusion support	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/10
61	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Sink	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/10
62	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Window crank handle	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/10
63	<i>A. baumannii</i>	B <sub>AB</sub>	NDM-1	Serving table	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/07/10
64	<i>A. baumannii</i>	C <sub>AB</sub>		Light switch on wall	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/12/20
65	<i>A. baumannii</i>	C <sub>AB</sub>		Bed structure	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/12/20
66	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Closet	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/12/20
67	<i>K. pneumoniae</i>	Ha <sub>KP</sub>		Sink	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/12/20
68	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Sink	Patient B' bedroom	Bruns unit	17/12/20
69	<i>A. baumannii</i>	Ad <sub>AB</sub>	NDM-1	Bedroom door handle	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
70	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Bed structure	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
71	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Serving table	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
72	<i>E. cloacae</i>	DEC	NDM-1	Armchair	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
73	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Bedroom door handle	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
74	<i>A. baumannii</i>	Ad <sub>AB</sub>	NDM-1	Paper dispenser	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
75	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Night table	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
76	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Water in toilet	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
77	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Shower screen	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
78	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Armchair	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
79	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Night table	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
80	<i>A. baumannii</i>	Aa <sub>AB</sub>	NDM-1	Paper dispenser	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
81	<i>A. baumannii</i>	Ad <sub>AB</sub>	NDM-1	TV remote control	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
82	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Chair	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
83	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Phone	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
84	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Table	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
85	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Sink	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
86	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Low flow faucet aerators	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
87	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Sink trap	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
88	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Wall shelf	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
89	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Toilet	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27

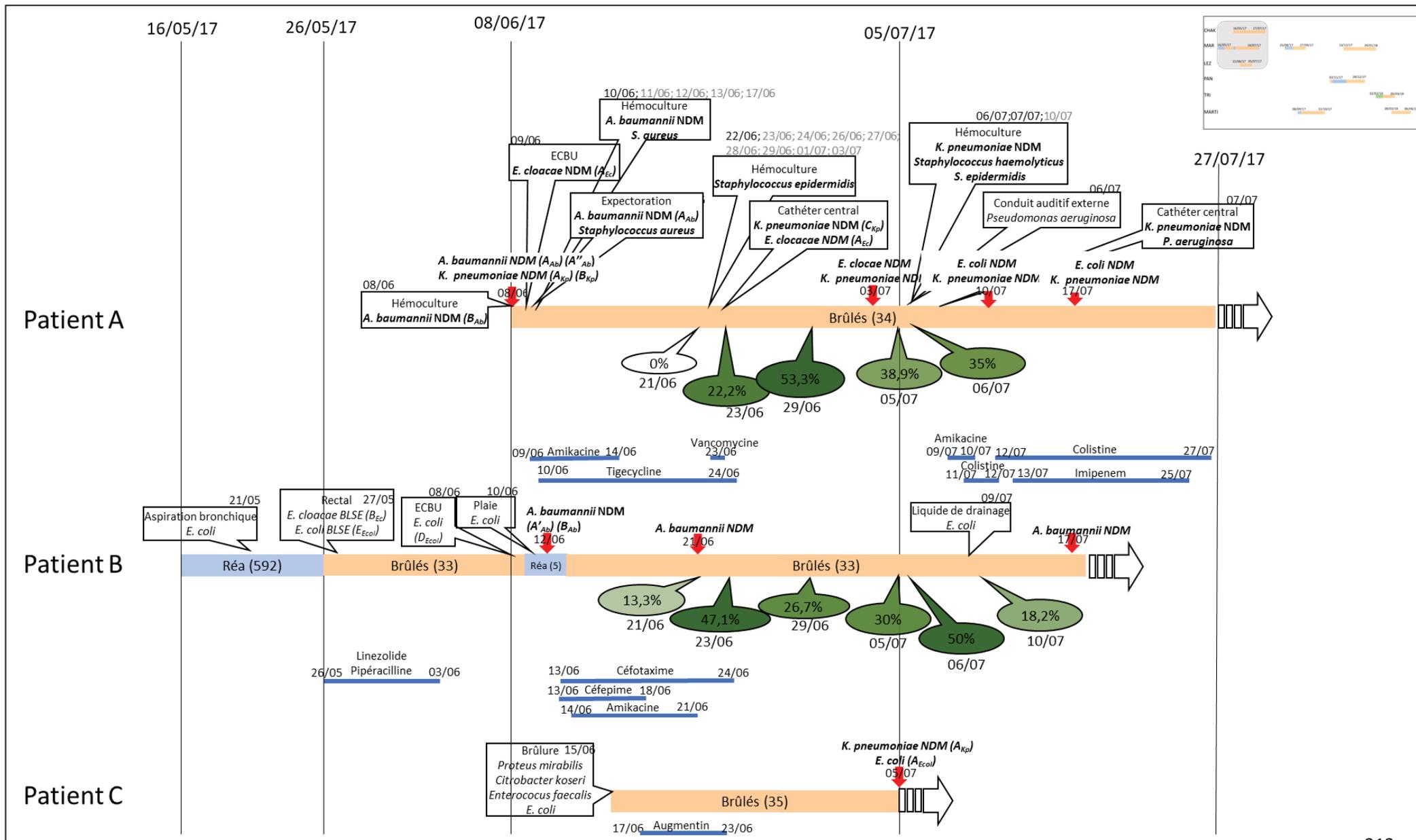
Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins

90	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Basin for toilet in bed	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/27
91	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Bed structure	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
92	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Bed hand control unit	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
93	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Nurse call remote control	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
94	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Table	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
95	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Closet	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
96	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Chair	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
97	<i>E. cloacae</i>	D <sub>EC</sub>	NDM-1	Stethoscope	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
98	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Phone	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
99	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	TV remote control	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
100	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Bedroom door handle	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
101	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Sink	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
102	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Toilet tissue holder	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
103	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Shower hand	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
104	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Shower screen	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
105	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Basin for toilet in bed	Patient E' bedroom	Bruns unit	18/02/28
106	<i>K. pneumoniae</i>	L <sub>KP</sub>		Sink	Patient F' bedroom	Bruns unit	18/04/06
107	<i>K. pneumoniae</i>	M <sub>KP</sub>		Sink trap	Patient F' bedroom	Bruns unit	18/04/06
108	<i>A. baumannii</i>	D <sub>AB</sub>		Serving table	Patient F' bedroom	Bruns unit	18/04/06
109	<i>E. coli</i>	F <sub>ECOL</sub>		Pillow	Bedroom 34 after intensive cleaning	Bruns unit	18/02/26
110	<i>E. cloacae</i>	A <sub>EC</sub>	NDM-1	Pillow	Bedroom 34 after intensive cleaning	Bruns unit	18/02/27
111	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Bed structure	Bedroom 34 after intensive cleaning	Bruns unit	18/02/26
112	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Bed hand control unit	Bedroom 34 after intensive cleaning	Bruns unit	18/02/26
113	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Patient's transfer board	Bedroom 34 after intensive cleaning	Bruns unit	18/02/26
114	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Sink	Bedroom 34 after intensive cleaning	Bruns unit	18/02/26
115	<i>A. baumannii</i>	A <sub>AB</sub>	NDM-1	Wall on the entrance outside of the room	Bedroom 34 after intensive cleaning	Bruns unit	18/02/26
116	<i>E. coli</i>	I <sub>ECOL</sub>		Sink trap	Bedroom 33	Bruns unit	17/12/26
117	<i>E. cloacae</i>	K <sub>EC</sub>		Sink trap	Bedroom 33	Bruns unit	17/12/20
118	<i>E. cloacae</i>	K <sub>EC</sub>		Sink trap	Bedroom 33	Bruns unit	17/12/20
119	<i>E. cloacae</i>	K <sub>EC</sub>		Sink trap	Bedroom 33	Bruns unit	17/12/20
120	<i>K. pneumoniae</i>	Ia <sub>KP</sub>		Sink trap	Bedroom 33	Bruns unit	17/12/20
121	<i>K. pneumoniae</i>	Ib <sub>KP</sub>		Sink trap	Bedroom 33	Bruns unit	17/12/20
122	<i>E. cloacae</i>	K <sub>EC</sub>		Sink trap	Bedroom 34	Bruns unit	17/12/20
123	<i>E. coli</i>	H <sub>ECOL</sub>		Sink trap	Bedroom 35	Bruns unit	17/12/20
124	<i>K. pneumoniae</i>	Ic <sub>KP</sub>		Sink trap	Bedroom 39	Bruns unit	17/12/20
125	<i>K. pneumoniae</i>	Ha <sub>KP</sub>		Sink trap	Bedroom 39	Bruns unit	17/12/20
126	<i>K. pneumoniae</i>	Hb <sub>KP</sub>		Sink trap	Bedroom 39	Bruns unit	17/12/20
127	<i>K. pneumoniae</i>	Hb <sub>KP</sub>		Sink trap	Bedroom 39	Bruns unit	17/12/20
128	<i>E. cloacae</i>	K <sub>EC</sub>		Sink trap	Nurse room	Bruns unit	17/12/20
129	<i>E. cloacae</i>	L <sub>EC</sub>		Sink trap	Nurse room	Bruns unit	17/12/26
130	<i>E. cloacae</i>	Mb <sub>EC</sub>		Stretcher	Hallway	Bruns unit	18/04/06
131	<i>E. cloacae</i>	Ma <sub>EC</sub>		Sink trap	Patient satellite kitchen	Bruns unit	18/04/06
132	<i>E. cloacae</i>	N <sub>EC</sub>		Sink	Patient satellite kitchen	Bruns unit	18/04/05
133	<i>K. pneumoniae</i>	N <sub>KP</sub>		Low flow faucet	Patient satellite	Bruns unit	18/02/22

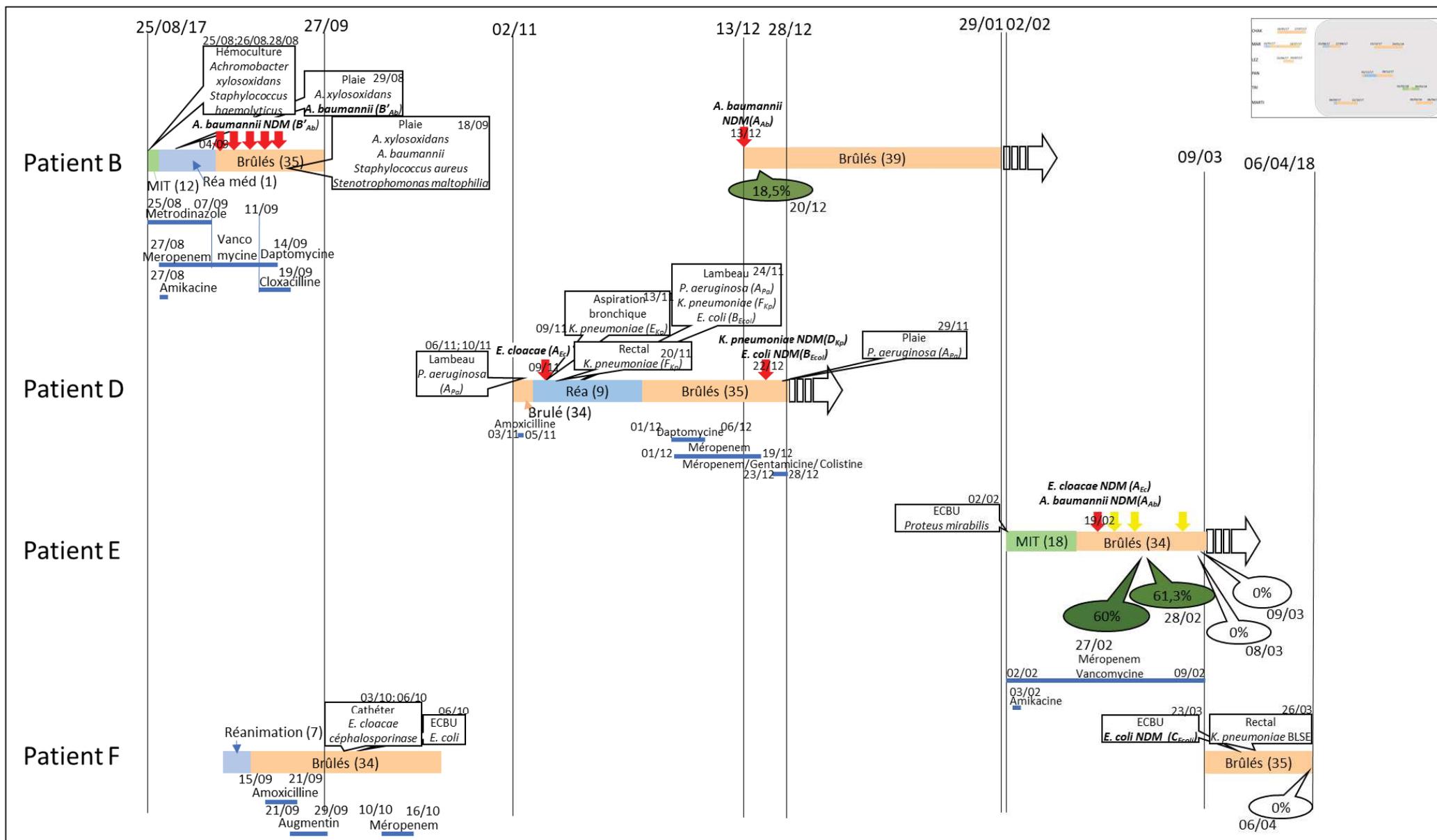
Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins

				aerators	kitchen		
134	<i>E. coli</i>	J <sub>ECOL</sub>		Shower trap	Shared bathroom	Bruns unit	18/04/03
135	<i>K. pneumoniae</i>	O <sub>KP</sub>		Shower trap	Shared bathroom	Bruns unit	18/04/03
136	<i>E. cloacae</i>	H <sub>EC</sub>		Nurse'phone		Bruns unit	18/04/05
137	<i>K. pneumoniae</i>	P <sub>KP</sub>		Closet	Storehouse	Orthopaedic unit	18/04/19
138	<i>E. cloacae</i>	I <sub>EC</sub>		Table	Bedroom 140	Wound and healing unit	18/04/18
139	<i>E. cloacae</i>	I <sub>EC</sub>		Light switch on wall	Bedroom 140	Wound and healing unit	18/04/18
140	<i>E. cloacae</i>	I <sub>EC</sub>		Paper dispenser	Bedroom 140	Wound and healing unit	18/04/18
141	<i>E. cloacae</i>	I <sub>EC</sub>		Bathroom grab rails	Bedroom 140	Wound and healing unit	18/04/18
142	<i>K. pneumoniae</i>	P <sub>KP</sub>		Sink	Storehouse	Wound and healing unit	18/04/16
143	<i>E. cloacae</i>	E <sub>EC</sub>		Sink	Storehouse	Wound and healing unit	18/04/16
144	<i>E. cloacae</i>	F <sub>EC</sub>		Sink	Housekeeping room	Wound and healing unit	18/04/16
145	<i>E. cloacae</i>	F <sub>EC</sub>		Water on cleaning trolley	Hallway	Wound and healing unit	18/04/16
146	<i>E. cloacae</i>	F <sub>EC</sub>		Food trolley	Hallway	Wound and healing unit	18/04/16
147	<i>E. cloacae</i>	F <sub>EC</sub>		Microwave	Hallway	Wound and healing unit	18/04/16
148	<i>E. coli</i>	K <sub>ECOL</sub>		Sink trap	Patient satellite kitchen	Wound and healing unit	18/04/17
149	<i>E. cloacae</i>	G <sub>EC</sub>		Sink trap	Patient satellite kitchen	Wound and healing unit	18/04/17

Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins



Partie II : Diffusion et persistance de bactéries d'origine humaine sur les surfaces des unités de soins

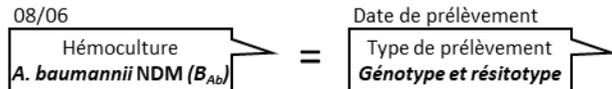


**Figure 19 :** Complément de l'article 5, courbe synoptique de l'épidémie

Brûlés (34) = Hospitalisation dans le service des brûlés ( n° de chambre)

Réa (592) = Hospitalisation dans le service de réanimation ( n° de chambre)

MIT (18) = Hospitalisation dans le service de maladies infectieuses et tropicales ( n° de chambre)



↓ = Présence d'une CPB dans un prélèvement rectal

↓ = Absence de CPB dans un prélèvement rectal

22,2%  
23/06 = Taux de contamination de la chambre par les espèces bactériennes colonisant/infectant le patient, date de prélèvement dans la chambre

09/06 Amikacine 14/06 = Traitement antibiotique

## Conclusion de la partie expérimentale 2

L'originalité de ce travail consiste en l'échantillonnage intensif des surfaces proches des patients. L'environnement hospitalier tient ici une place centrale alors qu'il est souvent considéré comme accessoire dans la plupart des publications traitant des IAS à BPC. Cette étude a permis d'apporter de nombreux éléments précisant le rôle de réservoir/relais de l'environnement hospitalier dans la diffusion des BPC en situations non-épidémiques et épidémiques. Nous confirmons ainsi, par une approche originale, les hypothèses de nombreuses publications récentes évoquant un rôle sous-estimé de l'environnement dans la diffusion des BPC (Vergara-Lopez et al, 2013) (Leitner et al, 2015) (Kizny Gordon et al, 2017) (Clarivet et al, 2016) (Carling, 2018) (Decraene et al, 2018).

Deuxième point essentiel, la prise en compte de la diversité des populations de BPC, aussi bien chez le patient que dans l'environnement, révèle la complexité de la circulation des BPC. Cette complexité ne doit pas être occultée si l'on souhaite mettre en place des interventions réalistes et efficaces pour limiter la diffusion des BPC et des résistances associées.

# Conclusion générale

### **Une stratégie originale pour évaluer la circulation des bactéries responsables d'IAS sur les surfaces de soins.**

Toute l'originalité de ce travail repose sur la stratégie d'étude qui a consisté dans un premier temps, en un travail d'observation avec le regard d'un expert en hygiène hospitalière, nécessitant une bonne connaissance du fonctionnement des services de soins et des routes possibles de transmission des agents pathogènes de l'environnement de soins aux patients. Cette observation a permis par la suite d'échantillonner de façon avisée puis de collectionner des souches environnementales recueillies sur le terrain, dans des services de soins en activité, et qui sont le reflet réel de la contamination des surfaces de soins lors d'une situation infectieuse ou épidémique dans un établissement de santé, ici le CHU de Montpellier. En plus lors de ce travail, pour chaque souche, des données clinico-éco-épidémiologiques ont été recueillies. Cette collection de souches isolées en conditions réelles est le socle de cette thèse et constitue toute son originalité. En effet la plupart des études se sont longtemps appuyées sur des souches de collections, et lorsque les souches sont isolées dans l'environnement de soins, la collection de souches n'a pas cette ampleur, ni ce détail d'informations clinico-éco-épidémiologiques. De plus, l'échantillonnage est essentiel aussi bien en termes de technique que de site de prélèvements (Rawlinson et *al.* 2019). La contamination réelle de l'environnement est difficile à évaluer et nécessite de nombreux prélèvements pour avoir une exhaustivité et une vision globale de la cartographie de la contamination des surfaces de soins. Ainsi, dans notre étude, nous avons au total réalisé 5329 prélèvements de surfaces de soins et 120 prélèvements d'eau, ce qui nous a permis de collectionner 567 souches. Cette collection de souches environnementales issues d'un échantillonnage de terrain permet par la suite de pouvoir tracer, au plus près des conditions réelles, les routes de transmission des bactéries responsables d'IAS.

### **Diversité microbienne et diffusion des agents responsables d'IAS**

La diversité microbienne correspond à trois niveaux qui en font toute sa complexité. Le premier niveau de diversité est la diversité des espèces au sein du microbiote et des communautés microbiennes. En effet, la conception classique d'une infection est basée sur le postulat de Koch, où l'agent infectieux est unique et virulent (Fredricks et *al.* 1996). Mais, ce concept ne peut être en accord avec les IAS car les pathogènes opportunistes n'ont pas obligatoirement une virulence caractéristique d'une pathologie. Ces pathogènes, souvent résistants aux antibiotiques et ayant un mode de vie commensal ou saprophyte, profitent de l'hôte affaibli pour engendrer une infection. Le statut immunitaire du patient est donc le facteur principal du développement de l'infection. De plus, la diversité des microorganismes et de leurs interactions est de plus en plus prise en considération dans la prise en charge d'une pathologie infectieuse grâce à un nombre croissant d'études sur le rôle du microbiote et des communautés microbiennes dans les processus infectieux (Wischmeyer et *al.* 2016).

Le second niveau de diversité correspond à la diversité des populations bactériennes au sein d'une même espèce, où des génotypes peuvent avoir des comportements bactériens différents, par exemple en termes de succès épidémique, de circulation ou de transmissibilité. Ce niveau de diversité permet ainsi d'identifier des populations émergentes ou présentant un succès particulier au sein d'une espèce. Ainsi, le succès de diffusion et de transmission dans le contexte des IAS peut alors dépendre de plusieurs caractéristiques des bactéries, dont certaines vont avoir un impact direct sur son pouvoir pathogène ou sur ses capacités à engendrer des épidémies. Par exemple, au sein de la population de *P. aeruginosa*, certains génotypes sont considérés les plus à risque de phénomènes épidémiques : les EHR (Slekovec et *al.* 2019). Comme autre exemple, dans la population de *E. coli*, certains génotypes comme le ST131 provoquent des infections sévères comme des bactériémies nosocomiales et communautaires et connaissent un succès de diffusion mondiale (Nicolas-Chanoine et *al.* 2014).

Le troisième niveau de diversité correspond à la diversité intra-population, où au sein des génotypes, il y a une hétérogénéité aussi bien génomique qu'adaptative. Par exemple, chez *P. aeruginosa*, au sein d'une population de génotype MLST, une grande diversité de génotypes MR-PCR pour le ST253 a été observée et correspond à des microévolutions génomiques

(Figure 13). Et, Abdouchakour, 2016 a observé une grande variabilité de comportement en termes de traits adaptatifs au sein de la population de ST308 de *P. aeruginosa*.

De plus, un niveau transversal de diversité correspondant à la résistance bactérienne aux antibiotiques se rajoute à ces 3 niveaux. En effet, ce niveau est considéré comme transversal, car au sein de chacun des 3 niveaux, des marqueurs de résistance sont transmissibles. Par exemple, pour les marqueurs de résistance aux antibiotiques, des gènes codant les carbapénémases ou des BLSE sont transmissibles par transfert horizontal de gènes d'une espèce bactérienne à l'autre, d'une population bactérienne à l'autre ou au sein d'une population bactérienne (article 5) » (Marchandin et *al.* 2000) (Potron et *al.* 2011) (Walsh et *al.* 2011) (Mathers et *al.* 2011) (Cavalié et *al.* 2016) (Da Silva et Domingues, 2016).

L'étude de ces différents niveaux de diversité au sein du « réservoir patient » se révèle complexe par plusieurs aspects. Par exemple chez les BPC : i) les patients peuvent être colonisés/infectés par une grande diversité d'espèces de BPC, et des échanges de plasmides contenant des gènes codant les carbapénémases sont possibles entre différentes espèces bactériennes au sein du tube digestif du patient (Huang et *al.* 2015a) ; ii) les patients peuvent être colonisés/infectés par une grande diversité des génotypes de la même espèce bactérienne, diffusant différemment dans l'environnement de soins (article 3, 4 et 5) ; iii) certains patients sont considérés comme des « super-spreader » qui sont définis comme des patients transmettant leurs microorganismes à un large nombre d'individus (James et *al.* 2007) et diffusant dans l'environnement plus de bactéries que les autres patients aussi porteurs/infectés par le même agent (Lerner et *al.* 2015).

Le cœur de ce travail a été d'étudier les réservoirs et la diffusion des microorganismes responsables d'IAS dans l'environnement de soins. Ce travail a mis en lumière que la diversité microbienne dans l'environnement de soins ne se cantonne pas au simple réservoir environnemental mais est plus vaste et concerne toute la dynamique de la circulation des agents responsables d'IAS sur les surfaces de soins. Ainsi, la persistance/circulation de microorganismes a été observée aussi bien en période non épidémique (Figure 14) (Figure 15) (Article 3) qu'épidémique (Article 5). Les différents niveaux de diversité, décrits précédemment, ont aussi été observés dans l'environnement de soins. Ainsi, une différence de comportement a été observée en termes de persistance/diffusion selon les espèces

bactériennes (Article 3), selon les populations bactériennes (Article 3) (Article 5) (Figure 15), et au sein des populations (Article 3) (Article 5). De plus, une grande diversité de résistotypes a été observée (Article 3 et 5).

### **Les relations entre l'environnement de soins et les patients : une étude rendue complexe par la diversité microbienne**

Les interactions entre l'environnement de soins et les patients rajoutent un niveau supplémentaire de diversité. Les patients ont leurs propres diversités microbiennes et sont exposés à leur environnement de soins, ce qui peut conduire à un risque infectieux ou de colonisation. De plus en plus d'auteurs démontrent ces relations de l'environnement au patient (Vonberg et al. 2011) (Garvey et al. 2018) (Coppry et al. 2019) ou du patient à l'environnement (Mitchell et al. 2015) (Cohen et al. 2017), mais la notion de diversité et de succès de transmission n'est souvent pas prise en compte. Pour autant, il est connu qu'au sein d'un réservoir environnemental de nombreuses interactions microbiennes ont lieu et qu'une riche diversité de microorganismes coexiste (Røder et al. 2019).

En considérant la diversité microbienne, des interactions entre l'environnement de soins et les patients ont pu être observées dans cette thèse. Par exemple, dans l'article 3, nous avons démontré que la majorité de souches de BPC isolées dans l'environnement proche des patients avait le même génotype et résistotype que les souches résistantes infectant/colonisant les patients. **Ainsi l'environnement proche des patients apparaît comme le miroir des BPC colonisant/infectant les patients.** Ceci a déjà été démontré pour les SARM et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Cassone et al. 2018). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que plus le nombre de sites (nez, bouche, aine, rectum) colonisés chez les patients par des SARM ou de ERV était important, plus l'environnement proche des patients était contaminé. Les auteurs ont aussi suggéré que prélever l'environnement de soins permettrait de mieux surveiller les cas de portage à SARM ou VRE (Cassone et al. 2018).

Notre travail apporte une notion supplémentaire, plus novatrice, en montrant que l'environnement de soins n'est pas seulement le miroir des microorganismes colonisant/infectant le patient mais est composé d'un répertoire supplémentaire de

population microbienne/génotypes/résistotypes (Article 3) (Article 5) (Figure 15). **Ainsi, l'environnement de soins expose les patients à toute une communauté bactérienne variée d'un point de vue génétique et phénotypique.**

Cette communauté doit ainsi être prise en compte dans les investigations épidémiques et dans la caractérisation du risque lié à l'environnement de soins. En exemple, la caractérisation des bactéries présentes dans les prélèvements réalisés dans l'environnement de soins proche des patients hospitalisés en même temps que des patients porteurs/infectés par des bactéries responsables d'IAS, indique le risque de diffusion de ces agents dans l'environnement de soins, prévient le risque d'exposition et prédit le risque de colonisations/infections de ces patients contacts.

#### **Intégrer la notion d'épidémie plasmique pour prendre en compte la diversité des modes de diffusion : cas particulier des BPC**

Selon les 100 recommandations pour la surveillance et la prévention des IN, une épidémie se définit comme "toute augmentation significative de la fréquence d'une maladie au-delà de ce qui est observé habituellement" dans une même unité spatio-temporelle (CTIN 1999). Cette définition est donc basée sur des critères épidémiologiques. D'un point de vue microbiologique, c'est l'augmentation du nombre de cas d'infections causées par une bactérie donnée. Dans l'article 5, nous avons pu démontrer que lors d'une épidémie de BPC, toutes les EPC étaient reliées par un même plasmide qui portait le gène *bla*<sub>NDM-1</sub> codant une carbapénémase. Nos résultats concordent avec d'autres études qui montrent que les gènes codant les carbapénémases sont majoritairement portés par des plasmides transférable entre différentes espèces d'entérobactéries (Walsh et al. 2011) (Cavalié et al. 2016) (Kopotsa et al. 2019) (Mathers et al. 2019). De plus, des « épidémies plasmidiques » avec transfert horizontal de plasmides portant des gènes codant une carbapénémase ont déjà été décrites entre différentes espèces d'entérobactéries (Mathers et al. 2011) (Conlan et al. 2014). Au vu de ces résultats, il semblerait judicieux de considérer que tous les patients hospitalisés dans la même unité spatio-temporelle, porteurs/infectés par une EPC produisant la même carbapénémase, toutes espèces d'entérobactéries confondues, sont potentiellement impliqués dans l'épidémie plasmidique. L'analyse moléculaire du plasmide incriminé permettra par la suite d'exclure éventuellement certains patients de l'épidémie.

Cette démarche pourrait être étendue à toutes les BPC. En effet, les transferts horizontaux de gènes codant les carbapénémases sont possibles au sein d'autres espèces de BGN, comme *A. baumannii* ou *P. aeruginosa* mais sont peu décrits dans la littérature. Par exemple, Huang et al. (2015b) ont décrit des transferts du gène *bla*<sub>NDM-1</sub> entre des souches d'*Acinetobacter* spp. Et Tanner et al. (2017) ont réalisé le transfert du gène *bla*<sub>NDM-1</sub> d'*E. coli* vers *A. baumannii* et *P. aeruginosa*. Pour *P. aeruginosa*, les gènes codant les carbapénémases ont été décrits sur des éléments génétiques mobiles comme des plasmides ou des intégrons (Pang et al. 2019). Mais, pour *A. baumannii*, un autre élément est à prendre en compte, c'est que les gènes codant les carbapénémases (*bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-40</sub> ou *bla*<sub>GES</sub>) peuvent être portés par des plasmides ou par le chromosome (Da Silva et Domingues, 2016). Donc lors d'une épidémie impliquant plusieurs BPC, avant de considérer *A. baumannii*, comme impliqué dans une épidémie plasmidique, cette particularité est à prendre en compte (article 5).

