



HAL
open science

Émergence et dynamique de diffusion des entérobactéries résistantes aux antibiotiques dans les DOM du Sud-Ouest de l'Océan Indien dans une approche One Health

Guillaume Miltgen

► **To cite this version:**

Guillaume Miltgen. Émergence et dynamique de diffusion des entérobactéries résistantes aux antibiotiques dans les DOM du Sud-Ouest de l'Océan Indien dans une approche One Health. Microbiologie et Parasitologie. Université de la Réunion, 2021. Français. NNT : 2021LARE0009 . tel-03688288

HAL Id: tel-03688288

<https://theses.hal.science/tel-03688288>

Submitted on 4 Jun 2022

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.

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES TECHNOLOGIES SANTÉ

DISCIPLINE : MICROBIOLOGIE

ANNÉE 2021

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue publiquement le 3 juin 2021

par

Guillaume MILTGEN

**ÉMERGENCE ET DYNAMIQUE DE DIFFUSION DES ENTÉROBACTERIES
RÉSISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES DANS LES DOM DU SUD-OUEST DE
L'OCÉAN INDIEN DANS UNE APPROCHE *ONE HEALTH***

Directeur de thèse :	. Patrick MAVINGUI	Directeur de recherche CNRS (Université de La Réunion)
Co-directeur de thèse :	. Xavier BERTRAND	PU-PH (Université Bourgogne-Franche Comté)
<u>Composition du jury :</u>		
Président :	. Erick DENAMUR	PU-PH (Université de Paris – Diderot)
Rapporteurs :	. Marie-Cécile PLOY . Jean-Yves MADEC	PU-PH (Université de Limoges) Directeur de recherche ANSES (Université de Lyon)
Examineurs :	. Marjolaine ROCHE . Marie-Christine JAFFAR-BANDJEE	MCU (Université de La Réunion) PH-PhD (CHU de La Réunion)
Invité :	. Didier HOCQUET	PU-PH (Université Bourgogne-Franche Comté)

REMERCIEMENTS

À Carole et Arthur,

À mes parents,

À mon frère,

À Monsieur le Professeur Erick Denamur,

Pour l'honneur qu'il me fait de juger ce travail et de présider ce jury.

À Madame le Professeur Marie-Cécile Ploy,

À Monsieur le Docteur Jean-Yves Madec,

Pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

À Madame le Docteur Marie-Christine Jaffar-Bandjee,

Pour avoir accepté de juger ce travail et pour le soutien accordé depuis le début de ce projet.

À Madame le Docteur Marjolaine Roche,

Pour avoir accepté de juger ce travail.

À Monsieur le Docteur Patrick Mavingui,

À Monsieur le Professeur Xavier Bertrand,

Pour leur accompagnement tout au long de ce travail et pour m'avoir accordé leur confiance.

À Monsieur le Professeur Didier Hocquet,

Pour son accompagnement et ses conseils depuis le projet de Master 2 à Besançon.

À Monsieur le Docteur Olivier Belmonte,

À Monsieur le Docteur Eric Cardinale,

Pour leur soutien dans ce projet et leur collaboration de longue date ayant permis la réalisation de ce travail.

À Monsieur le Docteur Pablo Tortosa,

À Monsieur le Docteur Jérôme Allyn,

Pour avoir accepté de participer à mon comité de suivi.

À Madame le Docteur Bénédicte Roquebert,

Pour son soutien sans faille dans mon parcours hospitalo-universitaire.

À Monsieur le futur-Docteur Daniel Martak,

Pour le compagnonnage très agréable que fût ce parcours commun (au jour près !), ainsi que son aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

À Monsieur le Docteur Benoît Valot,

Pour sa formation et ses précieux conseils en bio-informatique.

À l'équipe des biologistes du laboratoire de Microbiologie du CHU Félix Guyon, et notamment à Madame le Dr Anaïs Soares, à Messieurs les Docteurs Alexandre Leclaire, Quentin Floug et Nicolas Traversier,

Pour m'avoir permis de disposer du temps nécessaire à la conduite de ce travail.

À l'équipe des techniciens du laboratoire de Microbiologie du CHU Félix Guyon, à Mademoiselle Laure Kamus, à Messieurs Thomas Garrigos, Thibaut Vedani, Paul Seraphin et Guillaume Verchère,

Pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

À l'équipe du Laboratoire d'Hygiène Hospitalière de Besançon et de l'unité Chrono-Environnement, et notamment Madame le Docteur Michelle Thouverez, Madame le Docteur Steffy Rocchi, Monsieur le Docteur Pascal Cholley, Monsieur le Docteur Houssein Gbaguidi-Haore,

Pour la très bonne ambiance et leurs conseils toujours avisés.

À l'équipe du CNR de Bicêtre et notamment les Docteurs Rémy Bonnin et Laurent Dortet,

Pour leur aide et leur expertise sur les entérobactéries productrices de carbapénémase.

À l'ensemble des biologistes de l'île de La Réunion, et notamment les Docteurs Anne Lignereux, Céline Ben Cimon, Sandrine Picot, Geoffrey Masson et Mahery Ramiandrisoa,

Pour leur collaboration active à ce travail.

À l'équipe des hygiénistes du CHU de La Réunion et du CPIAS Réunion-Mayotte, et notamment les Docteurs Catherine Avril, Nathalie Lugagne-Delpon et Karine Gambarotto,

Pour leur aide précieuse dans l'investigation des clusters et des épidémies.

À l'équipe de la CISE Réunion, du groupe Runéo et du Laboratoire départemental d'analyses des eaux, et notamment Madame Sandrine Robert, Messieurs Olivier Pince et Laurent Lai Kan Thon,

Pour leur collaboration sur la campagne de prélèvements environnementaux.

« L'expérimentateur se trouve sans cesse aux prises avec des faits qui ne se sont pas encore manifestés. L'inconnu dans le possible et aussi dans ce qui a été, voilà son domaine. Le charme de nos études, l'enchantement de la science, consiste en ce que, partout et toujours, nous pouvons donner la justification de nos principes et la preuve de nos découvertes. »

Louis Pasteur

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
TABLE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	10
PRÉAMBULE.....	15
INTRODUCTION GÉNÉRALE	18
1^{ère} PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE ET ETAT DE L'ART.....	21
1 Résistances aux bêta-lactamines chez les entérobactéries	22
1.1 Classification des bêta-lactamases	22
1.1.1 La classification de Ambler	22
1.1.2 La classification de Bush et Jacoby	23
1.2 Résistances aux céphalosporines de 3 ^{ème} et 4 ^{ème} génération.....	24
1.2.1 Les céphalosporinases.....	24
1.2.2 Les bêta-lactamases à spectre étendu	26
1.2.2.1 Les « anciennes » BLSE : TEM et SHV	27
1.2.2.2 Les « nouvelles BLSE » : CTX-M et autres enzymes de classe A	30
Les enzymes de type CTX-M.....	30
Le cas particulier de l'association du clone <i>E. coli</i> ST131 et de l'enzyme CTX-M-15	34
Les autres enzymes « mineures » de classe A : PER, VEB, GES	37
1.2.2.3 Les BLSE de classe D : Oxacillinases.....	38
1.3 Résistances aux carbapénèmes.....	39
1.3.1 Les carbapénèmases.....	39
1.3.1.1 Les carbapénèmases de classe A.....	40
Les carbapénèmases de type KPC	40
Les carbapénèmases de type GES	42
Les carbapénèmases apparentées du groupe Nmca, IMI, FRI, SME.....	42
1.3.1.2 Les carbapénèmases de classe B.....	44
La métallo-bêta-lactamase NDM-1	45
Les métallo-bêta-lactamases de type VIM	51
Les métallo-bêta-lactamases de type IMP	52
1.3.1.3 Les carbapénèmases de classe D.....	53
1.3.1 Autres mécanismes de résistances aux carbapénèmes	56

TABLE DES MATIÈRES

2	Concept <i>One Health</i> appliqué à l'antibiorésistance	58
2.1	Approche sectorielle des différentes populations d'entérobactéries multi-résistantes	62
2.1.1	Les entérobactéries productrices de CTX-M dans les différents compartiments	62
2.1.1.1	Les entérobactéries productrices de CTX-M chez l'Homme	62
2.1.1.2	Les entérobactéries CTX-M chez l'animal et dans la filière alimentaire	63
2.1.1.3	Les entérobactéries CTX-M dans l'environnement	65
2.1.2	Les entérobactéries productrices de SHV	66
2.1.2.1	Les entérobactéries SHV chez l'Homme	66
2.1.2.2	Les entérobactéries SHV dans les autres compartiments	66
2.1.3	Les entérobactéries productrices de TEM	67
2.1.3.1	Les entérobactéries TEM chez l'Homme	67
2.1.3.2	Les entérobactéries TEM dans les autres compartiments	67
2.2	Les études <i>One Health</i> sur les entérobactéries multi-résistantes	69
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> , le meilleur candidat d'étude ?	69
2.2.2	Homme – environnement	69
2.2.3	Homme – animal/filière alimentation	72
2.2.3.1	Animaux de rente	72
2.2.3.2	Animaux de compagnie	82
2.2.3.3	Animaux sauvages	83
2.2.3.4	Alimentation	83
2.2.4	Homme – animal/filière alimentation – environnement	86
2.2.5	Cas particulier des EPC hors du compartiment humain	96
3	Les particularités des DOM du Sud-Ouest de l'Océan Indien	100
3.1	La Réunion	100
3.1.1	Carte d'identité	100
3.1.2	Un carrefour migratoire dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien	102
3.1.3	Épidémiologie de la résistance chez les entérobactéries	103
3.1.3.1	Entérobactéries productrices de BLSE et AmpC	104
3.1.3.2	Entérobactéries productrices de carbapénèmase	105
3.2	Mayotte	105
3.2.1	Carte d'identité	105
3.2.2	Problématiques sanitaires et d'immigration	108
3.2.3	Épidémiologie de la résistance chez les entérobactéries	109

TABLE DES MATIÈRES

2^{ème} PARTIE : TRAVAIL SCIENTIFIQUE	111
1 Objectifs.....	112
2 Matériels et méthodes de l'ensemble des travaux.....	115
2.1 Définitions	115
2.2 Design des études.....	115
2.2.1 Étude ECOH-RUN.....	115
2.2.2 Étude sur l'épidémiologie des EPC à La Réunion	117
2.2.3 Étude sur l'épidémie d' <i>Enterobacter cloacae</i> IMI-1 à Mayotte	118
2.3 Méthodologie d'échantillonnage et sélection des isolats.....	119
2.3.1 Prélèvements d'origine humaine	119
2.3.2 Prélèvements d'origine animale.....	119
2.3.3 Prélèvements d'origine environnementale.....	120
2.4 Identification bactérienne et tests de sensibilité aux antibiotiques	121
2.5 Identification des gènes de résistance aux bêta-lactamines par méthodes « conventionnelles ».....	121
2.6 Typage bactérien par méthodes « conventionnelles »	123
2.6.1 <i>Multi locus sequence typing</i>	123
2.6.2 Électrophorèse en champ pulsé	123
2.7 <i>Whole genome sequencing</i> et analyse bio-informatique.....	126
2.7.1 Séquençages.....	126
2.7.2 Résistome	126
2.7.3 Phylogénie	127
2.7.4 Plasmidome	127
2.8 Analyses statistiques	128
2.9 Collaborations et financements	128
3 Résultats.....	130
3.1 Comparaison génomique des isolats de <i>E. coli</i> multi-résistants à La Réunion dans une approche <i>One Health</i> Homme-animal-environnement	130
3.2 Épidémiologie des EPC à La Réunion sur la période 2010-2016 : un reflet des EPC circulant dans la zone du Sud-Ouest de l'Océan Indien ?	174
3.3 Épidémie de <i>Enterobacter cloacae</i> producteurs de la carbapénèmase IMI-1 à Mayotte.....	190
4 Discussion générale.....	200
4.1 Dynamique de diffusion inter-compartimentale des EBLSE à La Réunion.....	200
4.2 Dynamique de diffusion des EPC dans la zone SOOI et d'importation à La Réunion.....	202
4.3 Implications dans la lutte contre l'antibiorésistance à La Réunion et dans la zone SOOI.....	204

TABLE DES MATIÈRES

CONCLUSION – PERSPECTIVES	206
AUTRES TRAVAUX DE VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	211
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	248
ANNEXES.....	275

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Substitutions en acides aminés des dérivés BLSE (et autres) de type TEM.	28
Figure 2. Substitutions en acides aminés des dérivés BLSE (et autres) de type SHV.	29
Figure 3. Répartition mondiale des familles de plasmides codant pour les gènes <i>bla</i> _{SHV-2} , <i>bla</i> _{SHV-2a} , <i>bla</i> _{SHV-5} et <i>bla</i> _{SHV-12}	29
Figure 4. Modulation du spectre de substrat des enzymes de type CTX-M par des mutations ponctuelles.	30
Figure 5. Arbre phylogénétique des enzymes de la famille CTX-M basé sur la séquence des acides aminés.	32
Figure 6. Identification des gènes intrinsèques des céfotaximases chez <i>Kluyvera spp.</i> comme sources originales des enzymes CTX-M acquises sur la base de leurs identités d'acides aminés et des homologies des séquences voisines des gènes associés.	33
Figure 7. Éléments génétiques mobiles responsables de la capture et de la mobilisation des gènes <i>bla</i> _{CTX-M}	33
Figure 8. Évolution de la proportion des souches de <i>E. coli</i> résistantes ou intermédiaires aux C3G entre 2002 et 2012.	34
Figure 9. Arbre phylogénétique de 72 souches d' <i>Escherichia</i> représentant le genre dans son ensemble.	35
Figure 10. Évolution progressive des clades B, B0, C0 et C du clone <i>Escherichia coli</i> ST131.	36
Figure 11. Alignement des séquences d'acides aminés de 4 variants BLSE de l'enzyme à activité carbapénémase OXA-48.	38
Figure 12. Évolution par mois du nombre d'épisodes impliquant des EPC en France signalés entre 2009 et 2016, selon la mise en évidence ou non d'un lien avec un pays étranger (n=3595).	40
Figure 13. Répartition géographique des enzymes de type KPC.	41
Figure 14. Section d'arbre phylogénétique de carbapénémases de classe A encodées sur le chromosome ou sur des plasmides.	43
Figure 15. Structure 3D du squelette de la protéine NDM-1 représentée par des hélices et des brins, les deux ions zinc aux sites actifs sont représentés par des sphères bleues.	46
Figure 16. Distribution mondiale des souches d'entérobactéries productrices de NDM.	47
Figure 17. Répartition entre les continents des isolats de <i>E. coli</i> producteurs de la métallo-bêta- lactamase NDM isolés à partir d'échantillons cliniques.	48
Figure 18. Répartition des épisodes impliquant des EPC en France signalés entre 2009 et 2016, selon les mécanismes de résistance impliqués et l'année de signalement (n=3595).	49

TABLE DES MATIÈRES

Figure 19. Exemples de contextes génétiques et de mécanismes de mobilisation du gène <i>bla_{NDM}</i>	52
Figure 20. Distribution mondiale des trois principales MBLs NDM, VIM et IMP chez les entérobactéries	54
Figure 21. Distribution géographique des entérobactéries productrices de l'enzyme OXA-48.	55
Figure 22. Distribution géographique des entérobactéries productrices de l'enzyme OXA-181.	56
Figure 23. Le concept <i>One Health</i>	58
Figure 24. Carte des voies de l'antibiorésistance dans l'agriculture, l'environnement et l'industrie agroalimentaire.	59
Figure 25. Infographie détaillée illustrant l'approche <i>One Health</i> appliquée à l'antibiorésistance (Santé Publique France).....	60
Figure 26. Evolution des proportions de souches de <i>E. coli</i> non-sensibles au Ceftiofur chez les animaux en France (2008-2019). Données RESAPATH.	61
Figure 27. Épidémiologie globale des enzymes CTX-M avec évolution et changement de génotypes au cours du temps.	63
Figure 28. Fréquences des gènes codant pour des BLSE ou des céphalosporinases plasmidiques détectées dans des isolats de <i>E. coli</i> de sources humaines et non humaines aux Pays-Bas entre 2005-2017.....	68
Figure 29. Structure de la population de <i>E. coli</i> prélevée dans les plaines d'inondation, les milieux cliniques et les stations d'épuration des eaux usées.	71
Figure 30. Distribution des séquences types (ST) par analyse MLST des 97 isolats d' <i>E. coli</i> séquencés exprimant l'enzyme CTX-M-15.	74
Figure 31. Cartes et dendrogramme circulaire illustrant le recrutement et la relation phylogénétique entre les 1948 isolats de l'étude.	76
Figure 32. Analyse en réseau de clonalité des isolats de <i>E. coli</i> cultivés dans des fermes d'élevage et de patients atteints d'infection invasives.....	77
Figure 33. Répartition des différents STs et variants des gènes <i>bla_{CTX-M}</i> en fonction des origines des échantillons.	78
Figure 34. Comparaison des plasmides de type Inc11-ST3 et Inc11-ST7 d'origine humaine et animale.	80
Figure 35. Arbre phylogénétique des isolats de <i>E. coli</i> hyperproducteurs de AmpC d'origines animales et humaines.	81
Figure 36. Arbre de couverture minimum de l'analyse par cgMLST.	82
Figure 37. Arbre phylogénétique basé sur la séquence du génome entier de 195 isolats de <i>E. coli</i> producteurs de BLSE d'origine humaine et alimentaire.	84

TABLE DES MATIÈRES

Figure 38. Figure illustrant la relation entre les 149 isolats de <i>E. coli</i> BLSE de l'étude et leurs gènes de résistances.....	87
Figure 39. Carte illustrant la zone de prélèvements des isolats de <i>K. pneumoniae</i> BLSE et arbre construit en maximum de vraisemblance reliant les 77 isolats comparés.....	88
Figure 40. Répartitions des différents isolats de <i>E. coli</i> en fonction de la fréquence des gènes de résistance et des profils de réplicons (des plasmides) sous forme de nuages de points dont chaque couleur correspond à un réservoir.	90
Figure 41. Répartition des isolats de <i>E. coli</i> BLSE en fonction de leur origine de prélèvement, leur séquence type et des gènes de résistances codant pour les BLSE.	92
Figure 42. Prévalence des isolats de <i>E. coli</i> BLSE ou AmpC dans chaque source et probabilité d'exposition de la population communautaire à chaque source.	95
Figure 43. Pourcentage des attributions estimées de chaque source en considérant le portage intestinal de <i>E. coli</i> BLSE ou AmpC détecté dans la population communautaire aux Pays-Bas entre 2005 et 2017.	96
Figure 44a. Distribution mondiale des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et productrices de carbapénémase dans le bétail et les aliments issus de la mer.	97
Figure 44b. Distribution mondiale des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et productrices de carbapénémase chez les animaux de compagnie et la faune sauvage.	98
Figure 45. Résumé de l'identification des gènes producteurs de carbapénémase dans les réservoirs environnementaux, signifiés par des couleurs et des symboles correspondants.	99
Figure 46. Carte géographique de La Réunion avec ses communes et son chef-lieu (Saint-Denis). ..	101
Figure 47. Carte illustrant les différentes lignes aériennes connectant les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien, à l'Afrique, l'Asie et l'Europe.	102
Figure 48. Répartition des entérobactéries productrices de BLSE par espèce au CHU Félix Guyon entre les périodes 1997/98 et 2006/07.	104
Figure 49. Carte géographique de Mayotte et ses différentes communes.	107
Figure 50. Schéma départemental d'assainissement de la ville de Saint-Denis avec localisation des 4 points de prélèvements de l'étude ECOH-RUN.	116
Figure 51. Photographie illustrant la station de traitement des effluents d'élevage de Camp-Pierrot à Gand Ilet.	117
Figure 52. Antibiotype d'un isolat de <i>E. cloacae</i> producteur de la carbapénémase IMI-1.....	118
Figure 53a. Profils de résistance des 410 isolats de <i>E. coli</i> BLSE à 16 antibiotiques d'intérêt en fonction des 3 compartiments de prélèvements humains, environnementaux et animaux.	168