**Si on considère la diffusion des plasmides, la définition d'une épidémie peut alors être considérée comme une augmentation du nombre de cas d'infections dues à des bactéries portant le même phénotype de résistance quelle que soit leur espèce.**

### **L'environnement de soins et les patients : une unité de transmission d'agents responsables d'IAS**

Grâce à l'étude de la diversité, cœur de ce travail, le concept original d'unité de transmission a pu être mis en valeur en démontrant :

i) la diversité microbienne clinique et environnementale comme clef de la compréhension de la transmission des IAS ; ii) le rôle crucial de l'environnement hospitalier et particulièrement des surfaces de soins dans la diffusion des IAS, jouant ainsi le rôle de support à la circulation des agents, de réservoir et de source aux agents responsables d'IAS ; iii) l'analyse précise de l'environnement proche du patient permettant d'améliorer la description des populations et sous-populations bactériennes associées à ce patient. De ces trois constats, **afin de mieux comprendre et anticiper les transmissions croisées, un concept original peut être proposé : considérer le patient et son environnement comme une seule unité de transmission.** En effet, l'ensemble de la communauté bactérienne constituée des différentes espèces

bactériennes, des différentes populations d'une même espèce et des différents génotypes constitue une seule unité aussi bien en clinique que dans l'environnement. Et c'est cette unité qui peut être transmise du patient à l'environnement et/ou de l'environnement au patient.

Ce concept original d'unité de transmission qui considère le patient et son environnement d'hospitalisation comme une seule unité alors que le patient est classiquement considéré indépendamment de ce qui l'entoure, existe déjà à une échelle plus globale : il s'agit du concept « One-health » proposé par l'OMS, une démarche intégrée visant à coordonner les actions en santé humaine, santé animale et santé environnementale. Parmi les objectifs de l'OMS, la lutte contre l'antibiorésistance est prioritaire. Une approche One-Health de l'antibiorésistance permet une lutte globale intégrant les différents aspects de cette problématique plurifactorielle. A plus petite échelle, celle d'un hôpital ou d'un service de soins, le concept « d'unité de transmission », donne une évaluation plus juste du risque d'exposition en intégrant la diversité microbienne et l'ensemble des voies de transmission, qu'elles soient interhumaines (incluant les soignants) ou médiées par l'environnement. Nous avons appliqué le concept « One-health » à une approche pragmatique unissant le domaine de la santé humaine et la microbiologie de l'environnement à l'échelle d'un établissement pour améliorer les connaissances et la lutte contre les IAS.

# Bibliographie

- Abdouchakour F, Dupont C, Grau D, Aujoulat F, Mournetas P, Marchandin H, Parer S, Gibert P, Valcarcel J, Jumas-Bilak E. *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. clonal selection leads to successive waves of contamination of water in dental care units. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Nov;81(21):7509-24.
- Abdouchakour F. Réservoir environnemental, persistance et succès épidémiologique des populations de *Pseudomonas aeruginosa* dans un hôpital. Thèse de l'école doctorale GAIA et de l'unité de recherche « Pathogènes Hydriques Santé Environnements » UMR 5569 Montpellier. 2016 Avr
- Abdouchakour F, Aujoulat F, Licznar-Fajardo P, Marchandin H, Toubiana M, Parer S, Lotthé A, Jumas-Bilak E. Intraclonal variations of resistance and phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clone ST308: A key to success within a hospital? *Int J Med Microbiol*. 2018 Mar;308(2):279-289.
- AFS. Maitrise et contrôles d'environnement en stérilisation. 2005
- AFSSPS. Décision du 27 octobre 2010 définissant les règles de bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire. 2010.
- Ahn K, Hwang GY, Kim YK, Kim HY, Jeong HR, Hong JS, Uh Y. Nosocomial Outbreak Caused by NDM-5 and OXA-181 Carbapenemase Co-producing *Escherichia coli*. *Infect Chemother*. 2019 Jun;51(2):177-182.
- Ajao AO, Johnson JK, Harris AD, Zhan M, McGregor JC, Thom KA, Furuno JP. Risk of acquiring extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* from prior room occupants in the intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013 May;34(5):453-8.
- Alecrim RX, Taminato M, Belasco A, Longo MCB, Kusahara DM, Fram D. Strategies for preventing ventilator-associated pneumonia: an integrative review. *Rev Bras Enferm*. 2019 Mar-Apr;72(2):521-530.
- Almakki A, Maure A, Pantel A, Romano-Bertrand S, Masnou A, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Licznar-Fajardo P. NDM-5-producing *Escherichia coli* in an urban river in Montpellier, France. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Jul;50(1):123-124.
- Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J Biol Sci*. 2018 Mar;25(3):586-596.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 May 16;289(1036):321-31.
- Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Multidrug-Resistant Enterobacter cloacae Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Front Microbiol*. 2019 Jan 31;10:44.
- Aoki K, Harada S, Yahara K, Ishii Y, Motooka D, Nakamura S, Akeda Y, Iida T, Tomono K, Iwata S, Moriya K, Tateda K. Molecular Characterization of IMP-1-Producing Enterobacter cloacae Complex Isolates in Tokyo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Feb 23;62(3).
- Archibald LK, Corl A, Shah B, Schulte M, Arduino MJ, Agüero S, Fisher DJ, Stechenberg BW, Banerjee SN, Jarvis WR. *Serratia marcescens* outbreak associated with extrinsic contamination of 1% chlorxylenol soap. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997 Oct;18(10):704-9.

- Asai N, Sakanashi D, Suematsu H, Kato H, Hagihara M, Nishiyama N, Koizumi Y, Yamagishi Y, Mikamo H. The epidemiology and risk factor of carbapenem-resistant enterobacteriaceae colonization and infections: Case control study in a single institute in Japan. *J Infect Chemother*. 2018 Jul;24(7):505-509.
- Asai S, Umezawa K, Iwashita H, Ohshima T, Ohashi M, Sasaki M, Hayashi H, Matsui M, Shibayama K, Inokuchi S, Miyachi H. An outbreak of blaOXA-51-like- and blaOXA-66-positive *Acinetobacter baumannii* ST208 in the emergency intensive care unit. *J Med Microbiol*. 2014 Nov;63(Pt 11):1517-23.
- Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella Pneumonia*. StatPearls. 2019 Mar. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/> PubMed PMID: 30085546.
- Astagneau P, Desplaces N, Vincent V, Chicheportiche V, Botherel A, Maugat S, Lebasclé K, Léonard P, Desenclos J, Grosset J, Ziza J, Brückner G. *Mycobacterium xenopi* spinal infections after discovertebral surgery: investigation and screening of a large outbreak. *Lancet*. 2001 Sep 1;358(9283):747-51.
- Athamna A, Ofek I, Keisari Y, Markowitz S, Dutton GG, Sharon N. Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun*. 1991 May;59(5):1673-82.
- Baranovsky S, Parer S, Grau D, Jumas-Bilak E, Romano-Bertrand S. Sécurisation de l'environnement de patients porteurs de BHR. XXVIII<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française d'Hygiène Hospitalière, Nice 2017.
- Barbadoro P, Bruschi R, Martini E, Savini S, Gioia MG, Stoico R, Di Tondo E, D'Errico MM, Prospero E. Impact of laminar air flow on operating room contamination, and surgical wound infection rates in clean and contaminated surgery. *Eur J Surg Oncol*. 2016 Nov;42(11):1756-1758.
- Barna Z, Antmann K, Pászti J, Bánfi R, Kádár M, Szax A, Németh M, Szegő E, Vargha M. Infection control by point-of-use water filtration in an intensive care unit - a Hungarian case study. *J Water Health*. 2014 Dec;12(4):858-67.
- Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep;43(9):4382-90. Erratum in: *J Clin Microbiol*. 2007 Jun;45(6):2101.
- Beggs CB, Kerr KG, Snelling AM, Sleigh PA. *Acinetobacter* spp. and the Clinical Environment. *Indoor and Built Environment*, 2006 Feb;15(1), 19–24.
- Benkirate L, Legris I, Romano-Bertrand S, Jumas-Bilak E, Licznar-Fajardo P. Comportement imprévisible des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire hospitaliers : une seule analyse réglementaire annuelle est-elle informative ? *Hygiènes* 2019;27(3):133-138.
- Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*. 2008 Mar;153 Suppl1:S347-57.
- Berthelot P, Grattard F, Mahul P, Pain P, Jospé R, Venet C, Carricajo A, Aubert G, Ros A, Dumont A, Lucht F, Zéni F, Auboyer C, Bertrand JC, Pozzetto B. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med*. 2001 Mar;27(3):503-12.

- Bertrand X, Blasco G, Belle E, Boillot A, Capellier G, Talon D. [Pseudomonas aeruginosa epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2003 Jun;22(6):505-9.
- Bicking Kinsey C, Koirala S, Solomon B, Rosenberg J, Robinson BF, Neri A, Laufer Halpin A, Arduino MJ, Moulton-Meissner H, Noble-Wang J, Chea N, Gould CV. Pseudomonas aeruginosa Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit Attributed to Hospital Tap Water. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017 Jul;38(7):801-808.
- Birgand G, Johansson A, Szilagyi E, Lucet JC. Overcoming the obstacles of implementing infection prevention and control guidelines. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Dec;21(12):1067-71.
- Bischoff P, Kubilay NZ, Allegranzi B, Egger M, Gastmeier P. Effect of laminar airflow ventilation on surgical site infections: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. Mai 2017;17(5):553-61.
- Bogaerts P, Naas T, El Garch F, Cuzon G, Deplano A, Delaire T, Huang TD, Lissoir B, Nordmann P, Glupczynski Y. GES extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Acinetobacter baumannii isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Nov;54(11):4872-8.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):1-14.
- Bonnin RA, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clone, France. *Emerg Infect Dis*. 2013 May;19(5):822-3.
- Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jan;55(1):349-54.
- Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, Nordmann P. Dissemination of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1-producing Acinetobacter baumannii in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Sep;18(9):E362-5.
- Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, Westblade LF. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis*. 2018 Apr 3;66(8):1290-1297.
- Bosanquet DC, Jones CN, Gill N, Jarvis P, Lewis MH. Laminar flow reduces cases of surgical site infections in vascular patients. *Ann R Coll Surg Engl*. 2013; 1: 15-19.
- Bou G, Martínez-Beltrán J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Feb;44(2):428-32.
- Boudot E, Baranovsky S, Pantel A, Jumas-Bilak E, Lavigne JP, Mourlan C. Epidémie clonale à BHRe sur 4 ans, l'enquête environnementale a enfin payé! . XXX<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française d'Hygiène Hospitalière, Strasbourg 2019.
- Bouguenoun W, Bakour S, Bentorki AA, Al Bayssari C, Merad T, Rolain JM. Molecular epidemiology of environmental and clinical carbapenemase-producing Gram-negative bacilli from hospitals in Guelma, Algeria: Multiple genetic lineages and first report of OXA-48 in Enterobacter cloacae. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016 Dec;7:135-140.
- BPPH, Ministère de l'emploi et de la solidarité, ministère délégué à la santé. Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière. 2001.

- Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 2011 Aug;19(8):419-26.
- Brink AJ, Coetzee J, Clay CG, Sithole S, Richards GA, Poirel L, Nordmann P. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *J Clin Microbiol* 2012; 50:525-7.
- Brown S, Amyes S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jan;57(1):1-3.
- Brüggemann H, Migliorini LB, Sales RO, Koga PCM, Souza AV, Jensen A, Poehlein A, Brzuszkiewicz E, Doi AM, Pasternak J, Martino MDV, Severino P. Comparative Genomics of Nonoutbreak *Pseudomonas aeruginosa* Strains Underlines Genome Plasticity and Geographic Relatedness of the Global Clone ST235. *Genome Biol Evol.* 2018 Jul 1;10(7):1852-1857.
- Bures S, Fishbain JT, Uyehara CF, Parker JM, Berg BW. Computer keyboards and faucet handles as reservoirs of nosocomial pathogens in the intensive care unit. *Am J Infect Control.* 2000 Dec;28(6):465-71.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jun;39(6):1211-33.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):969-76.
- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Dec;56(12):6349-57.
- Cadot L, Bruguière H, Jumas-Bilak E, Didelot MN, Masnou A, de Barry G, Cambonie G, Parer S, Romano-Bertrand S. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak reveals incubators as pathogen reservoir in neonatal care center. *Eur J Pediatr.* 2019 Apr;178(4):505-513.
- Calfee DP. Recent advances in the understanding and management of *Klebsiella pneumoniae*. *F1000Res.* 2017 Sep 27;6:1760.
- Cardoso CL, Pereira HH, Zequim JC, Guilhermetti M. Effectiveness of hand-cleansing agents for removing *Acinetobacter baumannii* strain from contaminated hands. *Am J Infect Control.* 1999 Aug;27(4):327-31.
- Carling PC. Wastewater drains: epidemiology and interventions in 23 carbapenem-resistant organism outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2018 Aug;39(8):972-979.
- Cassone M, Mantey J, Perri MB, Gibson K, Lansing B, McNamara S, Patel PK, Cheng VCC, Walters MS, Stone ND, Zervos MJ, Mody L. Environmental Panels as a Proxy for Nursing Facility Patients With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Colonization. *Clin Infect Dis.* 2018 Aug 31;67(6):861-868.
- Catalano M, Quelle LS, Jeric PE, Di Martino A, Maimone SM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. *J Hosp Infect.* 1999 May;42(1):27-35.