TABLE DES MATIÈRES

Figure 53b. Profils de résistance des 410 isolats de <i>E. coli</i> BLSE à 16 antibiotiques d'intérêt en fonction de 2 compartiments « simplifiés » pour les prélèvements considérés comme d'origine humaine ou animale.	168
Figure 54. Évolution des concentrations de <i>E. coli</i> BLSE détectées dans chacun des 4 points de prélèvements de la ville de Saint-Denis entre Janvier 2018 et Février 2019.	169
Figure 55. Rapport entre les concentrations de <i>E. coli</i> BLSE et les <i>E. coli</i> totaux détectées dans les 4 différents points de prélèvements de la ville de Saint-Denis sur la période Janvier 2018 - Février 2019.	170
Figure 56. Évolution des cas d'EPC détectés sur l'île de la Réunion entre 2010 et 2020 et nombre d'EVASAN au CHU de La Réunion sur la même période.	185
Figure 57a. Évolution des cas d'EPC d'origine externe détectés sur l'île de la Réunion entre 2011 et 2020 en fonction de l'origine géographique des patients.	186
Figure 57b. Évolution des cas d'EPC d'origine externe détectés sur l'île de la Réunion entre 2011 et 2020 en fonction de l'origine géographique des patients (flux Ouest ou flux Est).	186
Figure 58. Nombre de cas d'EPC de type <i>E. cloacae</i> IMI-1 recensés à La Réunion et à Mayotte sur la période 2015-2020.	198

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification fonctionnelle de Bush et Jacoby des bêta-lactamases avec correspondance avec la classification de Ambler.....	23
Tableau 2. Listes des différentes bêta-lactamases de classe C avec les insertions et délétions par rapport à l'enzyme AmpC de la souche de <i>E. cloacae</i> complexe P99.....	25
Tableau 3. Profils de substrats et d'inhibition des carbapénèmases de classe A.....	44
Tableau 4. Exemples des principales métallo-bêta-lactamases de localisation chromosomique ou encodées par des plasmides.	45
Tableau 5. Types de réplicon des plasmides porteurs du gène <i>bla_{NDM}</i> chez les entérobactéries.	50
Tableau 6. Principales bêta-lactamases rencontrées chez l'Homme en France.....	57
Tableau 7. Liste détaillée des amorces utilisées pour les réactions de PCR pour la détection des gènes <i>bla_{BLSE}</i> et <i>bla_{CARBA}</i>	122
Tableau 8. Liste détaillée des amorces utilisées pour le typage MLST des différentes entérobactéries.	124
Tableau 9. Synthèse des isolats d'EPC détectés dans les prélèvements d'eaux usées de Saint-Denis sur la période Janvier 2018 - Février 2019.	171

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : Acide Aminé

ACC : *Ambler Class C*

ACT : *AmpC Type*

ACP : Analyse en Composante Principale

ANR : Agence Nationale de la Recherche

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARS : Agence Régionale de Santé

BGN : Bacille à Gram Négatif

BHRe : Bactérie Hautement Résistante émergente

BKC : *Brazilian Klebsiella Carbapenemase*

bla : bêta-lactamase

BLSE : Bêta-Lactamase à Spectre Étendu

BMR : Bactérie Multi-Résistante

BTP : Bâtiment - Travaux Publics

BUA : Bon Usage des Antibiotiques

C2G : Céphalosporine de 2^{ème} génération

C3G : Céphalosporine de 3^{ème} génération

C4G : Céphalosporine de 4^{ème} génération

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CCA : Centre de Conseil en Antibiothérapie

CFE : *Citrobacter FrEundii*

UFC : Unité Formant Colonie

CHM : Centre Hospitalier de Mayotte

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CHOR : Centre Hospitalier Ouest Réunion

CMY : *CephaMYcinase*

CNR : Centre National de Référence

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

LISTE DES ABRÉVIATIONS

COI : Commission de l'Océan Indien

COVID-19 : *CO*rona-*V*irus *D*isease-2019

CPIAS : Centre d'appui pour la Prévention des Infections Associées aux Soins

CRAtb : Centre Régional en Antibiothérapie

CRB : Centre de Ressources Biologiques

CTX-M : *CefoTaXimase-Munich*

DGS : Direction Générale de la Santé

DHA : *Dharhan hospital* (Arabie saoudite)

DOM : Département d'Outre Mer

EARS-Net : *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

EBLSE : Entérobactérie productrices de BLSE

ECDC : *European Centre for Disease Prevention and Control*

ECOH-RUN : *Escherichia coli One Health* à La Réunion

ECP : Électrophorèse en Champ Pulsé

EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique

EGM : Élément Génétique Mobile

EJP : *European Joint Programme*

EMA : Équipe Multi-disciplinaire en Antibiothérapie

EMS : Établissement Médico-Social

EOH : Équipe Opérationnelle d'Hygiène

EPC : Entérobactérie Productrice de Carbapénèmase

ES : Établissement de Soins

ESAC-Net : *European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network*

ES-OXA : *Extended-Spectrum Oxacillinase*

EUCAST : *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

EVASAN : ÉVAcuation SANitaire

ExPEC : *Extra-intestinal Pathogenic E. coli*

FAO : *Food and Agriculture Organization* - Organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation

LISTE DES ABRÉVIATIONS

FEC : Fujisawa *E. coli* (Japon)

FEDER : Fond Européen de Développement Régional

FELIN : Fédération réunionnaise de Lutte contre les Infections Nosocomiales

fimH : *fimbriae* de type H

FOX : céFOXitine

FRI : *FR*ench *Imipenemase*

GES : *Guyana Extended Spectrum*

GHER : Groupement Hospitalier Est Réunion

GHSR : Groupement Hospitalier Sud Réunion

HCSP : Haut Conseil de Santé Publique

IBC : *Integron-Borne Cephalosporinase*

ICE : *Integrative and conjugative element*

IDE : Infirmier Diplômé d'Etat

IMI : *IM*ipenemase

IMP : *IM*iPenemase

InPEC : *Intestinal Pathogenic E. coli*

INSEE : Institut National de la Statistique et des Études Économiques

INSERM : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale

INVS : Institut National de Veille Sanitaire

IPS : Index Proportionnel de Similarité

IS : *Insertion Sequence*

ISCR : *Insertion Sequence Common Region*

JH : Journées d'Hospitalisation

KPC : *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*

LAT : LATamoxef

MBL : Métallo-Bêta-Lactamase

MCO : Médecine Chirurgie Obstétrique

MIR : *MIR*iam hospital (Etats-Unis)

MOX : MOXalactam

LISTE DES ABRÉVIATIONS

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

NDM : *New-Dehli Metallo-beta-lactamase*

NmcA : *Non-metallo-carbapenemase A*

OIE : Organisation mondiale de la santé animale (anciennement Office International des Épizooties)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OMV : *Outer Membrane Vesicles*

OXA : OXAcillinases

Pb : Paires de bases

PCC : Précautions Contact Complémentaire

PCR : *Polymerase chain reaction*

PDR : *Pan Drug Resistant*

PER : *Pseudomonas Extended Resistance*

PFGE : *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

pMLST : *plasmid Multi-Locus Sequence Typing*

PPR : Programme Prioritaire de Recherche

PSE : *Pseudomonas Specific Enzyme*

RESAPATH : Réseau d'Epidémiologie-Surveillance de l'Antibiorésistance des bactéries PATHogènes animales

RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SANC : *Structural Alignment-based Numbering of class C beta-lactamases*

SHV : *Sulf-Hydryl Variable*

SFC : *Serratia fonticola Carbapenemase*

Sme : *Serratia marcescens enzyme*

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

SOOI : Sud-Ouest Océan Indien

SPF : Santé Publique France

SSR : Soins de Suite et Réadaptation

STEP : STation d'ÉPuration

TEM : TEMoreira

TIME : *Tn3-derived Inverted-repeat Mobile Element*

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Tn : Transposon

TOHO : *Toho University School of Medicine Omori Hospital* (hôpital de la ville de Tokyo au Japon)

TRI : TEM Résistantes aux Inhibiteurs

UNESCO : *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*

VCC : *Vibrio cholerae* Carbapenemase

VEB : *Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamase*

VIM : *Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase*

XDR : *eXtensively-Drug Resistant*

WGS : *Whole genome sequencing*

PRÉAMBULE

« **Les antibiotiques sont nés d'une tragédie ...** » (*The antibiotic paradox*, Stuart B. Levy) ; leur inefficacité complète sur des germes toto-résistants nous amenant à une ère post-antibiotique ne serait-elle pas tout aussi tragique ? (1) Dans cette citation correspondant au chapitre 1 du célèbre livre sur l'antibiorésistance de Stuart B. Levy, l'auteur nous rappelle comment le miracle des antibiotiques a débuté aux Etats-Unis. Nous sommes le 29 novembre 1942, au milieu de la seconde guerre mondiale, et « quatre cent cinquante personnes trouvent la mort dans l'incendie du Coconut Grove » (*The Boston Herald*), une discothèque de Boston, et « des centaines d'autres blessés » sont à déplorer suite à « la panique dans le Coconut Grove, transformé en brasier infernal » (*The Boston Sunday Globe*). « Cette tragédie est à l'origine d'un autre évènement que l'on considère aujourd'hui comme tout aussi important que l'incendie lui-même : l'essai d'un nouveau médicament que l'on ne pouvait se procurer que par les voies officielles » : la pénicilline. Outre l'utilisation d'un antibiotique appartenant à la classe des sulfamides récemment découverte, la sulfadiazine, les 200 victimes ayant survécu aux 24 premières heures ont pu bénéficier au sein du Massachusetts General Hospital « d'un nouveau médicament destiné à prévenir les infections mortelles bactériennes. La société Merck&Compagnie, établie à Rahway dans le New Jersey, avait fait parvenir en urgence un stock de trente-deux litres d'un médicament, sans prix, à cet hôpital ... la pénicilline – car c'est bien d'elle qu'il s'agissait – n'arrivait pas sous une forme pure, mais livrée dans le liquide de culture contenant la moisissure, *Penicillium (notatum)*, qui l'avait produite ». Cette livraison « en urgence » avait été motivée par les connaissances partielles de l'époque sur la capacité de la pénicilline à combattre « le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*), une bactérie qui contamine souvent les plaies des victimes du feu ». « Avant l'épisode du Coconut Grove, aucun agent antimicrobien connu ne permettait de lutter contre cette bactérie. Une fois l'infection déclarée, la plupart des patients mouraient. Les staphylocoques étaient également responsables de l'échec des greffes de peau ».

En se replongeant dans cet épisode et cette mise en application pour la première fois de cette substance dite « miraculeuse », on comprend en quoi les antibiotiques allaient devenir une des grandes révolutions médicales du XX^{ème} siècle. En effet, avant cette découverte, les patients brûlés issus d'un tel incendie seraient quasi tous morts soit de déshydratation (les médecins de Boston ayant également pour la 1^{ère} fois testé une nouvelle thérapeutique de lutte contre la déshydratation par injection intraveineuse de plasma), soit d'infection bactérienne. Cet évènement a été crucial dans la mesure où le succès des greffes de peau et du traitement de ces brûlés (transformé en un véritable premier essai clinique sur un antibiotique), a convaincu le gouvernement américain d'aider les

PRÉAMBULE

industries pharmaceutiques à produire ce médicament à grande échelle. Il faut savoir que si la pénicilline a été découverte par sérendipité en 1928 dans le laboratoire d'Alexander Fleming à Londres, elle n'a pu être utilisée de manière industrielle qu'à partir de la seconde guerre mondiale, et en premier lieu dans l'armée américaine. Ce sont les 2 scientifiques anglais Howard Florey et Norman Heatley qui ont permis de produire et de purifier la molécule, et de la faire connaître aux Etats Unis à partir de l'été 1941. Les contraintes économiques imposées par la guerre n'en permettaient pas la production à grande échelle en Grande-Bretagne.

Mais ce livre, écrit en 1982, est surtout très contemporain dans la mesure où il mentionne et détaille clairement les premières prédictions « de risque de résistance à cet antibiotique en cas de mauvaise utilisation, en conduisant à sélectionner et à propager des formes mutantes de bactéries résistantes au médicament ». Ces prédictions avaient été émises par Alexander Fleming dans un article dans le *New York Times* dès 1945. Ce livre de Stuart B. Levy est déroutant pour les jeunes microbiologistes que nous sommes car il détaille il y a près de 40 ans avec une précision déconcertante le phénomène de grande ampleur que nous connaissons tous aujourd'hui.

La question naturelle qui se pose étant : mais pourquoi n'avons-nous pas réussi à anticiper ce phénomène alors que le domaine de la médecine de prévention a tant progressé au cours du XX^{ème} siècle, notamment par l'intermédiaire de la vaccinologie. Est-ce la croyance (ou la confiance) de l'Homme envers lui-même à inventer sans cesse de nouvelles molécules ? Est-ce le nombre de morts infiniment petit par rapport au nombre de patients sauvés ? Ou bien l'opposition entre bénéfice individuel et bénéfice collectif qu'il est difficile d'appliquer lorsque l'on est un médecin face à la demande insistante d'un patient lors d'une consultation ? Ce phénomène est très probablement multifactoriel et complexe, et implique également la perception qu'à la population générale de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Ce phénomène n'est finalement palpable que pour une fraction infime de la population générale, à savoir les patients infectés, leurs familles et les personnels soignants médicaux et paramédicaux intervenant dans leur prise en charge. Une prise de conscience sociétale de la résistance aux antibiotiques est probablement un des levier qu'il faudra savoir actionner pour limiter ce phénomène (2).

Aujourd'hui les Agences Régionales de Santé (ARS) se structurent suite à l'instruction de la DGS du 15 mai 2020 : après les centres de conseil en antibiothérapie (CCA), les ARS doivent désormais piloter la mise en place des CRATb (Centres Régionaux en Antibiothérapie), sur le même modèle que les CPIAS (Centres d'appui pour la Prévention des Infections Associées aux Soins), ainsi que leurs bras armés, les EMA (Équipes Multidisciplinaires en Antibiothérapie) (3). En effet, à l'instigation du Pr C. PULCINI, les CRATb vont plus loin et auront « des missions d'expertise et d'appui ... dans le bon usage

PRÉAMBULE

des antibiotiques (BUA) et un rôle de coordination et d'animation des réseaux de professionnels de santé en charge de la mise en place des programmes de BUA. Ils seront constitués *a minima* d'un infectiologue et d'un médecin généraliste ». Les EMA auront, elles, le « rôle d'effecteur de la politique régionale de BUA au niveau local. Elles seront constituées *a minima* d'un infectiologue, d'un microbiologiste, d'un pharmacien et d'un infirmier formé en infectiologie ». Ces fonctions vont donc bien au-delà du traditionnel « avis en antibiothérapie » et consiste en des actions de réorganisation, de promotion, de communication, de sensibilisation et de formation dans la lutte contre l'antibiorésistance en se donnant les moyens humains d'y parvenir. Les microbiologistes peuvent (pour ne pas dire, doivent) prendre part à cette évolution organisationnelle. En tant qu'intermédiaire et prestataire de conseil, ils peuvent influencer ce cercle vertueux de réduction de la consommation des antibiotiques comme ont réussi à le faire les vétérinaires. Certaines pistes comme par exemple le rendu plus rapide des sensibilités aux antibiotiques ou les antibiogrammes ciblés, doivent être évalués pour parvenir à cet objectif. C'est ce que nous tentons de faire activement à La Réunion avec la participation des microbiologistes à ces deux entités nouvellement constituées. **Préférons ainsi l'espoir et l'action inter-disciplinaire à la tragédie.**

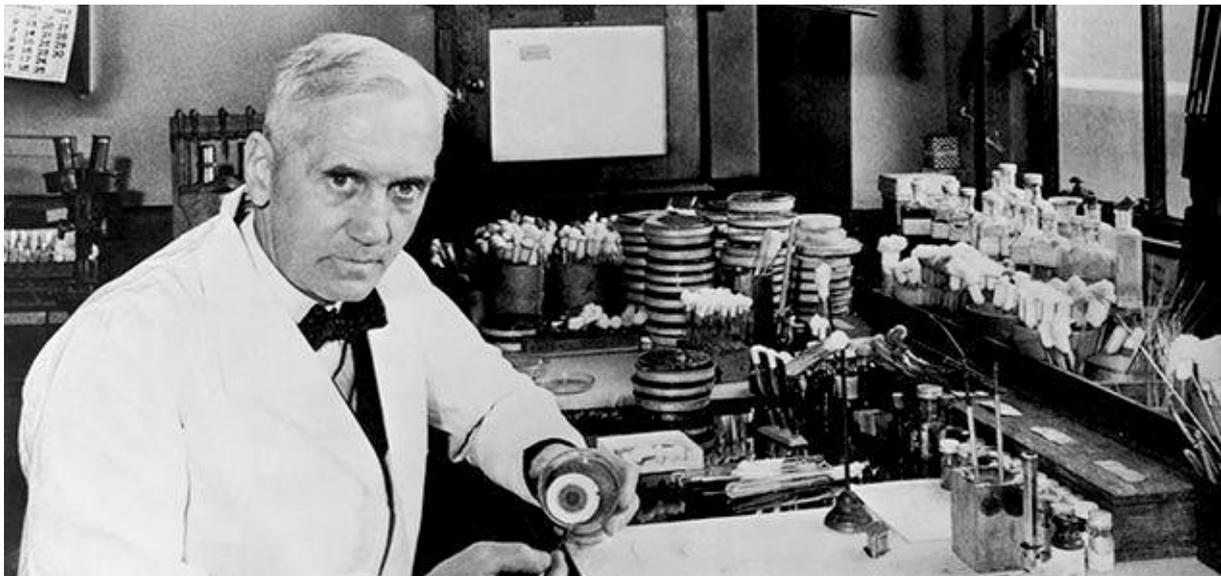


Photo d'Alexander Fleming dans son laboratoire du Saint Mary's Hospital, à Londres en 1928.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans la seconde partie du XIX^{ème} siècle, les antibiotiques ont été à l'origine d'une grande révolution sanitaire permettant de traiter de nombreuses infections bactériennes. Aujourd'hui, les santés humaine et vétérinaire sont menacées par le développement des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques. Depuis les années 2000, une augmentation significative de l'incidence globale des bactéries multi-résistantes (BMR) a été observée ; l'émergence puis la diffusion pandémique des entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu de type CTX-M (EBLSE) représentant indubitablement le principal problème à l'heure actuelle. Depuis les années 2010, l'émergence de souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) fait craindre une nouvelle pandémie. En France, ces EPC ont été qualifiées de bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe) par le Haut Conseil de Santé Publique (HCSP). La diffusion des EBLSE et des EPC pose aujourd'hui problème dans la mesure où elles limitent fortement les alternatives thérapeutiques en cas d'infection et pourrait aboutir à terme à des impasses thérapeutiques.