- Cavalié L, Mantion B, Fayet O, Prère MF. blaNDM-1-positive *Citrobacter sedlakii*: emergence after horizontal gene transfer from *Klebsiella pneumoniae* in the human intestinal tract. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 May;47(5):411-3.
- CCLIN Sud-Ouest. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé Guide de bonnes pratiques. 2016.
- CDC. Isolation Precautions 1970.  
<https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/appendix/history.html>.
- Cervia JS, Farber B, Armellino D, Klocke J, Bayer RL, McAlister M, Stanchfield I, Canonica FP, Ortolano GA. Point-of-use water filtration reduces healthcare-associated infections in bone marrow transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2010 Jun;12(3):238-41.
- Cervia JS, Ortolano GA, Canonica FP. Hospital tap water: a reservoir of risk for healthcare-associated infection. *Infect Dis Clin Pract* 2008; 16 (6): 349–353.
- Chairat S, Ben Yahia H, Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Torres C, Ben Slama K. High prevalence of imipenem-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Burns Hospital in Tunisia: detection of a novel class 1 integron. *J Chemother*. 2019 May;31(3):120-126.  
*Chemother*. 2015 Jan;59(1):714-6.
- Chen S, Hu F, Xu X, Liu Y, Wu W, Zhu D, Wang H. High prevalence of KPC-2-type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 May;55(5):2493-4.
- Chen Y, Sun M, Wang M, Lu Y, Yan Z. Dissemination of IMP-6-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST244 in multiple cities in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Jul;33(7):1181-7.
- Chiotos K, Tamma PD, Flett KB, Naumann M, Karandikar MV, Bilker WB, Zaoutis T, Han JH Multicenter Study of the Risk Factors for Colonization or Infection with Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in Children. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Nov 22;61(12).
- Cholley P, Gbaguidi-Haore H, Bertrand X, Thouverez M, Plésiat P, Hocquet D, Talon D. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *J Hosp Infect*. 2010 Dec;76(4):316-9.
- Clarivet B, Grau D, Jumas-Bilak E, Jean-Pierre H, Pantel A, Parer S, Lotthé A. Persisting transmission of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* due to an environmental reservoir in a university hospital, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill*. 2016 Apr 28;21(17).
- Clark ST, Diaz Caballero J, Cheang M, Coburn B, Wang PW, Donaldson SL, Zhang Y, Liu M, Keshavjee S, Yau YC, Waters VJ, Elizabeth Tullis D, Guttman DS, Hwang DM. Phenotypic diversity within a *Pseudomonas aeruginosa* population infecting an adult with cystic fibrosis. *Sci Rep*. 2015 Jun 5;5:10932.
- Clarke BR, Ovchinnikova OG, Kelly SD, Williamson ML, Butler JE, Liu B, Wang L, Gou X, Follador R, Lowary TL, Whitfield C. Molecular basis for the structural diversity in serogroup O2-antigen polysaccharides in *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem*. 2018 Mar 30;293(13):4666-4679.
- Clermont O, Gordon D, Denamur E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology*. 2015 May;161(Pt 5):980-8.
- Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci (Basel)*. 2017 Dec 21;6(1).

- Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Feb;50(2):756-8.
- Cohen B, Cohen CC, Løyland B, Larson EL. Transmission of health care-associated infections from roommates and prior room occupants: a systematic review. *Clin Epidemiol*. 2017 May 23;9:297-310.
- Collier SA, Stockman LJ, Hicks LA, Garrison LE, Zhou FJ, Beach MJ. Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water. *Epidemiol Infect*. 2012 Nov;140(11):2003-13.
- Conlan S, Thomas PJ, Deming C, Park M, Lau AF, Dekker JP, Snitkin ES, Clark TA, Luong K, Song Y, Tsai YC, Boitano M, Dayal J, Brooks SY, Schmidt B, Young AC, Thomas JW, Bouffard GG, Blakesley RW; NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin JC, Korlach J, Henderson DK, Frank KM, Palmore TN, Segre JA. Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Sci Transl Med*. 2014 Sep 17;6(254):254ra126.
- Coppry M, Leroyer C, Saly M, Venier AG, Slekovec C, Bertrand X, Parer S, Alfandari S, Cambau E, Megarbane B, Lawrence C, Clair B, Lepape A, Cassier P, Trivier D, Boyer A, Boulestreau H, Asselineau J, Dubois V, Thiébaud R, Rogues AM. Exogenous acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: a prospective multicentre study, DYNAPYO study. *J Hosp Infect*. 2019 Aug 13
- Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill*. 2008 Nov 20;13(47). pii: 19044. Review. Erratum in: *Euro Surveill*. 2008 Nov 27;13(48).
- Costa D, Bousseau A, Thevenot S, Dufour X, Laland C, Burucoa C, Castel O. Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* associated with a drinking water fountain. *J Hosp Infect*. 2015 Nov;91(3):271-4.
- Cour des comptes. Rapport public annuel de la cour des comptes 2019. <https://www.ccomptes.fr/fr/publications/le-rapport-public-annuel-2019>.
- Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jan;8(1):26-38. doi: 10.1038/nrmicro2265. Review. Erratum in: *Nat Rev Microbiol*. 2013 Feb;11(2):141. PubMed PMID: 19966814.
- CTIN. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité. Secrétariat d'Etat à la Santé et à l'action sociale. Comité Technique des Infections Nosocomiales. 100 Recommandations pour la surveillance et la prévention des infections nosocomiales. 2ème édition, 1999. <http://www.sante.gouv.fr/htm/pointsur/nosoco/guide/sommaire.html>
- Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5644-9.
- Da Silva GJ, Domingues S. Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*. 2016 Aug 23;4(3).
- Dai Y, Zhang C, Ma X, Chang W, Hu S, Jia H, Huang J, Lu H, Li H, Zhou S, Qiu G, Liu J. Outbreak of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* neurosurgical site infections associated with a contaminated shaving razor used for preoperative scalp shaving. *Am J Infect Control*. 2014 Jul;42(7):805-6.

- Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P. AdelJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Feb;52(2):557-62.
- Dancer SJ, White LF, Lamb J, Girvan EK, Robertson C. Measuring the effect of enhanced cleaning in a UK hospital: a prospective cross-over study. *BMC Med* 2009;7:28.
- Dantas Palmeira J, Ferreira H, Madec JY, Haenni M. Pandemic *Escherichia coli* ST648 isolate harbouring *fosA3* and *bla*(CTX-M-8) on an *Incl1/ST113* plasmid: A new successful combination for the spread of fosfomycin resistance? *J Glob Antimicrob Resist*. 2018 Dec;15:254-255.
- Darch SE, McNally A, Harrison F, Corander J, Barr HL, Paszkiewicz K, Holden S, Fogarty A, Crusz SA, Diggle SP. Recombination is a key driver of genomic and phenotypic diversity in a *Pseudomonas aeruginosa* population during cystic fibrosis infection. *Sci Rep*. 2015 Jan 12;5:7649.
- Dautzenberg MJ, Haverkate MR, Bonten MJ, Bootsma MC. Epidemic potential of *Escherichia coli* ST131 and *Klebsiella pneumoniae* ST258: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2016 Mar 17;6(3):e009971.
- Davis RJ, Jensen SO, Van Hal S, Espedido B, Gordon A, Farhat R, Chan R. Whole Genome Sequencing in Real-Time Investigation and Management of a *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak on a Neonatal Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015 Sep;36(9):1058-64.
- de Abreu PM, Farias PG, Paiva GS, Almeida AM, Morais PV. Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard. *BMC Microbiol*. 2014 May 8;14:118.
- De Geyter D, Blommaert L, Verbraeken N, Sevenois M, Huyghens L, Martini H, Covens L, Piérard D, Wybo I. The sink as a potential source of transmission of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the intensive care unit. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Feb 16;6:24.
- de Oliveira AC, Damasceno QS. Surfaces of the hospital environment as possible deposits of resistant bacteria: a review. *Rev Esc Enferm USP*. 2010 Dec;44(4):1118-23.
- de Oliveira Santos IC, Pereira de Andrade NF, da Conceição Neto OC, da Costa BS, de Andrade Marques E, Rocha-de-Souza CM, Asensi MD, D'Alincourt Carvalho-Assef AP. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995-2015). *Infect Genet Evol*. 2019 Sep;73:411-415.
- de Toro M, Fernández J, García V, Mora A, Blanco J, de la Cruz F, Rodicio MR. Whole genome sequencing, molecular typing and in vivo virulence of OXA-48-producing *Escherichia coli* isolates including ST131 H30-Rx, H22 and H41 subclones. *Sci Rep*. 2017 Sep 21;7(1):12103.
- Decousser JW, Jansen C, Nordmann P, Emirian A, Bonnin RA, Anais L, Merle JC, Poirel L. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro Surveill*. 2013 Aug 1;18(31).
- Decraene V, Phan HTT, George R, Wyllie DH, Akinremi O, Aiken Z, Cleary P, Dodgson A, Pankhurst L, Crook DW, Lenney C, Walker AS, Woodford N, Sebra R, Fath-Ordoubadi F, Mathers AJ, Seale AC, Guiver M, McEwan A, Watts V, Welfare W, Stoesser N, Cawthorne J; TRACE Investigators' Group. A Large,

Refractory Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Demonstrates Carbapenemase Gene Outbreaks Involving Sink Sites Require Novel Approaches to Infection Control. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Nov 26;62(12).

Decré D. *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation. *RFL* 2012 Avr; n°441.

Décret n°88-657 du 6 mai 1988 relatif à l'organisation de la surveillance et de la prévention des infections nosocomiales dans les établissements d'hospitalisation publics et privés participant au service public hospitalier. 1988. 88-657.

DGOS. Programme national d'actions de prévention des infections associées aux soins - PROPIAS. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2019.

Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P. A. D., Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates *J Clin Microbiol*. 2005 Aug; 43(8): 4178–4182.

Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One*. 2010 Apr 7;5(4):e10034.

DiazGranados CA, Jones MY, Kongphet-Tran T, White N, Shapiro M, Wang YF, Ray SM, Blumberg HM. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contamination of a flexible bronchoscope. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009 Jun;30(6):550-5.

Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, Ursing J, Pitt TL. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol*. 1996 Jun;34(6):1519-25.

Directive n° 98/83/CE du 03/11/98 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation.

Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne JP. Epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed Res Int*. 2014;2014:305784.

Doi Y, Iovleva A, Bonomo RA. The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. *J Travel Med*. 2017 Apr 1;24(suppl\_1):S44-S51.

Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jan;44(1):196-9.

Donskey CJ. Does improving surface cleaning and disinfection reduce health care-associated infections? *Am J Infect Control* 2013;41:S12-S19.

Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis*. 2004 Jul 15;39(2):219-26.

Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ*. 2011;26(2):101-12.

- Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2015 Jul 8;6:660.
- Dupont C, Michon AL, Jumas-Bilak E, Nørskov-Lauritsen N, Chiron R, Marchandin H. Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of Cystic Fibrosis airways. *Infect Genet Evol*. 2015 Jun;32:214-23.
- EBMT. JACIE Standards 7th Edition Consultation Process 2018. <https://www.ebmt.org/jacie-standards-7th-edition-consultation-process>
- Ebrey R, Hamilton MS, Cairns G, et al. Biofilms and hospital-acquired infections. In: Ghannoum M, O'Toole GA, editor *Microbial Biofilms*. Washington DC: ASM Press 2004:294-313.
- ECDC. Point Prevalence Survey of Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals - ECDC PPS Validation Protocol Version 3.1.2. 2019.
- ECDC. Surveillance Atlas of Infectious Diseases 2017 <http://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>.
- Edmiston CE Jr, Seabrook GR, Cambria RA, Brown KR, Lewis BD, Sommers JR, Krepel CJ, Wilson PJ, Sinski S, Towne JB. Molecular epidemiology of microbial contamination in the operating room environment: is there a risk for infection? *Surgery*. 2005 Oct;138(4):573-9; discussion 579-82.
- El Shafie SS, Alishaq M, Leni Garcia M. Investigation of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in trauma intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2004 Feb;56(2):101-5.
- Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, Canton R, Doumith M, Giske C, Grundman H, Hasman H, Holden MTG, Hopkins KL, Iredell J, Kahlmeter G, Köser CU, MacGowan A, Mevius D, Mulvey M, Naas T, Peto T, Rolain JM, Samuelsen Ø, Woodford N. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Jan;23(1):2-22. doi: 10.1016/j.cmi.2016.11.012.
- Engelhart S, Krizek L, Glasmacher A, Fischnaller E, Marklein G, Exner M. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a haematology-oncology unit associated with contaminated surface cleaning equipment. *J Hosp Infect*. 2002 Oct;52(2):93-8.
- Espinasse F, Page B, Cottard-Boulle B. Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs, RFL 2010 Nov; n°426. Doi : RFL-11-2010-40-426-1773-035X-101019-201004646
- Estepa V, Rojo-Bezares B, Torres C, Sáenz Y. Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in healthy humans: antimicrobial susceptibility and global genetic lineages. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014 Jul;89(1):15-9.
- Evain S, Bourigault C, Juvin ME, Corvec S, Lepelletier D. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae digestive carriage at hospital readmission and the role of antibiotic exposure. *J Hosp Infect*. 2019 May;102(1):25-30.
- Evans BA, Amyes SG. OXA  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Apr;27(2):241-63.
- Exner M, Kramer A, Lajoie L, Gebel J, Engelhart S, Hartemann P. Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. *Am J Infect Control*. 2005 Jun;33(5 Suppl 1):S26-40.

- Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched-cohort and case-control studies. *Crit Care*. 2006;10(2):R48.
- Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2006 Dec;55(Pt 12):1619-29.
- Falkinham JO. Common features of opportunistic premise plumbing pathogens. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Apr 24;12(5):4533-45.
- Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med*. 2004 Mar 1;199(5):697-705.
- Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Mar;51(3):565-74.
- Ferng YH, Clock SA, Wong-McCloughlin J, DeLaMora PA, Perlman JM, Gray KS, Paul DA, Prasad PA, Zaoutis TE, Alba LR, Whittier S, Larson EL, Saiman L. Multicenter Study of Hand Carriage of Potential Pathogens by Neonatal ICU Healthcare Personnel. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2015 Sep;4(3):276-9.
- Forde C, Stierman B, Ramon-Pardo P, Dos Santos T, Singh N. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Barbados: Driving change in practice at the national level. *PLoS One*. 2017 May 25;12(5):e0176779.
- Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis*. 2006 Mar 1;42(5):692-9. (a)
- Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie JM. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet*. 2006 Jan;2(1):e7. (b)
- Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med*. 1977 Dec 1;297(22):1189-97.
- Fredricks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Jan;9(1):18-33.
- French CE, Coope C, Conway L, Higgins JP, McCulloch J, Okoli G, Patel BC, Oliver I. Control of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae outbreaks in acute settings: an evidence review. *J Hosp Infect*. 2017 Jan;95(1):3-45.
- Friedman ND, Carmeli Y, Walton AL, Schwaber MJ. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Strategic Roadmap for Infection Control. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017 May;38(5):580-594. Erratum in: *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017 Sep;38(9):1136.
- Friedrich AW. Control of hospital acquired infections and antimicrobial resistance in Europe: the way to go. *Wien Med Wochenschr*. 2019 Feb;169(Suppl1):25-30.