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif pour la plupart commensaux du tube digestif de l'Homme. En fonction de leurs facteurs de virulence, celles-ci peuvent constituer des pathogènes strictes (*Shigella* sp ou *Salmonella* sp) ou des pathogènes plus opportunistes (telles que *Providencia* sp ou *Morganella* sp) ne provoquant une infection que dans certaines conditions favorables, notamment liées à l'hôte. *Escherichia coli* représente quantitativement le germe aéro-anaérobie facultatif le plus abondant de la flore digestive (10^6 à 10^9 bactéries par gramme de selles). Cette bactérie, normalement inoffensive pour l'homme, peut acquérir différents facteurs de virulence et devenir pathogène aboutissant à plusieurs types d'infections digestives et extra-digestives (4). Il s'agit du premier germe responsable d'infections communautaires et nosocomiales en France (5). Les autres entérobactéries dominantes dans les infections sont *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* et *Proteus mirabilis* (5). En parallèle, certaines souches d'entérobactéries sont capables d'échanger des informations génétiques entre elles ou avec d'autres bactéries présentes dans le même environnement ou microbiote. Ces transferts de gènes peuvent engendrer l'acquisition des gènes de résistance, *via* des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons), et aboutir à cette multi-résistance aux antibiotiques. Dans certaines conditions, les entérobactéries peuvent également être affectées par des mutations « favorables » pouvant aboutir à la résistance à une ou plusieurs classes d'antibiotiques. Cette évolution des résistances bactériennes constitue aujourd'hui un problème majeur de Santé Publique en France et à l'échelle mondiale.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

En avril 2014, l'OMS a publié pour la première fois un rapport alarmant sur les émergences et la diffusion des BMR/BHRe tout en soulignant l'insuffisance de données dans les pays en voie de développement, et notamment en Afrique, pour mieux appréhender ces phénomènes (6,7). La même année, le rapport O'Neill (*The review on Antimicrobial resistance*) prévoyait que l'antibiorésistance deviendrait la 1^{ère} cause de décès dans le monde en 2050 avec dix millions de morts par an, et que ce lourd tribut serait principalement payé par les pays en voie de développement d'Afrique et d'Asie (8). En janvier 2019, Cassini et al. concluaient, à partir des données de 2015 recueillies par le réseau EARS-Net, que l'antibiorésistance était responsable de 33 000 décès par an en Europe, dont 5 500 en France (9). En France, en 2015, un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (INVS) évaluait la mortalité liée aux infections à BMR à 12 500 morts par an (10). En novembre 2016, le Ministère de la Santé a acté la création d'un « Comité interministériel pour la santé pour la maîtrise de l'antibiorésistance » dont un des axes est le « renforcement de l'organisation de la surveillance, incluant l'analyse et la mesure d'impact de la résistance bactérienne dans l'environnement » avec l'objectif de diminuer de 25% la consommation des antibiotiques en médecine humaine d'ici 2024 (11). La récente instruction de la DGS du 15 mai 2020 arrêtant la création des CRAtb et des EMA fait suite aux conclusions de ce groupe de travail. En parallèle, un plan prioritaire de recherche (PPR) de 40 millions d'euros coordonné par l'ANR et l'INSERM nommé « Antibiorésistance : comprendre, innover, agir » a été lancé en 2020 et abouti à un appel à projets dont les délibérations finales ont eu lieu en janvier 2021 (12). Onze projets nationaux de grande ampleur ont été sélectionnés pour lutter contre l'antibiorésistance en France. Ce PPR insistait sur le fait que le problème de l'antibiorésistance était multifactoriel. Il avait pour objectif de « structurer et de rassembler l'action de la communauté scientifique dans une stratégie *One Health* et interdisciplinaire, pour faire émerger des connaissances et des innovations, porteuses de stratégies et solutions nouvelles pour résoudre la crise des antibiotiques » (13). Aujourd'hui, l'ensemble des sociétés savantes encourage à investiguer le problème de l'antibiorésistance dans une approche non anthropocentrique de type *One Health*, en considérant que la santé de l'Homme n'est pas restreinte à lui-même, mais qu'elle peut également être influencée par son environnement.

Les particularités biogéographiques et sanitaires des îles de la région occidentale de l'Océan Indien (La Réunion, Les Comores/Mayotte, Les Seychelles, Madagascar, Maurice) représentent à la fois un défi pour la mise en place de politiques de santé et un contexte favorable à l'étude des émergences et diffusion de l'antibiorésistance. Du fait de leur isolement géographique et de leur taille généralement très limitée, les diversités biologiques et environnementales que l'on rencontre sur la plupart des îles, excepté Madagascar, sont relativement réduites par comparaison à celles des continents. Les émergences épidémiques qui arrivent à s'y dérouler peuvent avoir des diffusions singulières et explosives. À La Réunion, les souches de BMR et de BHRe sont dépistées et surveillées

INTRODUCTION GÉNÉRALE

dans le milieu hospitalier, mais très peu de données existaient au début de ce travail sur la diffusion de ces bactéries dans le milieu communautaire chez l'Homme, chez les animaux ou dans l'environnement. De plus, les données sur le phénomène de l'antibiorésistance sont quasi inexistantes dans les îles avoisinantes qui entretiennent des échanges commerciaux et des mouvements de populations importants avec La Réunion. La Réunion, et notamment son Centre Hospitalier Universitaire (CHU) considéré comme l'hôpital de référence dans la zone, est ainsi soumise à une forte pression d'importation de ces germes multi-résistants. Elle constitue ainsi un environnement de choix puisqu'à la fois cloisonnée géographiquement mais également sujette à une prévalence hospitalière importante en BMR et BHRé. Elle peut ainsi constituer un lieu d'étude original dans cette approche *One Health* qui prend en compte les différents biotopes potentiellement source et/ou réservoirs de transmission, incluant l'Homme, l'animal et l'environnement.

Dans ce contexte, mon projet de thèse était de mieux comprendre l'émergence et la dynamique de diffusion des entérobactéries multi- et hautement résistantes dans les deux départements d'Outre-Mer (DOM) étroitement liés que sont La Réunion et Mayotte. Dans une première partie, une revue de la littérature et de l'état de l'art concernant le phénomène de l'antibiorésistance sont présentés comprenant 319 références. Dans une seconde partie, le principal travail scientifique a consisté à étudier la diffusion des isolats de *E. coli* BLSE à La Réunion dans une approche *One Health* Homme, animal et environnement. Les résultats expérimentaux ont consisté à identifier plus précisément les principaux clones bactériens vecteurs de ces résistances ainsi que les supports génétiques de ces résistances. La fin de cette seconde partie est consacrée à la discussion générale des travaux et aux perspectives entrevues pour la continuité de ces recherches.

1^{ère} PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE ET ETAT DE L'ART

1 Résistances aux bêta-lactamines chez les entérobactéries

La résistance aux bêta-lactamines chez les entérobactéries est essentiellement due à des mécanismes enzymatiques à savoir la synthèse de bêta-lactamases. Ces enzymes, présentent naturellement chez la bactérie ou acquises par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons, ICE pour *Integrative and Conjugative Element*), sont synthétisées dans le cytoplasme puis se concentrent dans l'espace périplasmique des bacilles à Gram négatif. Elles sont alors capables d'hydrolyser les bêta-lactamines dès leur entrée dans la bactérie et avant qu'elles n'atteignent leur cible, rendant de ce fait le traitement par ces molécules inefficace.

1.1 Classification des bêta-lactamases

Il existe plusieurs classifications des bêta-lactamases dont deux sont principalement utilisées : la classification structurale de Ambler et la classification fonctionnelle de Bush et Jacoby (14,15). Ces classifications se basent sur la structure moléculaire de ces enzymes, leur spectre d'hydrolyse ou leur sensibilité à certains inhibiteurs. Ces deux classifications sont complémentaires, mais on utilise davantage celle de Ambler en microbiologie clinique en raison de sa simplicité.

1.1.1 La classification de Ambler

Cette première classification, datant de 1980, est basée sur la structure primaire des bêta-lactamases et notamment celle de leur site actif (14). Elle distinguait initialement les bêta-lactames de classe A à sérine active des métallo-bêta-lactamases de classe B caractérisées par la présence d'un ou plusieurs ions divalent Zn^{2+} au niveau de leur site actif. Les enzymes de classe C, correspondant aux céphalosporinases, et celles de classe D correspondant aux oxacillinases, ont ensuite été ajoutées. Cette classification présente l'avantage d'être simple et stable dans le temps.

1.1.2 La classification de Bush et Jacoby

La classification fonctionnelle de Bush et Jacoby est plus complexe et est basée sur le spectre d'hydrolyse de chaque enzyme ainsi que de leur sensibilité à certains inhibiteurs (acide clavulanique ou tazobactam ; et EDTA). Initialement décrite en 1989, elle a été actualisée deux fois en 1995 et 2009 (15,16).

Tableau 1. Classification fonctionnelle de Bush et Jacoby des bêta-lactamases avec correspondance avec la classification de Ambler. D'après Bush et Jacoby (15).

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class by Ambler (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	E. coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NIb	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxymino- β -lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiofime	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxymino- β -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxymino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	NDM-1, IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1

^a CA : clavulanic acid ; TZB : tazobactam

Cette classification compte 3 groupes principaux (Tableau 1) :

- Le groupe 1 correspondant aux céphalosporinases non inhibées par l'acide clavulanique, le tazobactam ou l'EDTA. Ces enzymes sont par ailleurs inhibées par la cloxacilline.
- Le groupe 2 correspondant aux bêta-lactamases à sérine active : ce groupe est donc le plus étoffé intégrant les pénicillinases, les oxacillinases, les bêta-lactamases à spectre étendu ainsi que des carbapénèmases, majoritairement inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam et non inhibées par l'EDTA.
- Le groupe 3 correspondant aux métallobêta-lactamases à activité carbapénèmase, inhibées par l'EDTA.

1.2 Résistances aux céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération

1.2.1 Les céphalosporinases

Les entérobactéries peuvent acquérir une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) par 2 mécanismes de production d'une céphalosporinase :

- Elles peuvent soit déréguler leur céphalosporinase chromosomique naturelle AmpC suite à des mutations dans le gène répresseur *ampD*. C'est le cas des entérobactéries du groupe 3 telles que *E. cloacae*, *C. freundii*, *Serratia marcescens*, ... Cette résistance n'étant pas transférable, nous ne la détaillerons pas dans ce manuscrit.
- Elles peuvent acquérir des céphalosporinases plasmidiques issues de bactéries pathogènes opportunistes ou environnementales dites « progénitrices » de AmpC (17).

La 1^{ère} céphalosporinase plasmidique a été décrite en 1989 par **Bauerfeind et al.** : il s'agissait d'une céphalosporinase de type CMY-1 acquise par une souche de *K. pneumoniae* probablement à partir d'un transfert plasmidique provenant de l'espèce *Aeromonas hydrophila* (18). Plusieurs autres céphalosporinases plasmidiques ont ensuite été décrites chez des entérobactéries responsables d'infections communautaires ou nosocomiales, animales ou environnementales. Ces céphalosporinases ont été classées en 5 groupes en fonction de leur degrés d'homologie avec les céphalosporinases chromosomiques de 5 principaux progéniteurs (17) :

- Le groupe *Aeromonas spp.* composé de 2 sous-groupes : le groupe CMY-1, CMY-8 à 11, CMY-19 et MOX-1/2 et le groupe des enzymes de type FOX
- Le groupe *C. freundii* comprenant CMY-2 à 7, CMY-12 à 18, CMY-21 à 23, LAT-1 et CFE
- Le groupe *E. cloacae* complexe comprenant les enzymes ACT-1 et MIR-1
- Le groupe *M. morgani* avec les enzymes DHA
- Le groupe *Hafnia alvei* avec les enzymes ACC (ACC-1 ayant la particularité de ne pas conférer de résistance à la céfoxitine).

Tableau 2. Listes des différentes bêta-lactamases de classe C avec les insertions et délétions par rapport à l'enzyme AmpC de la souche de *E. cloacae* complex P99 (19).

Class C β-lactamase	NCBI accession no.	Insertions and deletions relative to <i>E. cloacae</i> complex P99a
ACC-1	WP_032491956.1	-116, +204a, +247a, -289, -290, +362, +363
ACT-1	WP_063857727.1	-361
ADC-7	WP_063857816.1	+0, +204a, -245, -304, -305, -306, +362
ADC-8	WP_004923134.1	+0d, +0c, +0b, +0a, +0, -245, +362, +363, +364, +365, +366, +367
AQU-1	WP_099156042.1	-1, -2, +204a, -243, -245, -301, -302, +362
<i>Burkholderia multivorans</i> AmpC1	WP_012218336.1	+204a, -245, +362, +363, +364
BUT-1	WP_104531863.1	+0a, +0
CepH	WP_063843234.1	-1, -2, +204a, -243, -245, +362
CepS	WP_063843235.1	-1, -2, +204a, -243, -245, +362
CFE-1	WP_032490699.1	None
CMA-1	WP_032974004.1	-1, -2, -3, -4, -5, -6, -116, +204a, -245, +362
CMH-1	WP_063859580.1	None
CMY-2	WP_000976514.1	None
CSA-1	WP_007888761.1	-1, -2, -3, -4, -5, -6, -116, +204a, -245, +362
DHA-1	WP_004236386.1	-1, -2, -3, -4, -301
<i>Escherichia coli</i> AmpC	WP_001336292.1	-1, -2, -3
EC-5	WP_001443153.1	-1, -2, -3
<i>Edwardsiella</i> AmpC	WP_041692555.1	+0a, +0
FOX-4	WP_032489727.1	-1, -2, +204a, -243, -245, +362
LHK-1	WP_081666691.1	-1, -2, -3, -4, +204a, -245
LRA-10	WP_099982803.1	-1, -126, +204a, -245, -361
LRA-18	WP_099982801.1	-1, -245, -311, +362, +363, +364, +365
<i>Mycobacterium smegmatis</i> AmpC	WP_011729443.1	-1, -2, -3, -4, -5, -6, +204a, -245, -305, -306, +362
MIR-1	WP_032489464.1	None
MOX-1	WP_032489888.1	+0, +204a, -243, -245, -301, -302, -303, +362
OCH-1	WP_040129485.1	+0, +204a, -245, +362, +363, +364
PAC-1	WP_034051940.1	-1, -2, -3, -4, -5, -116, +204a, -245, +362 +125a, +204a, -245, +362, +363, +364, +365, +366, +367, +368, +369, +370
PDC-1	WP_003101289.1	
SRT-1	WP_063864749.1	-1, -2, -3, -4, -5, -6, -116, +204a, -245, +362, +363
SST-1	WP_063864750.1	-1, -2, -3, -4, -5, -6, -116, +204a, -245, +362, +363
TRU-1	WP_042027926.1	-1, -2, +204a, -243, -245, +362

Un moins (-) indique une délétion, et un plus (+) une insertion. Les lettres ajoutées indiquent qu'une insertion suit un numéro de résidu donné.

Il est à noter que les céphalosporinases plasmidiques ACC-1, ACT-1, DHA-1, DHA-2 et CMY-13 sont inductibles car le gène *ampC* est accompagné du gène régulateur *ampR*. Certaines céphalosporinases telles que CMY-33, CMY-44 sont résistantes également aux céphalosporines de 4^{ème} génération (C4G) comme le céfépime.

Très récemment, *Mack et al.* ont proposé une numérotation standardisée des résidus d'acides aminés (AA) des bêta-lactamases de classe C pour harmoniser les échanges dans la communauté scientifique (19). Ils proposent ainsi une numérotation des AA basée sur l'alignement structurel des bêta-lactamases de classe C (appelé schéma « SANC »), ou bien le terme plus simple de "position structurelle" de chaque AA par alignement sur la séquence d'acides aminés de la forme mature de la P99 AmpC initialement caractérisée chez une souche d'*E. cloacae* complexe (ou plus précisément d'un *Enterobacter hormaechei* [numéro d'accès GenBank CAA30257.1]). Il est cité dans cet article une liste actualisée de 2020 de l'ensemble des bêta-lactamases de classe C et de leur insertions/délétions par rapport à la souche de *E. hormaechei* P99 (Tableau 2).

CMY-2 est la céphalosporinase plasmidique qui a le plus diffusée dans le monde et notamment chez des souches animales de *Salmonella sp.* En France, DHA-1 est l'enzyme la plus représentée (57,4%) dans les souches d'entérobactéries résistantes aux C3G reçues par le Centre National de Référence (CNR) de la Résistance aux antibiotiques de Clermont-Ferrand (20). Cette diffusion est prépondérante chez les souches de *K. pneumoniae* (90,2%) alors que chez *E. coli*, c'est l'enzyme CMY-2 qui domine (76,9%). L'enzyme CMY-2 occupe le deuxième rang des céphalosporinases toutes espèces confondues avec 22,3% (20). Ces céphalosporinases médiées par des plasmides sont problématiques dans le sens où ces plasmides sont également porteurs de gènes de résistance à d'autres classes d'antibiotiques telles que les aminosides, les fluoroquinolones, les sulfamides ou la tétracycline ; ou d'autres gènes codant pour d'autres bêta-lactamases (PSE-1, TEM-1, CTX-M, SHV, VIM).

1.2.2 Les bêta-lactamases à spectre étendu

Les bêta-lactamases à spectre étendu sont des enzymes qui ont « élargi » leur spectre d'hydrolyse aux C3G et partiellement aux C4G. Ces enzymes possèdent un spectre de substrat large incluant les pénicillines, les céphalosporines, l'aztréonam mais épargnent les céphamycines et les carbapénèmes. La très grande majorité des BLSE sont des enzymes de la classe A de Ambler (et de la classe 2be de Bush), elles sont ainsi inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam (Annexes 1 et 2). On peut ainsi

observer un phénomène de synergie entre les C3G, les C4G ou l'aztréonam avec l'acide clavulanique. Cette synergie permet la détection phénotypique de ces BLSE sur l'antibiogramme par une zone d'inhibition dit « en bouchon de champagne » ou « en trou de serrure » pour les anglophones. Cette détection est aujourd'hui le plus souvent réalisée par la technique des disques combinés selon les recommandations de l'EUCAST et du CA-SFM : un gain ≥ 5 mm de diamètre du disque combiné de C3G + acide clavulanique par rapport au disque de C3G seule signalant la présence d'une BLSE (21). La première souche d'entérobactérie productrice de BLSE (E-BLSE) a été décrite en 1983 en Allemagne : il s'agissait d'une souche de *K. pneumoniae* synthétisant une enzyme de type SHV-2 (mutant ponctuel de la pénicillinase naturelle SHV-1) (22). Il existe aujourd'hui un très grand nombre de BLSE décrites (>300) et listées par le site <http://www.lahey.org/studies> (23,24).

Il existe 2 catégories de BLSE : (i) les « anciennes » BLSE qui dérivent par mutations ponctuelles des pénicillinases naturelles TEM-1/2 et SHV-1 et (ii) les « nouvelles » BLSE (notamment les enzymes CTX-M) issues de transferts plasmidiques à partir de bactéries environnementales. Si jusque dans les années 1990, la majorité des BLSE étaient les enzymes de type TEM/SHV détectées en milieu hospitalier, on a assisté à partir de 1995 à une explosion des enzymes de type CTX-M responsables de la majorités des infections à E-BLSE, tant hospitalières que communautaires (25).

1.2.2.1 Les « anciennes » BLSE : TEM et SHV

Les anciennes BLSE sont issues de mutations ponctuelles survenues chez des pénicillinases à spectre étroit TEM-1/-2 (TEMoneira) et SHV-1 (SulfHydryl Variable) leur ayant permis d'étendre leur spectre d'hydrolyse. En effet, ces mutations qui affectent le site actif permettent l'hydrolyse des substrats de type C3G et l'aztréonam.

Il existe aujourd'hui près de 250 dérivés de TEM-1/-2 dont plus de 150 ont un phénotype BLSE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#tem>). Les principales mutations responsables du phénotype BLSE, chez les bêta-lactamases de type TEM, surviennent aux positions 238(Gly→ser), 240(Glu→Lys), 104(Glu→Lys) et 164(Arg→Ser ou Arg→His) (Figure 1, 24). La plupart des structures entourant les gènes *bla*_{TEM} BLSE dérivent d'une structure commune de type transposon Tn3 (26). Le gène *bla*_{TEM-52} a été à de nombreuses reprises associé à des plasmides de type Inc11 mais aussi sur des plasmides de type IncA/C, IncN et IncX (26).