- Gartzonika K, Rossen JWA, Sakkas H, Rosema S, Priavali E, Friedrich AW, Levidiotou S, Bathoorn E. Identification of a KPC-9-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 cluster among KPC-2-producing isolates of an ongoing outbreak in Northwestern Greece: a retrospective study. *Clin Microbiol Infect*. 2018 May;24(5):558-560.
- Garvey MI, Bradley CW, Holden E. Waterborne *Pseudomonas aeruginosa* transmission in a hematology unit? *Am J Infect Control*. 2018 Apr;46(4):383-386.
- Garvey MI, Bradley CW, Jumaa P. The risks of contamination from tap end filters. *J Hosp Infect*. 2016 Nov;94(3):282-283.
- Garvey MI, Wilkinson MAC, Holden KL, Martin T, Parkes J, Holden E. Tap out: reducing waterborne *Pseudomonas aeruginosa* transmission in an intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2019 May;102(1):75-81.
- Garza-Ramos U, Barrios H, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A, Tamayo-Legorreta E, Ibarra-Pacheco A, Salazar-Salinas J, Núñez-Ceballos R, Silva-Sanchez J. Characteristics of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates from outbreaks in 2 Mexican medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;79:483–5.
- Gaston MA, Bucher C, Pitt TL. O serotyping scheme for *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol*. 1983 Nov;18(5):1079-83.
- Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Martínez de Ilarduya O, Bou G. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res*. 2014 Feb 7;13(2):460-76.
- Gbaguidi-Haore H, Talon D, Hocquet D, Bertrand X. Hospital environmental contamination with Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Am J Infect Control*. 2013 Jul;41(7):664-5.
- Gellen-Dautremer J. Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa*: *Mise au point*. *Antibiotiques*. 2010, Jun ; 12(2), 75–81.
- Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jun;48(6):2043-8.
- Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrasević A, Canton R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Donker T, Monnet DL, Grundmann H; European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill*. 2013 Jul 11;18(28). pii: 20525. Erratum in: *Euro Surveill*. 2013;18. pii: 20575. *Euro Surveill*. 2014;19(47): pii=20972.
- Gomez-Simmonds A, Annavajhala MK, Wang Z, Macesic N, Hu Y, Giddins MJ, O'Malley A, Toussaint NC, Whittier S, Torres VJ, Uhlemann AC. Genomic and Geographic Context for the Evolution of High Risk Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Clones ST171 and ST78. *MBio*. 2018 May 29;9(3).
- Gómez-Zorrilla S, Camoez M, Tubau F, Cañizares R, Periche E, Dominguez MA, Ariza J, Peña C. Prospective observational study of prior rectal colonization status as a predictor for subsequent development of *Pseudomonas aeruginosa* clinical infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Sep;59(9):5213-9.

- Goodman ER, Platt R, Bass R, Onderdonk AB, Yokoe DS, Huang SS. Impact of an environmental cleaning intervention on the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci on surfaces in intensive care unit rooms. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008 Jul;29(7):593-9.
- Gray JW. Cleaning up after carbapenemase-producing organisms. *J Hosp Infect*. 2016 Jun;93(2):135.
- Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, Cantón R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Monnet DL; European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis*. 2017 Feb;17(2):153-163.
- Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y; CNSE Working Group. Carbapenem-non susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill*. 2010 Nov 18;15(46). Erratum in: *Euro Surveill*. 2010 Nov 25;15(47)
- Guet-Revillet H, Le Monnier A, Breton N, Descamps P, Lecuyer H, Alaabouche I, Bureau C, Nassif X, Zahar JR. Environmental contamination with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: is there any difference between *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp? *Am J Infect Control*. 2012 Nov;40(9):845-8.
- Guimarães T, Chimara E, do Prado GV, Ferrazoli L, Carvalho NG, Simeão FC, de Souza AR, Costa CA, Viana Niero C, Brianesi UA, di Gioia TR, Gomes LM, Spadão FS, Silva MD, de Moura EG, Levin AS. Pseudo-outbreak of rapidly growing mycobacteria due to *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* in a digestive and respiratory endoscopy unit caused by the same clone as that of a countrywide outbreak. *Am J Infect Control*. 2016 Nov 1;44(11):e221-e226.
- Habboush Y et Guzman N. *Infection Control* ». StatPearls 2018  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519017/>.
- Haciseyitoglu D, Dokutan A, Abulaila A, Erdem F, Cag Y, Ozer S, Aktas Z. The First Enterobacter cloacae Co-Producing NDM and OXA-48 Carbapenemases and Interhospital Spread of OXA-48 and NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *Clin Lab*. 2017 Jul 1;63(7):1213-1222.
- Halabi M, Wiesholzer-Pittl M, Schöberl J, Mittermayer H. Non-touch fittings in hospitals: a possible source of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella* spp. *J Hosp Infect*. 2001 Oct;49(2):117-21.
- Haley RW, Morgan WM, Culver DH, White JW, Emori TG, Mosser J, Hughes JM. Update from the SENIC project. Hospital infection control: recent progress and opportunities under prospective payment. *Am J Infect Control*. 1985 Jun;13(3):97-108.
- Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SG. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of bla(OXA-51-like) genes. *J Clin Microbiol*. 2010 Jul;48(7):2476-83.

- Han R, Perepelov AV, Wang Y, Filatov AV, Wang M, Shashkov AS, Wang L, Knirel YA. Structural and genetic characterization of the O-antigen of *Enterobacter cloacae* C5529 related to the O-antigen of *E. cloacae* G3054. *Carbohydr Res*. 2017 Apr ; (18) : 443-444:49-52.
- Hancock RE, Brinkman FS. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:17-38.
- Hans M, Mathews S, Mücklich F, Solioz M. Physicochemical properties of copper important for its antibacterial activity and development of a unified model. *Biointerphases*. 2015 Mar 16;11(1):018902.
- Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010 Aug;59(3):253-68.
- Harris AD, Jackson SS, Robinson G, Pineles L, Leekha S, Thom KA, Wang Y, Doll M, Pettigrew MM, Johnson JK. *Pseudomonas aeruginosa* Colonization in the Intensive Care Unit: Prevalence, Risk Factors, and Clinical Outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016 May;37(5):544-8.
- Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit Care*. 2017 Aug 14;21(1):211.
- Havill NL, Boyce JM, Otter J. Extended survival of carbapenemresistant Enterobacteriaceae on dry surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014 Apr;35(4):445-7.
- HCSP. Prévention de la transmission croisée des BHRé. 2013
- Hedin G, Rynbäck J, Loré B. New technique to take samples from environmental surfaces using flocked nylon swabs. *J Hosp Infect*. 2010 Aug;75(4):314-7.
- Héritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Oct;49(10):4174-9.
- Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAb1 in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Feb;12(2):123-30.
- Hishinuma T, Tada T, Kuwahara-Arai K, Yamamoto N, Shimojima M, Kirikae T. Spread of GES-5 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan due to clonal expansion of ST235. *PLoS One*. 2018 Nov 19;13(11):e0207134.
- Hoang S, Georget A, Asselineau J, Venier AG, Leroyer C, Rogues AM, Thiébaud R. Risk factors for colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units in France. *PLoS One*. 2018 Mar 9;13(3):e0193300.
- Hojabri Z, Mirmohammadkhani M, Kamali F, Ghassemi K, Taghavipour S, Pajand O. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30/H30-Rx subclones recovered from extra-intestinal infections: first report of OXA-48 producing ST131 clone from Iran. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Oct;36(10):1859-1866.
- Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, Jenney A, Connor TR, Hsu LY, Severin J, Brisse S, Cao H, Wilksch J, Gorrie C, Schultz MB, Edwards DJ, Nguyen KV, Nguyen TV, Dao TT, Mensink

- M, Minh VL, Nhu NT, Schultsz C, Kuntaman K, Newton PN, Moore CE, Strugnell RA, Thomson NR. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 7;112(27):E3574-81.
- Hornsey M, Loman N, Wareham DW, Ellington MJ, Pallen MJ, Turton JF, Underwood A, Gaulton T, Thomas CP, Doumith M, Livermore DM, Woodford N. Whole-genome comparison of two *Acinetobacter baumannii* isolates from a single patient, where resistance developed during tigecycline therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jul;66(7):1499-503.
- Huang TW, Lauderdale TL, Liao TL, Hsu MC, Chang FY, Chang SC, Khong WX, Ng OT, Chen YT, Kuo SC, Chen TL, Mu JJ, Tsai SF. Effective transfer of a 47 kb NDM-1-positive plasmid among *Acinetobacter* species. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Oct;70(10):2734-8. (b)
- Huang YM, Zhong LL, Zhang XF, Hu HT, Li YQ, Yang XR, Feng LQ, Huang X, Tian GB. NDM-1-Producing *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, and *Acinetobacter baumannii* Identified from a Single Patient in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Aug;59(8):5073-7.(a)
- Humphreys H, Coleman DC. Contribution of whole-genome sequencing to understanding of the epidemiology and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*. 2019 Jun;102(2):189-199.
- Inserm. Infections nosocomiales. Inserm - La science pour la santé. 2015.  
<https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/infections-nosocomiales>.
- INVS. Surveillance des bactéries multiresistantes dans les établissements de santé en France. 2018.  
<http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2018/Surveillance-des-bacteries-multiresistantes-dans-les-etablissements-de-sante-en-France>.
- Izdebski R, Baraniak A, Herda M, Fiett J, Bonten MJ, Carmeli Y, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Gniadkowski M; MOSAR WP2, WP3 and WP5 Study Groups. MLST reveals potentially high risk international clones of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jan;70(1):48-56.
- James A, Pitchford JW, Plank MJ. An event-based model of superspreading in epidemics. *Proc Biol Sci* 2007;274:741-7.
- Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol*. 2017 Sep;123(3):570-581.
- Jeanvoine A, Meunier A, Puja H, Bertrand X, Valot B, Hocquet D. Contamination of a hospital plumbing system by persister cells of a copper-tolerant high-risk clone of *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Res*. 2019 Jun 15;157:579-586.
- Johnson JK, Smith G, Lee MS, Venezia RA, Stine OC, Nataro JP, Hsiao W, Harris AD. The role of patient-to-patient transmission in the acquisition of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization in the intensive care unit. *J Infect Dis*. 2009 Sep 15;200(6):900-5.
- June CM, Muckenthaler TJ, Schroder EC, Klamer ZL, Wawrzak Z, Powers RA, Szarecka A, Leonard DA. The structure of a doripenem-bound OXA-51 class D  $\beta$ -lactamase variant with enhanced carbapenemase activity. *Protein Sci*. 2016 Dec;25(12):2152-2163.

- Jung J, Park W. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Mar;99(6):2533-48.
- Jutte PC, Traversari RA, Walenkamp GH. Laminar flow: the better choice in orthopaedic implants. *Lancet Infect Dis*. juill 2017;17(7):695-6.
- Kaier K, Frank U, Hagist C, Conrad A, Meyer E. The impact of antimicrobial drug consumption and alcohol-based hand rub use on the emergence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains: a time-series analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Mar;63(3):609-14.
- Kanamori H, Rutala WA, Weber DJ. The Role of Patient Care Items as a Fomite in Healthcare-Associated Outbreaks and Infection Prevention. *Clin Infect Dis*. 2017 Oct 15;65(8):1412-1419.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):123-40.
- Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis*. 2008 Dec;8(12):751-62.
- Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat*. 2012 Aug;15(4):237-47.
- Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol*. 2005 Oct;295(6-7):405-18.
- Kauffmann F. The serology of the coli group. *J Immunol*. 1947 Sep;57(1):71-100.
- Kaye KS, Pogue JM. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. *Pharmacotherapy*. 2015 Oct;35(10):949-62.
- Keith JW, Pamer EG. Enlisting commensal microbes to resist antibiotic-resistant pathogens. *J Exp Med*. 2019 Jan 7;216(1):10-19.
- Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Feb;39(2):105-14.
- Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect*. 2009 Dec;73(4):338-44.
- Khalifa A B H, Moissenet D, Thien HV, Khedher M. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. *Annales de Biologie Clinique* 2011 juil 69 (4): 393-403.
- Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol*. 2017 Apr 27;17(1):101.
- Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases and AAC(6')-Iae in Japan. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Jun;39(6):518-21.
- Kizny Gordon AE, Mathers AJ, Cheong EYL, Gottlieb T, Kotay S, Walker AS, Peto TEA, Crook DW, Stoesser N. The Hospital Water Environment as a Reservoir for Carbapenem-Resistant Organisms Causing

- Hospital-Acquired Infections-A Systematic Review of the Literature. *Clin Infect Dis*. 2017 May 15;64(10):1435-1444. Review. Erratum in: *Clin Infect Dis*. 2017 Oct15;65(8):1431-1433
- Kluytmans-van den Bergh MFQ, van Mens SP, Haverkate MR, Bootsma MCJ, Kluytmans JAJW, Bonten MJM; SoM Study Group and the R-GNOSIS Study Group. Quantifying Hospital-Acquired Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Among Patients in Dutch Hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018 Jan;39(1):32-39.
- Koh TH, Babini GS, Woodford N, Sng LH, Hall LM, Livermore DM. Carbapenem-hydrolysing IMP-1 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. *Lancet*. 1999 Jun 19;353(9170):2162.
- Koh TH, Cao D, Shan QY, Bacon A, Hsu LY, Ooi EE. Acquired carbapenemases in Enterobacteriaceae in Singapore, 1996-2012. *Pathology*. 2013 Oct;45(6):600-3.
- Köhler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol*. 2011 Dec;301(8):642-7.
- Kolayli F, Gacar G, Karadenizli A, Sanic A, Vahaboglu H; Study Group. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Aug 15;249(2):241-5.
- Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *Ann N Y Acad Sci*. 2019 Aug 30.
- Kotay S, Chai W, Guilford W, Barry K, Mathers AJ. Spread from the Sink to the Patient: In Situ Study Using Green Fluorescent Protein (GFP)-Expressing *Escherichia coli* To Model Bacterial Dispersion from Hand-Washing Sink-Trap Reservoirs. *Appl Environ Microbiol*. 2017 Mar 31;83(8).
- Koutsogiannou M, Drougka E, Liakopoulos A, Jelastopulu E, Petinaki E, Anastassiou ED, Spiliopoulou I, Christofidou M. Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a university hospital. *J Clin Microbiol*. 2013 Feb;51(2):665-8.
- Kovaleva J. Infectious complications in gastrointestinal endoscopy and their prevention. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2016 Oct;30(5):689-704.
- Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006 Aug 16;6:130.
- Kumarage J, Khonyongwa K, Khan A, Desai N, Hoffman P, Taori SK. Transmission of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* between two flexible ureteroscopes and an outbreak of urinary tract infection: the fragility of endoscope decontamination. *J Hosp Infect*. 2019 May;102(1):89-94.
- Kurcik-Trajkowska B. *Acinetobacter* Spp. - A Serious Enemy Threatening Hospitals Worldwide. *Maced J Med Sci* 2009 Jun 15; 2 (2): 157-162.
- Lanini S, D'Arezzo S, Puro V, Martini L, Imperi F, Piselli P, Montanaro M, Paoletti S, Visca P, Ippolito G. Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser. *PLoS One*. 2011 Feb 16;6(2):e17064.
- Lanjri S, Uwingabiye J, Frikh M, Abdellatifi L, Kasouati J, Maleb A, Bait A, Lemnouer A, Elouennass M. In vitro evaluation of the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates to antiseptics and disinfectants:

- comparison between clinical and environmental isolates. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Apr 11;6:36.
- Larson EL. Persistent carriage of gram-negative bacteria on hands. *Am J Infect Control*. 1981 Nov;9(4):112-9.
- Laurens C, Jean-Pierre H, Licznar-Fajardo P, Hantova S, Godreuil S, Martinez O, Jumas-Bilak E. Transmission of IMI-2 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from river water to human. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018 Dec;15:88-92.
- Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jul;43(7):1584-90.
- Lavenir R, Sanroma M, Gibert S, Crouzet O, Laurent F, Kravtsoff J, Mazoyer MA, Cournoyer B. Spatiotemporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. *J Appl Microbiol*. 2008 Nov;105(5):1491-501.
- Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol*. 2016 Jun 13;7:895.
- Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Med J*. 2011 Nov;52(6):879-91.
- Lefebvre A, Bertrand X, Quantin C, Vanhems P, Lucet JC, Nuemi G, Astruc K, Chavanet P, Aho-Glélé LS. Association between *Pseudomonas aeruginosa* positive water samples and healthcare-associated cases: nine-year study at one university hospital. *J Hosp Infect*. 2017 Jul;96(3):238-243.
- Leitner E, Zarfel G, Luxner J, Herzog K, Pekard-Amenitsch S, Hoenigl M, Valentin T, Feierl G, Grisold AJ, Högenauer C, Sill H, Krause R, Zollner-Schwetz I. Contaminated handwashing sinks as the source of a clonal outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* on a hematology ward. *Antimicrob Agents*. 2015 Jan;59(1):714-6.
- Lemmen SW, Häfner H, Zolldann D, Stanzel S, Lütticken R. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *J Hosp Infect*. 2004 Mar;56(3):191-7.
- Lepelletier D, Berthelot P, Lucet JC, Fournier S, Jarlier V, Grandbastien B; National Working Group. French recommendations for the prevention of 'emerging extensively drug-resistant bacteria' (eXDR) cross-transmission. *J Hosp Infect*. 2015 Jul;90(3):186-95.
- Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Cohen Percia S, Kazma Matalon M, Carmeli Y. Spread of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the importance of super-spreaders and rectal KPC concentration. *Clin Microbiol Infect*. 2015 May;21(5):470.e1-7.
- Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Meitus I, Navon-Venezia S, Carmeli Y. Environmental contamination by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2013 Jan;51(1):177-81.
- Li QF, Xu H, Ni XP, Lin R, Jin H, Wei LY, Liu D, Shen LH, Zha J, Xu XF, Wu B. Impact of relocation and environmental cleaning on reducing the incidence of healthcare-associated infection in NICU. *World J Pediatr*. 2017 Jun;13(3):217-221.

- Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos AP, Mevius D, Peixe L, Poirel L, Schuepbach-Regula G, Torneke K, Torren-Edo J, Torres C, Threlfall J. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin Infect Dis*. 2013 Apr;56(7):1030-7.
- Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec;40(12):4776-8.
- Lister J. On the Antiseptic Principle in the Practice of Surgery. *Br Med J*. 1867 Sep 21;2(351):246-8.
- Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Feb;59(2):165-74.
- Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis*. 2017 Feb 15;215(suppl\_1):S28-S36.
- Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol*. 2014 Apr;37(2):119-27.
- Loveday HP, Wilson JA, Kerr K, Pitchers R, Walker JT, Browne J. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. *J Hosp Infect*. 2014 Jan;86(1):7-15.
- Lucet JC, Birgand G. Les bacilles à Gram négatif multi-résistants : où va-t-on ? . Jun 2011 *Journal des Anti-Infectieux* 13(2) : 122-132 .
- Lucet JC, Decré D, Fichelle A, Joly-Guillou ML, Pernet M, Deblangy C, Kosmann MJ, Régnier B. Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in a university hospital. *Clin Infect Dis*. 1999 Dec;29(6):1411-8.
- Lupo A, Haenni M, Madec JY. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiol Spectr*. 2018 Jun;6(3).
- Lutgring J D. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Emerging Bacterial Threat. *Semin Diagn Pathol*. 2019 May;36(3):182-186.
- Lutgring JD, Zhu W, de Man TJB, Avillan JJ, Anderson KF, Lonsway DR, Rowe LA, Batra D, Rasheed JK, Limbago BM. Phenotypic and Genotypic Characterization of Enterobacteriaceae Producing Oxacillinase-48-Like Carbapenemases, United States. *Emerg Infect Dis*. 2018 Apr;24(4):700-709. Erratum in: *Emerg Infect Dis*. 2018 Sep;24(9):1773.
- Lutz BD, Jin J, Rinaldi MG, Wickes BL, Huycke MM. Outbreak of invasive *Aspergillus* infection in surgical patients, associated with a contaminated air-handling system. *Clin Infect Dis*. 2003 Sep 15;37(6):786-93.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*. 2000 Jul;2(9):1051-60.

- Machado J, Grimont F, Grimont PA. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Res Microbiol*. 2000 Sep;151(7):535-46.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):268-81.
- Magiorakos AP, Burns K, Rodríguez Baño J, Borg M, Daikos G, Dumpis U, Lucet JC, Moro ML, Tacconelli E, Simonsen GS, Szilágyi E, Voss A, Weber JT. Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae into healthcare settings: guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Nov 15;6:113.
- Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug resistant acinetobacter. *J Glob Infect Dis*. 2010 Sep;2(3):291-304.
- Manian FA, Griesenauer S, Senkel D, Setzer JM, Doll SA, Perry AM, Wiechens M. Isolation of *Acinetobacter baumannii* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from hospital rooms following terminal cleaning and disinfection: can we do better? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011 Jul;32(7):667-72.
- Mann R, Mediati DG, Duggin IG, Harry EJ, Bottomley AL. Metabolic Adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Jun 8;7:241.
- Marchandin H, Jean-Pierre H, De Champs C, Sirot D, Darbas H, Perigault PF, Carriere C. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jan;44(1):213-6.
- Mathers AJ, Cox HL, Kitchel B, Bonatti H, Brassinga AK, Carroll J, Scheld WM, Hazen KC, Sifri CD. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant enterobacteriaceae reveals Intergenous KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *MBio*. 2011 Nov 1;2(6):e00204-11.
- Mathers AJ, Crook D, Vaughan A, Barry KE, Vegesana K, Stoesser N, Parikh HI, Sebra R, Kotay S, Walker AS, Sheppard AE. *Klebsiella quasipneumoniae* Provides a Window into Carbapenemase Gene Transfer, Plasmid Rearrangements, and Patient Interactions with the Hospital Environment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 May 24;63(6).
- Matsumura Y, Peirano G, Deviney R, Bradford PA, Motyl MR, Adams MD, Chen L, Kreiswirth B, Pitout JDD. Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Aug 1;72(8):2249-2258.
- Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *J Chemother*. 2017 Dec;29(sup1):2-9.
- McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med*. 1977 Dec 1;297(22):1197-203.

- Mena A, Plasencia V, García L, Hidalgo O, Ayestarán JI, Alberti S, Borrell N, Pérez JL, Oliver A. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol*. 2006 Aug;44(8):2831-7.
- Mermel LA. Short-term Peripheral Venous Catheter-Related Bloodstream Infections: A Systematic Review. *Clin Infect Dis*. 2017 Oct 30;65(10):1757-1762.
- Merrer J, Girou E, Ducellier D, Clavreul N, Cizeau F, Legrand P, Leneveu M. Should electronic faucets be used in intensive care and hematology units? *Intensive Care Med*. 2005 Dec;31(12):1715-8. Epub 2005 Oct 15.
- Mestre G, Berbel C, Tortajada P, Alarcia M, Coca R, Fernández MM, Gallemi G, García I, Aguilar MC, Rodríguez-Baño J, Martínez JA. Successful multifaceted intervention aimed to reduce short peripheral venous catheter-related adverse events: a quasiexperimental cohort study. *Am J Infect Control*. 2013 Jun;41(6):520-6.
- Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS. *Escherichia coli* with a Self-Transferable, Multiresistant Plasmid Coding for Metallo- $\beta$ -Lactamase VIM-1 Antimicrob Agents Chemother. 2003 Jan; 47(1): 395–397.
- Mitchell BG, Dancer SJ, Anderson M, Dehn E. Risk of organism acquisition from prior room occupants: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Infect*. 2015 Nov;91(3):211-7.
- Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One*. 2013 Jun 11;8(6):e66358.
- Miyoshi-Akiyama T, Tada T, Ohmagari N, Viet Hung N, Tharavichitkul P, Pokhrel BM, Gniadkowski M, Shimojima M, Kirikae T. Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biol Evol*. 2017 Dec 1;9(12):3238-3245.
- Moore G, Stevenson D, Thompson KA, Parks S, Ngabo D, Bennett AM, Walker JT. Biofilm formation in an experimental water distribution system: the contamination of non-touch sensor taps and the implication for healthcare. *Biofouling*. 2015;31(9-10):677-87.
- Mora A, Dahbi G, López C, Mamani R, Marzoa J, Dion S, Picard B, Blanco M, Alonso MP, Denamur E, Blanco J. Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. *PLoS One*. 2014 Jan 30;9(1):e87025.
- Moyá B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, Oliver A. Pan- $\beta$ -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Sep;56(9):4771-8.
- Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jan;16(1):35-40.
- Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyá B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Nov;57(11):5527-35.

- Munier AL, Biard L, Rousseau C, Legrand M, Lafaurie M, Lomont A, Donay JL, de Beaugrenier E, Flicoteaux R, Mebazaa A, Mimoun M, Molina JM. Incidence, risk factors, and outcome of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* acquisition during an outbreak in a burns unit. *J Hosp Infect.* 2017 Nov;97(3):226-233.
- Mutters NT, Mersch-Sundermann V, Mutters R, Brandt C, Schneider-Brachert W, Frank U. Control of the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospitals: epidemiology and clinical relevance. *Dtsch Arztebl Int.* 2013 Oct;110(43):725-31.
- Naas T, Kernbaum S, Allali S, Nordmann P. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, Russia. *Emerg Infect Dis.* 2007 Apr;13(4):669-71.
- Napoli C, Tafuri S, Montenegro L, Cassano M, Notarnicola A, Lattarulo S, Montagna MT, Moretti B. Air sampling methods to evaluate microbial contamination in operating theatres: results of a comparative study in an orthopaedics department. *J Hosp Infect.* 2012 Feb;80(2):128-32.
- Naumova EN, Liss A, Jagai JS, Behlau I, Griffiths JK. Hospitalizations due to selected infections caused by opportunistic premise plumbing pathogens (OPPP) and reported drug resistance in the United States older adult population in 1991-2006. *J Public Health Policy.* 2016 Dec;37(4):500-513.
- Nemec A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol.* 2004 Feb;53(Pt 2):147-53.
- Nemec A, Krízová L, Maixnerová M, Diancourt L, van der Reijden TJ, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Sep;62(3):484-9.
- Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol.* 2019 Jun 22;74:103935.
- Neves PR, Perdigão Neto LV, Ruedas Martins RC, Ramos JF, Leite G, Rossi F, Sanabani SS, Rocha V, Batista MV, Guimaraes T, Levin AS, Costa SF. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying bla(VIM-36) assigned to ST308: Indicated non-virulence in a *Galleria mellonella* model. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019 Mar;16:92-97.
- NF EN ISO 14698-1 (2004) - Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Maîtrise de la biocontamination - Partie 1 : principes généraux et méthodes.
- NF S90-351 (2013) - Établissements de santé - Zones à environnement maîtrisé - Exigences relatives à la maîtrise de la contamination aéroportée.
- Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul;27(3):543-74.
- Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V; European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012 May;18(5):432-8.

- Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011 Dec;19(12):588-95. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.005>. Epub 2011 Nov 9.
- Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Sep;20(9):821-30.
- Nordmann P. Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif *Med Sci (Paris)* 2010; 26 : 950–959 <https://doi.org/10.1051/medsci/20102611950>
- Nseir S, Blazejewski C, Lubret R, Wallet F, Courcol R, Durocher A. Risk of acquiring multidrug-resistant Gram-negative bacilli from prior room occupants in the intensive care unit. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Aug;17(8):1201-8.
- O’Neil J. 2016, « Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations», The review on antimicrobial resistance, <https://amr-review.org/>.
- O’Horo JC, Farrell A, Sohail MR, Safdar N. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and endoscopy: An evolving threat. *Am J Infect Control.* 2016 Sep 1;44(9):1032-6.
- Olesen B, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, Johnston B, Hansen DS, Scheutz F, Krogfelt KA, Kuskowski MA, Clabots C, Johnson JR. Temporal trends in antimicrobial resistance and virulence-associated traits within the Escherichiacoli sequence type 131 clonal group and its H30 and H30-Rx subclones, 1968 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Nov;58(11):6886-95.
- Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of Pseudomonas aeruginosa high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 2015 Jul-Aug;21-22:41-59.
- OMS Liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d’avoir de nouveaux antibiotiques 2017. <https://www.who.int/fr/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. (a)
- OMS Progrès en matière d’eau, d’assainissement et d’hygiène. 2017 [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/jmp-2017/fr/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/jmp-2017/fr/) 2017 (b)
- OMS Rapport sur la santé dans le monde 2007 - Un avenir plus sûr: la sécurité sanitaire mondiale au XXI siècle. <https://www.who.int/whr/2007/fr/> 2007.
- Orenstein R, Aronhalt KC, McManus JE Jr, Fedraw LA. A targeted strategy to wipe out Clostridium difficile. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011 Nov;32(11):1137-9.
- Ortega A, Sáez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Lara N, Aracil B, Pérez-Vázquez M, Campos J, Oteo J; Spanish Collaborating Group for the Antibiotic Resistance Surveillance Programme. Carbapenemase-producing Escherichia coli is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Aug;71(8):2131-8.
- Otter JA, Natale A, Batra R, Tosas Auguet O, Dyakova E, Goldenberg SD, Edgeworth JD. Individual- and community-level risk factors for ESBL Enterobacteriaceae colonization identified by universal admission screening in London. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Oct;25(10):1259-1265
- Otter JA, Yezli S, Salkeld JA, French GL. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control.* 2013 May;41(5 Suppl):S6-11.

- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019 Jan - Feb;37(1):177-192.
- Pantel A, Richaud-Morel B, Cazaban M, Bouziges N, Sotto A, Lavigne JP. Environmental persistence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a French intensive care unit. *Am J Infect Control*. 2016 Mar 1;44(3):366-8.
- Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Nov;55(11):4943-60.
- Parer S, Lotthé A, Chardon P, Poncet R, Jean-Pierre H, Jumas-Bilak E. An outbreak of heterogeneous glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* related to a device source in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012 Feb;33(2):167-74.
- Parisi SG, Bartolini A, Santacatterina E, Castellani E, Ghirardo R, Berto A, Franchin E, Menegotto N, De Canale E, Tommasini T, Rinaldi R, Basso M, Stefani S, Palù G. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemases and increase of resistance to colistin in an Italian teaching hospital from January 2012 To December 2014. *BMC Infect Dis*. 2015 Jun 27;15:244.
- Pasricha J, Koessler T, Harbarth S, Schrenzel J, Camus V, Cohen G, Perrier A, Pittet D, Iten A. Carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae among internal medicine patients in Switzerland. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2013 Jun 12;2:20.
- Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JD. Importance of Clonal Complex 258 and IncFK2-like Plasmids among a Global Collection of *Klebsiella pneumoniae* with blaKPC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Mar 24;61(4). pii: e02610-16.
- Peirano G, Matsumura Y, Adams MD, Bradford P, Motyl M, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp., 2008-2014. *Emerg Infect Dis*. 2018 Jun;24(6):1010-1019.
- Peleg AY, Bell JM, Hofmeyr A, Wiese P. Inter-country transfer of Gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolysing enzymes. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Apr;57(4):794-5.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jul;21(3):538-82
- Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol*. 2007 Oct;7(5):459-69. (a)
- Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Oct;51(10):3471-84. (b)
- Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, Alizai SA, Hussain A, Ghirardi S, Orenga S, Wilkinson K, Woodford N, Zhang J, Livermore DM, Abbasi SA, Raza MW. Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Oct;66(10):2288-94.
- Petitjean M, Martak D, Silvant A, Bertrand X, Valot B, Hocquet D. Genomic characterization of a local epidemic *Pseudomonas aeruginosa* reveals specific features of the widespread clone ST395. *Microb Genom*. 2017 Jun 8;3(10):e000129.

- Pitout JD, DeVinney R. *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Res*. 2017 Feb 28;6.
- Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jul;56(1):52-9.
- Pitt D, Aubin JM. Joseph Lister: father of modern surgery. *Can J Surg*. 2012 Oct;55(5):E8-9.
- Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, Mourouga P, Sauvan V, Touveneau S, Perneger TV. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. *Infection Control Programme. Lancet*. 2000 Oct 14;356(9238):1307-12. Erratum in: *Lancet* 2000 Dec 23-30;356(9248):2196.
- Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):15-22.
- Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol*. 2003 Aug;41(8):3542-7.
- Poirel L, Nordmann P. Résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes . *Antibiotiques*. 2006 May; 8 (2): 100-107.
- Politi L, Gartzonika K, Spanakis N, Zarkotou O, Poulou A, Skoura L, Vrioni G, Tsakris A. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: evidence of a widespread clonal outbreak. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Aug 1;74(8):2197-2202.
- Potron A, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated transfer of the bla(NDM-1) gene in Gram-negative rods. *FEMS Microbiol Lett*. 2011 Nov;324(2):111-6.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul;20(3):440-58.
- Querido MM, Aguiar L, Neves P, Pereira CC, Teixeira JP. Self-disinfecting surfaces and infection control. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019 Jun 1;178:8-21.
- Quick J, Cumley N, Wearn CM, Niebel M, Constantinidou C, Thomas CM, Pallen MJ, Moïemen NS, Bamford A, Oppenheim B, Loman NJ. Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. *BMJ Open*. 2014 Nov 4;4(11):e006278.
- Ramírez-Estrada S, Borgatta B, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *Infect Drug Resist*. 2016 Jan 20;9:7-18.
- Ranjan A, Shaik S, Nandanwar N, Hussain A, Tiwari SK, Semmler T, Jadhav S, Wieler LH, Alam M, Colwell RR, Ahmed N. Comparative Genomics of *Escherichia coli* Isolated from Skin and Soft Tissue and Other Extraintestinal Infections. *MBio*. 2017 Aug 15;8(4).
- Raro OHF, Gallo SW, Ferreira CAS, Oliveira SD. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination in an intensive care unit. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017 Mar-Apr;50(2):167-172.

- Rasheed JK, Kitchel B, Zhu W, Anderson KF, Clark NC, Ferraro MJ, Savard P, Humphries RM, Kallen AJ, Limbago BM. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae, United States. *Emerg Infect Dis*. 2013 Jun;19(6):870-8.
- Rawat D, Nair D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis*. 2010 Sep;2(3):263-74.
- Rawlinson S, Ciric L, Cloutman-Green E. How to carry out microbiological sampling of healthcare environment surfaces? A review of current evidence. *J Hosp Infect*. 2019 Dec;103(4):363-374.
- RCPI. Guidelines for the prevention and control of multi-drug resistant organisms (MDRO) excluding MRSA in the healthcare setting. Royal College of Physicians of Ireland. 2012
- Regev-Yochay G, Smollan G, Tal I, Pinas Zade N, Haviv Y, Nudelman V, Gal-Mor O, Jaber H, Zimlichman E, Keller N, Rahav G. Sink traps as the source of transmission of OXA-48-producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018 Nov;39(11):1307-1315.
- Rello J, Lode H, Cornaglia G, Masterton R; VAP Care Bundle Contributors. A European care bundle for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*. 2010 May;36(5):773-80.
- Reuter S, Sigge A, Wiedeck H, Trautmann M. Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Crit Care Med*. 2002 Oct;30(10):2222-8.
- Riley LW. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect*. 2014 May;20(5):380-90.
- Robledo IE, Aquino EE, Vázquez GJ. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jun;55(6):2968-70.
- Røder HL, Olsen NMC, Whiteley M, Burmølle M. Unraveling interspecies interactions across heterogeneities in complex biofilm communities. *Environ Microbiol*. 2019 Oct 21.
- Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Nov;53(11):4783-8.
- Roe CC, Vazquez AJ, Esposito EP, Zarrilli R, Sahl JW. Diversity, Virulence, and Antimicrobial Resistance in Isolates From the Newly Emerging *Klebsiella pneumoniae* ST101 Lineage. *Front Microbiol*. 2019 Apr 2;10:542.
- Roer L, Overballe-Petersen S, Hansen F, Schønning K, Wang M, Røder BL, Hansen DS, Justesen US, Andersen LP, Fulgsang-Damgaard D, Hopkins KL, Woodford N, Falgenhauer L, Chakraborty T, Samuelsen Ø, Sjöström K, Johannesen TB, Ng K, Nielsen J, Ethelberg S, Stegger M, Hammerum AM, Hasman H. *Escherichia coli* Sequence Type 410 Is Causing New International High-Risk Clones. *mSphere*. 2018 Jul 18;3(4).
- Rogues AM, Boulestreau H, Lashéras A, Boyer A, Gruson D, Merle C, Castaing Y, Bébear CM, Gachie JP. Contribution of tap water to patient colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2007 Sep;67(1):72-8.

- Romano S, Bourdier A, Parer S, Masnou A, Burgel L, Raczka F, Lamy B, Jumas-Bilak E, Lotthé A. Peripheral venous catheter and bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* after a contaminated preoperative shower. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013 May;34(5):544-6.
- Ross AS, Baliga C, Verma P, Duchin J, Gluck M. A quarantine process for the resolution of duodenoscope-associated transmission of multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Gastrointest Endosc*. 2015 Sep;82(3):477-83.
- Roux A, Ghigo JM. Bacterial biofilms . *Bull. Acad. Vét. France*. 2006 Mar; 153 (3) : 261-68.
- Ruiz-Roldán L, Bellés A, Bueno J, Azcona-Gutiérrez JM, Rojo-Bezares B, Torres C, Castillo FJ, Sáenz Y, Seral C. *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spanish Children: Occurrence in Faecal Samples, Antimicrobial Resistance, Virulence, and Molecular Typing. *Biomed Res Int*. 2018 Jun 11;2018:8060178.
- Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, El-Mniai A, Boussadia Y, Consigny PH, Girard PM, Vittecoq D, Bouchaud O, Pialoux G, Esposito-Farèse M, Coignard B, Lucet JC, Andreumont A, Matheron S. Acquisition of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by healthy travellers to India, France, February 2012 to March 2013. *Euro Surveill*. 2014 Apr 10;19(14).
- Ruppé, E. Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques*. 2010 12 (1): 3-16.
- Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis*.2000 May;181(5):1753-4.
- Rutala WA, Weber DJ. Outbreaks of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections associated with duodenoscopes: What can we do to prevent infections? *Am J Infect Control*. 2016 May 2;44(5 Suppl):e47-51.
- Ryu S, Kim BI, Lim JS, Tan CS, Chun BC. One Health Perspectives on Emerging Public Health Threats. *J Prev Med Public Health*. 2017 Nov;50(6):411-414.
- Sánchez-López J, García-Caballero A, Navarro-San Francisco C, Quereda C, Ruiz-Garbajosa P, Navas E, Drona F, Morosini MI, Cantón R, Díez-Aguilar M. Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: A challenge in community acquired infection. *DCases*. 2019 May 3;17:e00547.
- Santé Publique France. Infections associées aux soins . 2018. <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins>.
- Sato K, Nakae T. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 1991 Jul;28(1):35-45.
- Sauget M, Cholley P, Vannier A, Thouverez M, Nicolas-Chanoine MH, Hocquet D, Bertrand X. Trends of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 subclone in a French hospital over a 15-year period. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Dec;48(6):744-747.
- Scheithauer S, Oberröhrmann A, Haefner H, Kopp R, Schürholz T, Schwanz T, Engels A, Lemmen SW. Compliance with hand hygiene in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteria *J Hosp Infect*. 2010 Dec;76(4):320-3.

- Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Nov;60(5):913-20.
- Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol.* 1997 Nov;35(11):2819-25.
- Semin-Pelletier B, Cazet L, Bourigault C, Juvin ME, Boutoille D, Raffi F, Hourmant M, Blancho G, Agard C, Connault J, Corvec S, Caillon J, Batard E, Lepelletier D. Challenges of controlling a large outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a French university hospital. *J Hosp Infect.* 2015 Apr;89(4):248-53.
- Simmelweis IP. Die Aetiologie. Der Begriff und die Prophylaxis des Kindbettfiebers. Pest, Wien & Leipzig, C. H. The Hagströmer Medico-Historical Library. 1861. <http://hagstromerlibrary.ki.se/books/726>.
- SF2H. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France. 2018. HygieneS. (a)
- SF2H. Place de la surveillance microbiologique de l'environnement dans la prévention des infections associées aux soins 2018. HygieneS. (b)
- SF2H. Précautions Standard 2017. HygieneS.
- SF2H. Prévention de la transmission croisée : Précautions complémentaires contact. 2009. HygieneS.
- SF2H. Quelles mesures pour maîtriser le risque infectieux chez les patients immunodéprimés ? Recommandations formalisées d'experts 2016. HygieneS.
- SF2H. Surveiller et prévenir les infections associées aux soins 2010. HygieneS.
- Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol.* 2016 Aug;121(2):309-19.
- Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Kallen A, Limbago B, Fridkin S; National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013 Jan;34(1):1-14.
- Siroy A, Molle V, Lemaître-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, Jouenne T, Dé E. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Dec;49(12):4876-83.
- Slekovec C, Robert J, van der Mee-Marquet N, Berthelot P, Rogues AM, Derouin V, Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, Bertrand X. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infected ICU patients: a French multicenter 2012-2013 study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 May;38(5):921-926.
- Smith ZL, Oh YS, Saeian K, Edmiston CE Jr, Khan AH, Massey BT, Dua KS. Transmission of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae during ERCP: time to revisit the current reprocessing guidelines. *Gastrointest Endosc.* 2015 Apr;81(4):1041-5.

- Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, Stock F; NISC Comparative Sequencing Program Group, Henderson DK, Palmore TN, Segre JA. Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med*. 2012 Aug 22;4(148):148ra116.
- Sorbets E, Evrevin M, Jumas-Bilak E, Masnou A, Lotthé A, Thuret R, Chaize P, Peyremorte F, Romano-Bertrand S, Parer S. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections following outpatient flexible cystoscopy. *Am J Infect Control*. 2019 Jul 2.
- Spyropoulou A, Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Vamvakopoulou S, Marangos M, Spiliopoulou I, Anastassiou ED, Christofidou M. A ten-year surveillance study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care Greek university hospital: predominance of KPC- over VIM- or NDM-producing isolates. *J Med Microbiol*. 2016 Mar;65(3):240-246.
- Stietz MS, Ramírez MS, Vilacoba E, Merkier AK, Limansky AS, Centrón D, Catalano M. *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I-III. *Infect Genet Evol*. 2013 Mar;14:294-301.
- Stoesser N, Sheppard AE, Shakya M, Sthapit B, Thorson S, Giess A, Kelly D, Pollard AJ, Peto TE, Walker AS, Crook DW 2015 Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Apr;70(4):1008-15.
- Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J; European NDM-1 Survey Participants. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. *Euro Surveill*. 2010 Nov 18;15(46).
- Struve C, Roe CC, Stegger M, Stahlhut SG, Hansen DS, Engelthaler DM, Andersen PS, Driebe EM, Keim P, Krogfelt KA. Mapping the Evolution of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *MBio*. 2015 Jul 21;6(4):e00630.
- Sun Q, Ba Z, Wu G, Wang W, Lin S, Yang H. Insertion sequence ISRP10 inactivation of the *oprD* gene in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 May;47(5):375-9.
- Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, Kahlmeter G, Pan A, Petrosillo N, Rodríguez-Baño J, Singh N, Venditti M, Yokoe DS, Cookson B; European Society of Clinical Microbiology. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jan;20 Suppl 1:1-55.
- Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, Tekle T, Roberts A, Taiwo A, Simner PJ. *Comparing the Outcomes of Patients With Carbapenemase-Producing and Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Bacteremia*. *Clin Infect Dis*. 2017 Feb 1;64(3):257-264.
- Tängdén T, Cars O, Melhus A, Löwdin E. Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases: a prospective study with Swedish volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Sep;54(9):3564-8.
- Tanner WD, Atkinson RM, Goel RK, Toleman MA, Benson LS, Porucznik CA, VanDerslice JA. Horizontal transfer of the blaNDM-1 gene to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in biofilms. *FEMS Microbiol Lett*. 2017 Apr 1;364(8).

- Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, Lee YJ, Dubin KA, Socci ND, Viale A, Perales MA, Jenq RR, van den Brink MR, Pamer EG. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis* 2012 Oct;55(7):905-14.
- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Mar;8(3):207-17.
- Thom, Kerri A., Tracy Howard, Sophie Sembajwe, Anthony D. Harris, Paula Strassle, Brian S. Caffo, Karen C. Carroll, et J. Kristie Johnson. Comparison of Swab and Sponge Methodologies for Identification of *Acinetobacter baumannii* from the Hospital Environment. *Jour of Clini Micro* 2012 50 (6): 2140-41.
- Tiwari V, Moganty RR. Conformational stability of OXA-51  $\beta$ -lactamase explains its role in carbapenem resistance of *Acinetobacter baumannii*. *J Biomol Struct Dyn*. 2014;32(9):1406-20.
- Tofteland S, Naseer U, Lislevand JH, Sundsfjord A, Samuelsen O. A long-term low-frequency hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* involving Intergenous plasmid diffusion and a persisting environmental reservoir. *PLoS One*. 2013;8(3):e59015.
- Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H. Head-to-Head Comparison of Two Multi-Locus Sequence Typing (MLST) Schemes for Characterization of *Acinetobacter baumannii* Outbreak and Sporadic Isolates. *PLoS One*. 2016 Apr 12;11(4):e0153014.
- Towner, Kevin. 2006. « The Genus *Acinetobacter* ». In *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*, édité par Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, et Erko Stackebrandt, 746-58. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X\\_25](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_25).
- Trautmann M, Halder S, Hoegel J, Royer H, Haller M. Point-of-use water filtration reduces endemic *Pseudomonas aeruginosa* infections on a surgical intensive care unit. *Am J Infect Control*. 2008 Aug;36(6):421-9.
- Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, Hocquet D. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin Microbiol Infect*. 2018 Mar;24(3):258-266.
- Tschudin-Sutter S, Frei R, Dangel M, Stranden A, Widmer AF. Rate of transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae without contact isolation. *Clin Infect Dis*. 2012 Dec;55(11):1505-11.
- Tschudin-Sutter S, Frei R, Kampf G, Tamm M, Pflimlin E, Battegay M, Widmer AF. Emergence of glutaraldehyde-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011 Dec;32(12):1173-8.
- Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 May;258(1):72-7.
- Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Aug;13(8):807-15.