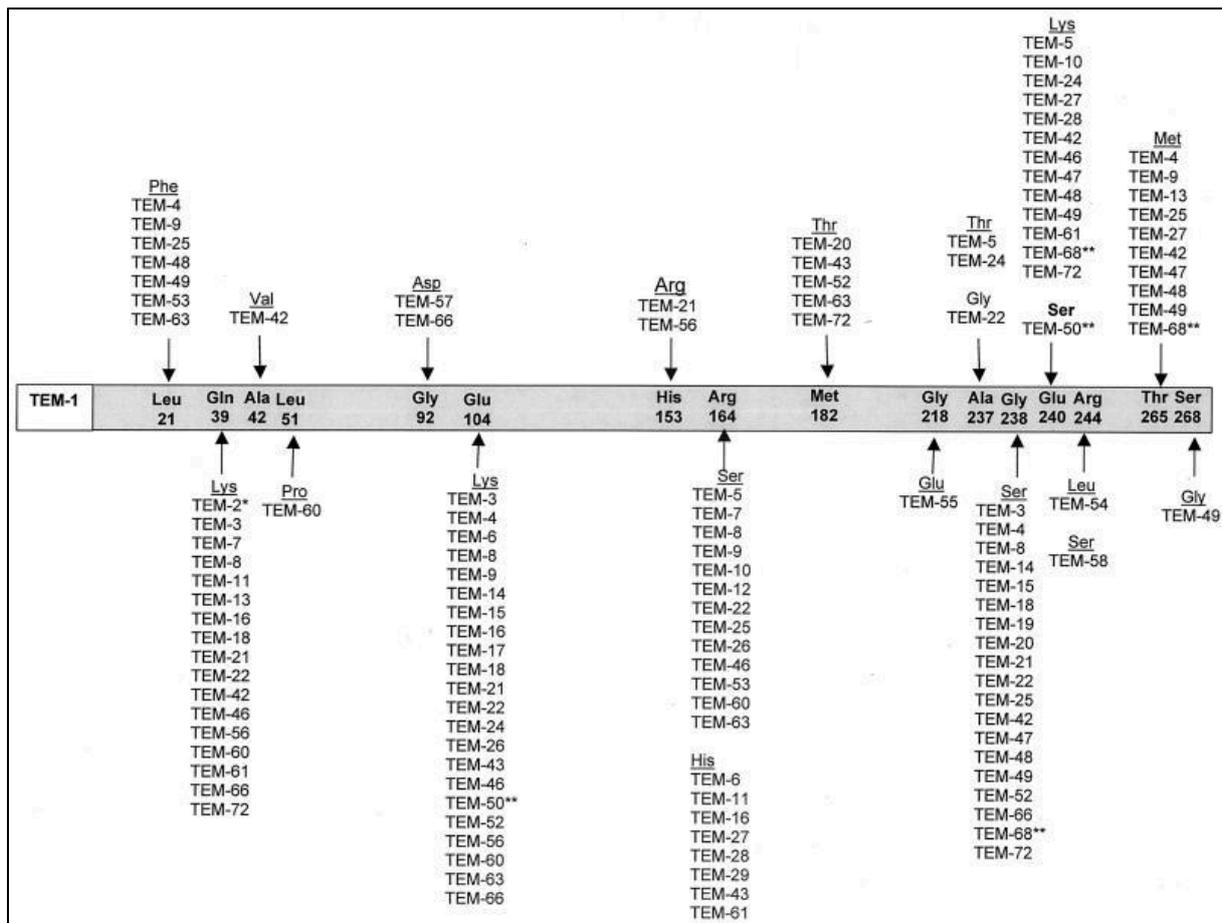


Figure 1. Substitutions en acides aminés des dérivés BLSE (et autres) de type TEM. D'après Bradford *et al.* (24)

*variant pénicillinase, ** variant TRI

La première enzyme BLSE de type SHV, SHV-2, a été décrite en 1983 et a été détectée dans une souche de *Klebsiella ozaenae* isolée en Allemagne (22,27). On compte aujourd'hui environ 230 dérivés de l'enzyme SHV-1 dont près de 120 avec un phénotype BLSE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#shv>). A l'image des enzymes de type TEM, la grande majorité des mutations a lieu dans des « hot spots » qui sont les positions 238(Gly→Ser) et 240(Glu→Lys) (Figure 2, 24). La majorité des enzymes SHV BLSE a été détectée chez *K. pneumoniae* ou *E. coli* (28). Des plasmides appartenant à 7 profils d'incompatibilité ont été décrits comme support des gène *bla_{SHV}* codant pour des BLSE à savoir A/C, F, HI2, I1, L/M, N, X3 (Figure3, 28). Le plasmide de type IncI1-ST5 a plus particulièrement été décrit comme porteur du gène *bla_{SHV-12}* chez l'animal (29). Il est à noter que le gène *bla_{SHV-12}* a été décrit comme appartenant au même déterminant plasmidique que celui codant pour la résistance aux fluoroquinolones QnrB, permettant potentiellement une co-sélection de ces 2 gènes (30).

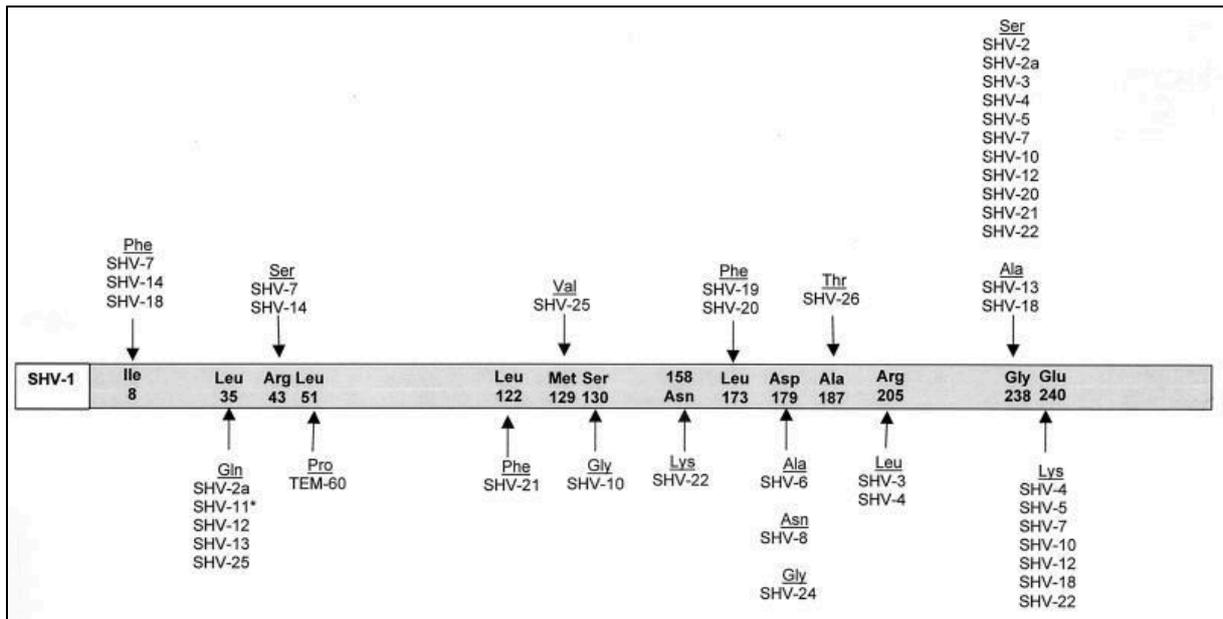


Figure 2. Substitutions en acides aminés des dérivés BLSE (et autres) de type SHV. D'après Bradford *et al* (24).

*variant pénicillinase

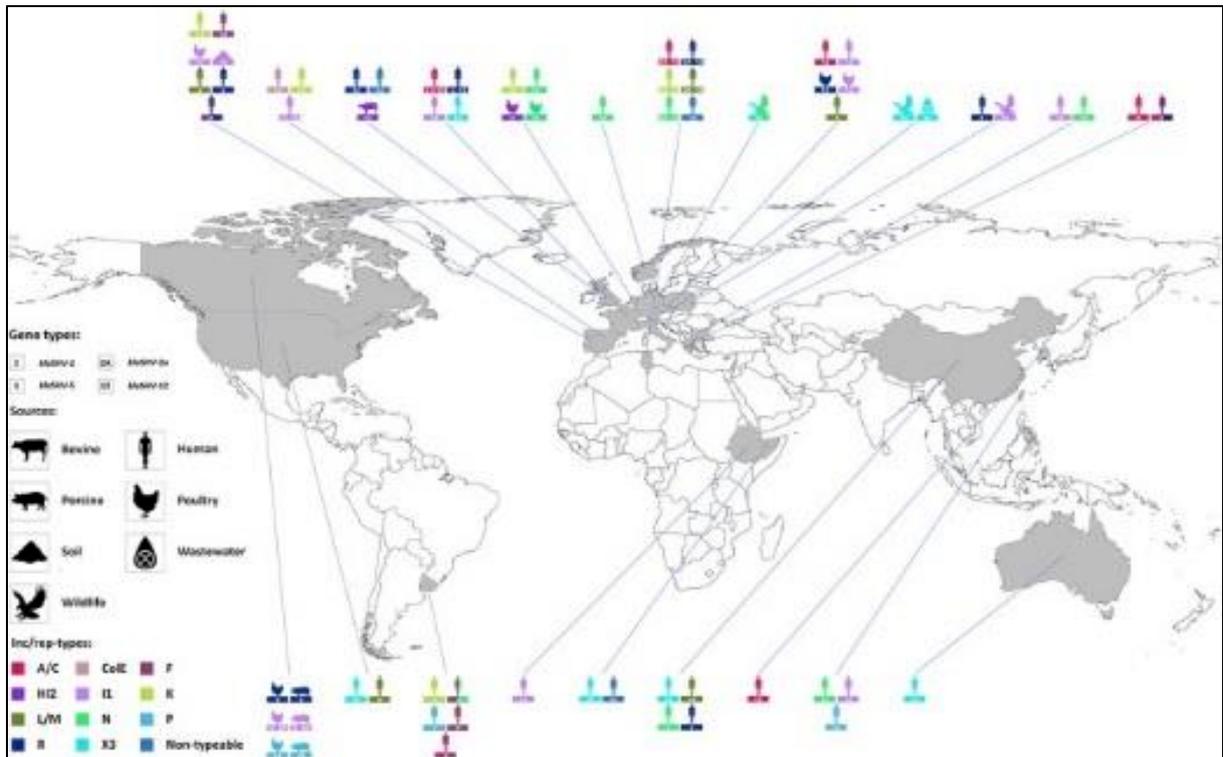


Figure 3. Répartition mondiale des familles de plasmides codant pour les gènes *bla*_{SHV-2}, *bla*_{SHV-2a}, *bla*_{SHV-5} et *bla*_{SHV-12}. D'après Liakopoulos *et al.* (28)

Les profils Inc/rep sont représentés en différentes couleurs. Divers symboles représentent des sources humaines, bovines, porcines, de volaille, de faune sauvage, de sol ou d'eaux usées.