- Turton JF, Doumith M, Hopkins KL, Perry C, Meunier D, Woodford N. Clonal expansion of *Escherichia coli* ST38 carrying a chromosomally integrated OXA-48 carbapenemase gene. *J Med Microbiol*. 2016 Jun;65(6):538-46.
- Umezawa K, Asai S, Ohshima T, Iwashita H, Ohashi M, Sasaki M, Kaneko A, Inokuchi S, Miyachi H. Outbreak of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST219 caused by oral care using tap water from contaminated hand hygiene sinks as a reservoir. *Am J Infect Control*. 2015 Nov;43(11):1249-51.
- Umscheid CA, Mitchell MD, Doshi JA, Agarwal R, Williams K, Brennan PJ. Estimating the proportion of healthcare-associated infections that are reasonably preventable and the related mortality and costs. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011 Feb;32(2):101-14.
- Valenza G, Tuschak C, Nickel S, Krupa E, Lehner-Reindl V, Höller C. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* as intestinal colonizer in the community. *Infect Dis (Lond)*. 2015 Sep;47(9):654-7.
- Van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P, Verhoef J, Brisse S. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol*. 2004 Mar;155(2):105-12.
- Van Duin D, Perez F, Rudin SD, Cober E, Hanrahan J, Ziegler J, Webber R, Fox J, Mason P, Richter SS, Cline M, Hall GS, Kaye KS, Jacobs MR, Kalayjian RC, Salata RA, Segre JA, Conlan S, Evans S, Fowler VG Jr, Bonomo RA. Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: tracking molecular epidemiology and outcomes through a regional network. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jul;58(7):4035-41.
- Van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J*. 2011 Feb;5(2):173-83.
- Vandenbroucke JP, Eelkman Rooda HM, Beukers H. Who made John Snow a hero? *Am J Epidemiol*. 1991 May 15;133(10):967-73.
- Vasselle A. Rapport de l'office parlementaire d'évaluation des politiques de santé. Les politiques de lutte contre les infections associées aux soins (Assemblée nationale n° 3188 et Sénat n° 421) . 2006.
- Venier AG, Leroyer C, Slekovec C, Talon D, Bertrand X, Parer S, Alfandari S, Guerin JM, Megarbane B, Lawrence C, Clair B, Lepape A, Perraud M, Cassier P, Trivier D, Boyer A, Dubois V, Asselineau J, Rogues AM, Thiébaud R; DYNAPYO study group. Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in intensive care units: a prospective multicentre study. *J Hosp Infect*. 2014 Oct;88(2):103-8.
- Vergara-López S, Domínguez MC, Conejo MC, Pascual Á, Rodríguez-Baño J. Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Nov;19(11):E490-8.
- Viasus D, Puerta-Alcalde P, Cardozo C, Suárez-Lledó M, Rodríguez-Núñez O, Morata L, Fehér C, Marco F, Chumbita M, Moreno-García E, Fernández-Avilés F, Gutiérrez-García G, Martínez JA, Mensa J, Rovira M, Esteve J, Soriano A, Garcia-Vidal C. Predictors of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in neutropenic patients with bloodstream infection. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Jul 8.
- Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003 Apr;24(4):284-95.

- Villegas MV, Pallares CJ, Escandon-Vargas K, Hernandez-Gomez C, Correa A, Alvarez C, Rosso F, Matta L, Luna C, Zurita J, Mejía-Villatoro C, Rodríguez-Noriega E, Seas C, Cortesía M, Guzmán-Suárez A, Guzmán-Blanco M. Characterization and clinical impact of bloodstream infection caused by carbapenemase-producing enterobacteriaceae in seven latin American countries. *PLoS One* 2016 Apr 22;11(4):e0154092.
- Vonberg RP, Weitzel-Kage D, Behnke M, Gastmeier P. Worldwide Outbreak Database: the largest collection of nosocomial outbreaks. *Infection*. 2011 Feb;39(1):29-34.
- Walker JT, Jhutti A, Parks S, Willis C, Copley V, Turton JF, Hoffman PN, Bennett AM. Investigation of healthcare-acquired infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in taps in neonatal units in Northern Ireland. *J Hosp Infect*. 2014 Jan;86(1):16-23.
- Walker TS, Bais HP, Déziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol*. 2004 Jan;134(1):320-31.
- Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*. 2011 May;11(5):355-62.
- Wang L, Li Y, Zhang X, Li H. Characteristics of nosocomial infection and its effects on the survival of chemotherapy patients with advanced non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2017 Dec;14(6):7379-7383. (a)
- Wang H, Bédard E, Prévost M, Camper AK, Hill VR, Pruden A. Methodological approaches for monitoring opportunistic pathogens in premise plumbing: A review. *Water Res*. 2017 Jun 15;117:68-86.(b)
- Warris A, Onken A, Gaustad P, Janssen W, van der Lee H, Verweij PE, Abrahamsen TG. «Point-of-use filtration method for the prevention of fungal contamination of hospital water». *J Hosp Infect*. 2010 Sep;76(1):56-9.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Jan;35(1):147-51.
- Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control*. 2010 Jun;38(5 Suppl 1):S25-33.
- Weber DJ, Anderson D, Rutala WA. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2013 Aug;26(4):338-44.
- Weber DJ, Rutala WA, Kanamori H, Gergen MF, Sickbert-Bennett EE. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: frequency of hospital room contamination and survival on various inoculated surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015 May;36(5):590-3.
- Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüdén H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol*. 1997 Jun;35(6):1394-7.
- Weterings V, Veenemans J, Kleefman A, den Bergh MK, Mulder P, Verhulst C, Willemsen I, Kluytmans J. Evaluation of an in vitro model with a novel statistical approach to measure differences in bacterial

- survival of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* on an inanimate surface. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019 Jun 18;8:106.
- WHO. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities. <https://www.who.int/infection-prevention/publications/guidelines-cre/en/> 2017.
- WHO. WHO guidelines on hand hygiene in health care <https://www.who.int/gpsc/5may/tools/9789241597906/en/> 2009.
- Willis C, Nye K, Aird H, Lamph D, Fox A. Examining food, water and environmental samples from healthcare environments. Microbiological Guideline. Public Health England; 2013.
- Willmann M, Bezdán D, Zapata L, Susak H, Vogel W, Schröppel K, Liese J, Weidenmaier C, Autenrieth IB, Ossowski S, Peter S. Analysis of a long-term outbreak of XDR *Pseudomonas aeruginosa*: a molecular epidemiological study. *J Antimicrob Chemother*. 2015 May;70(5):1322-30.
- Wilson AP, Livermore DM, Otter JA, Warren RE, Jenks P, Enoch DA, Newsholme W, Oppenheim B, Leanord A, McNulty C, Tanner G, Bennett S, Cann M, Bostock J, Collins E, Peckitt S, Ritchie L, Fry C, Hawkey P. Prevention and control of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria: recommendations from a Joint Working Party. *J Hosp Infect*. 2016 Jan;92 Suppl 1:S1-44.
- Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol*. 2006 Jun;60(5):1136-51.
- Wischmeyer PE, McDonald D, Knight R. Role of the microbiome, probiotics, and “dysbiosis therapy” in critical illness. *Curr Opin Crit Care*. 2016;22(4):347–53.
- Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011 Sep;35(5):736-55.
- Wu YL, Yang XY, Ding XX, Li RJ, Pan MS, Zhao X, Hu XQ, Zhang JJ, Yang LQ. Exposure to infected/colonized roommates and prior room occupants increases the risks of healthcare-associated infections with the same organism. *J Hosp Infect*. 2019 Feb;101(2):231-239. (a)
- Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- $\beta$ -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jan 30;32(2). (b)
- Xie L, Dou Y, Zhou K, Chen Y, Han L, Guo X, Sun J. Coexistence of *bla*<sub>OXA-48</sub> and Truncated *bla*<sub>NDM-1</sub> on Different Plasmids in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate in China. *Front Microbiol*. 2017 Feb 2;8:133.
- Yapicioglu H, Gokmen TG, Yildizdas D, Koksall F, Ozlu F, Kale-Cekinmez E, Mert K, Mutlu B, Satar M, Narli N, Candevir A. *Pseudomonas aeruginosa* infections due to electronic faucets in a neonatal intensive care unit. *J Paediatr Child Health*. 2012 May;48(5):430-4.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Apr;45(4):1151-61. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Feb;52(2):809. PubMed PMID: 11257029; PubMed Central PMCID:PMC90438.

- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec;53(12):5046-54.
- Zahar JR, Masse V, Watier L, Lanternier F, Degand N, Postaire M, Descamps P, Nassif X, Lortholary O. Is hand-rub consumption correlated with hand hygiene and rate of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae(ESBL-PE)-acquired infections? *J Hosp Infect*. 2012 Apr;80(4):348-50.
- Zahar JR, Poirel L, Dupont C, Fortineau N, Nassif X, Nordmann P. About the usefulness of contact precautions for carriers of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *BMC Infect Dis*. 2015 Nov 12;15:512.
- Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries*. 2009 Jun 1;3(5):335-41.
- Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Jan;41(1):11-9.
- Zhang F, Zhu D, Xie L, Guo X, Ni Y, Sun J. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and the prevalence of ST131 subclone H30 in Shanghai, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Jun;34(6):1263-9.
- Zingg W, Pittet D. Electronic-eye faucets-curse or blessing? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012 Mar;33(3):241-2.
- Zowawi HM, Sartor AL, Sidjabat HE, Balkhy HH, Walsh TR, Al Johani SM, AlJindan RY, Alfaresi M, Ibrahim E, Al-Jardani A, Al Salman J, Dashti AA, Johani K, Paterson DL. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Gulf Cooperation Council States: dominance of OXA-23-type producers. *J Clin Microbiol*. 2015 Mar;53(3):896-903.

## **Résumé**

Les infections associées au soins (IAS) sont un problème majeur de santé publique qui participent à la menace mondiale de l'antibiorésistance qui devrait en 2050 causer 10 millions de décès par an et devenir la première cause de mortalité dans le monde. La forte consommation d'antibiotiques, la promiscuité et la vulnérabilité des patients font de l'hôpital un lieu privilégié pour la transmission de bactéries notamment résistantes aux antibiotiques, et pour les phénomènes épidémiques. Les surfaces de l'environnement hospitalier jouent un rôle mal évalué dans ces phénomènes, en servant d'éventuel réservoir et relais aux agents responsables d'IAS. Mieux connaître la diffusion des bactéries responsables d'IAS sur les surfaces de soins est l'objectif général de cette thèse.

Afin d'observer la circulation et la persistance, sur les surfaces hospitalières, des bacilles à gram négatif (BGN) responsables d'IAS, et de comprendre les mécanismes de diffusion et du succès épidémique de certaines espèces bactériennes et sous-populations bactériennes responsables d'IAS, des prélèvements intensifs de surfaces, au total 5329, ont été réalisés. Deux sources de contamination des surfaces de l'environnement hospitalier ont été considérées : l'origine hydrique avec *P. aeruginosa* comme chef de file, et l'origine humaine avec les bactéries productrices de carbapénèmases (BPC).

Ce travail nous a permis de collectionner 567 bactéries environnementales issues d'un échantillonnage de terrain. Pour chaque souche bactérienne, des données clinico-éco-épidémiologiques ont été recueillies. Cette collection de bactéries isolées en conditions réelles est le socle de cette thèse et constitue toute son originalité. Elle nous a permis de tracer, au plus près des conditions réelles, les routes de transmission des bactéries responsables d'IAS sur les surfaces de soins. Ainsi, nous avons pu identifier des réservoirs environnementaux de BGN et analyser la circulation entre l'eau du point d'eau, les surfaces de soins et les patients pour les bactéries d'origine hydrique, et entre les surfaces de soins et les patients pour les bactéries d'origine humaine. Lors de l'analyse de ces circulations sur les surfaces de soins, les différents niveaux de complexité de la diversité des populations et sous-populations bactériennes ont pu être intégrés. Considérer cette complexité dans sa globalité est une clef pour mieux comprendre le rôle de l'environnement de soins dans la transmission de bactéries responsables d'IAS et les phénomènes épidémiques. De plus ce travail, a démontré que l'environnement proche des patients était le reflet des bactéries colonisant/infectant les patients tout en apportant des informations supplémentaires sur sa diversité. Ainsi le patient au sein de son environnement apparait comme une unité de transmission à considérer dans sa globalité pour évaluer le risque de transmission et de phénomènes épidémiques.

## **Mots clefs**

Infections associées aux soins ; Bactéries pathogènes opportunistes ; Bactéries productrices de carbapénèmases ; Prévention et contrôle du risque infectieux ; Environnement hospitalier; Transmission.

## **Abstract**

Healthcare-associated infections (HAI) are a major concern of Public Health because of their involvement in the global threat of antibiotic resistance, predicted to become the first cause of mortality in 2050 with about 10 million deaths a year. The high antibiotic consumption associated with both patients' promiscuity and vulnerability make hospital an ideal place for cross-transmission of bacteria, especially drug-resistant bacteria, and for outbreak occurrence. Surfaces within hospital environment can play an underestimated role in these phenomena because they are potential reservoir or relay for bacteria responsible of HAI. Better understand the diffusion of bacteria responsible of HAI onto hospital surfaces is the general aim of this thesis.

In order to observe the circulation and persistence of gram-negative bacteria (GNB) involved in HAI onto hospital surfaces, and understand mechanisms of diffusion and outbreak successes of certain bacterial species and sub-species, we performed intensive samplings of hospital environment, with a total of 5329 surfaces sampled. Two sources of contamination were considered: the hydric origin with *Pseudomonas aeruginosa* in leading position, and the human origin with carbapenemase-producing bacteria (CPB).

During this work, we collected 567 bacterial strains by sampling the hospital environment. For every bacteria strain, clinical, ecological and epidemiological data were gathered. The strains collection isolated in real conditions of hospital activities is the foundation of this thesis and constitutes its originality. It permitted to retrace, as close as possible to real-life conditions, the routes of transmission of bacteria responsible of HAI on hospital surfaces. This allowed us to identify environmental reservoirs of GNB and analyze the circulation of hydric bacteria between water and water point-of-use, surfaces and patients, as well as the circulation of human bacteria between patients and hospital surfaces. These analyses integrated different levels of complexity through the diversity of bacterial population and sub-populations. Considering this complexity as a whole is a key to better understand the involvement of hospital environment in the transmission of bacteria responsible of HAI. Furthermore, we demonstrated that the close environment of patients reflected the bacteria colonizing/infecting patients, while providing further information on its diversity. Thus, the patient within its close healthcare environment must be considered as a unit of transmission to be considered in its whole in order to evaluate the risk of transmission and the occurrence of outbreaks.

## **Key-words**

Healthcare-associated infections; Opportunistic pathogenic bacteria; Carbapenemase-producing bacteria; Infection prevention and control; Hospital environment; Transmission.