1.2.2.2 Les « nouvelles BLSE » : CTX-M et autres enzymes de classe A

Les enzymes de type CTX-M

Les enzymes CTX-M (pour Céfotaximase décrite pour la 1^{ère} fois à Munich) sont les enzymes BLSE les plus répandues dans le monde (31). Elles ont connu une dissémination exponentielle depuis les années 2000 et sont devenues ultra-majoritaires. À titre d'exemple, elles représentaient 90,1% des souches productrices de BLSE reçues par le CNR de Clermont-Ferrand en 2018 (20). La première enzyme de type CTX-M a été détectée pour la 1^{ère} fois en 1986 au Japon sous le nom de TOHO-1, qui a ensuite été reclassée en CTX-M-44 du fait de son homologie structurale avec cette famille (32). Par contre, les enzymes CTX-M ne sont pas proches structurellement avec les TEM et SHV (<40% d'homologie de séquence) (33). Au niveau de leur spectre de substrat, ces enzymes hydrolysent préférentiellement le céfotaxime (d'où leur nom de céfotaximase), et de manière plus modérée la ceftazidime et l'aztréonam. Certains variants tels que CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27 ou CTX-M-32 sont cependant capables d'hydrolyser la ceftazidime à un niveau plus élevé (33). Cette hydrolyse plus importante de la ceftazidime peut être due à 2 mutations modifiant le site actif de l'enzyme en position 240 (Asp → Gly) de la sous-unité $\beta 3$ ou en position 167 dans la boucle Ω (Figure 4, 34). Ces enzymes sont inhibées par l'acide clavulanique, le tazobactam, l'avibactam ou l'acide boronique.

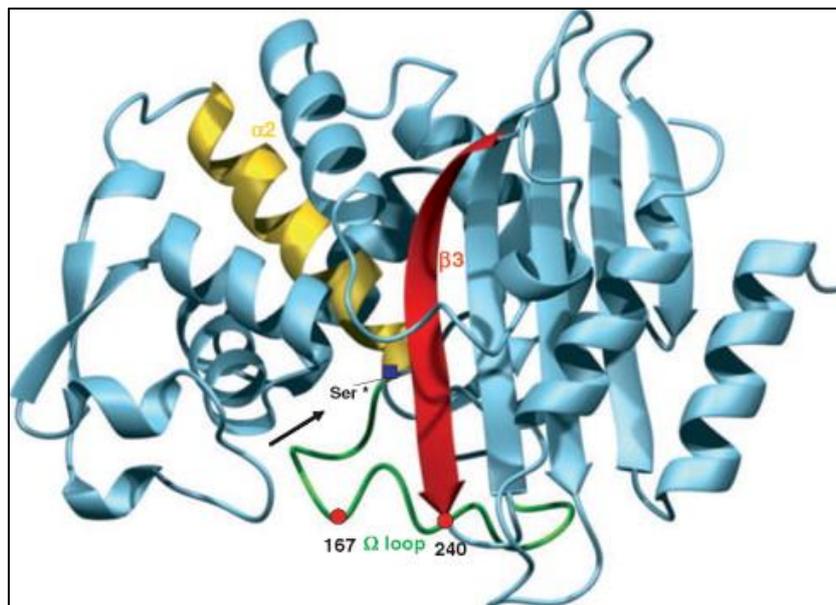


Figure 4. Modulation du spectre de substrat des enzymes de type CTX-M par des mutations ponctuelles. D'après Rossolini *et al.* (34)

À ce jour, 244 variants de CTX-M ont été décrits

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#ctx-m>, recherche du 15/03/2021).

Ces variants sont classés en 7 groupes phylogénétiques distincts (Figure 5, 35) :

- Le groupe CTX-M-1 dont le progéniteur commun est CTX-M-3 et qui comprend notamment CTX-M-15
- Le groupe CTX-M-2 qui comprend le premier variant décrit CTX-M-44 (ou TOHO-1)
- Le groupe CTX-M-8
- Le groupe CTX-M-9 dont le progéniteur commun est CTX-M-14 et qui comprend également CTX-M-27
- Le groupe CTX-M-25
- Le groupe CTX-M-45
- Le groupe CTX-M-64.

Les enzymes de chaque groupe partagent à minima 95,2% d'homologie de séquences. Les 2 enzymes les plus éloignées phylogénétiquement étant CTX-M-4 et CTX-M-45 avec 91 substitutions d'acides aminés.

Depuis les années 2000, les enzymes de type CTX-M sont devenues majoritaires et ont diffusé par plusieurs mécanismes dans le monde entier. Initialement décrites de manière sporadique au Japon (FEC-1), en Europe (MEN-1, CTX-M-1) et en Argentine (CTX-M-2), elles ont connu une croissance exponentielle faisant même évoquer par certains auteurs une « pandémie CTX-M » (36).

Les enzymes de type CTX-M sont le plus souvent portées par des plasmides, même si elles peuvent être chromosomiques. Ce phénomène a participé à leur diffusion à la fois géographique et inter-espèces et aux phénomènes de co-résistance et co-sélection. Mais ce phénomène est complexe et a également mis en jeu d'autres supports génétiques tels que des séquences d'insertion (et notamment *ISEcp1*), des intégrons de classe 1 (associé à la séquence d'insertion *ISCR1*) et même des phages (Annexe 1, 35). Les bactéries progénitrices du gène *bla*_{CTX-M} ont été identifiées comme appartenant au genre *Kluyvera* qui sont des entérobactéries environnementales (*K. ascorbata* pour les enzymes du groupe CTX-M-2, et *K. georgiana* pour les groupes CTX-M-8, -9 et -25 et *K. cryocrescens* pour les enzymes du groupe CTX-M-1/3). A titre d'exemple, l'enzyme chromosomique KLUA-2 de *K. ascorbata* partage 100% d'homologie avec l'enzyme plasmidique CTX-M-5 ou KLUG-1 99% d'homologie de séquence en AA avec CTX-M-8 (37,38).

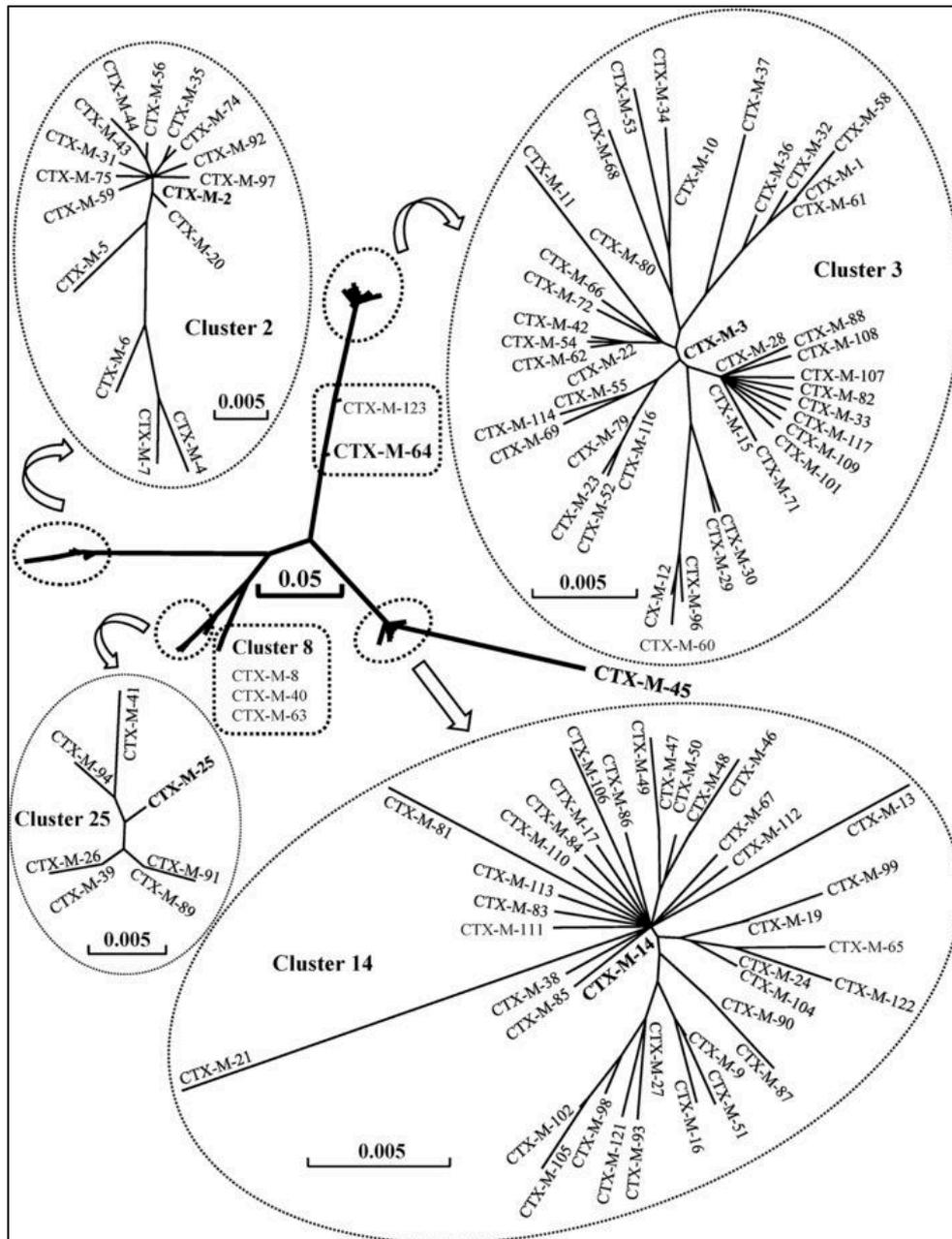


Figure 5. Arbre phylogénétique des enzymes de la famille CTX-M basé sur la séquence des acides aminés. D'après Zhao *et al.* (35)

Un autre phénomène important a été la diffusion dans de nouvelles espèces d'entérobactéries et notamment *E. coli* alors. Cette évolution épidémiologique constitue une menace de santé publique majeure puisque que *E. coli* est à la fois une germe commensal prépondérant du tube digestif chez l'Homme (10^7 - 10^9 *E. coli* par gramme de fèces) et la première cause d'infection nosocomiale et communautaire en France (5,39).

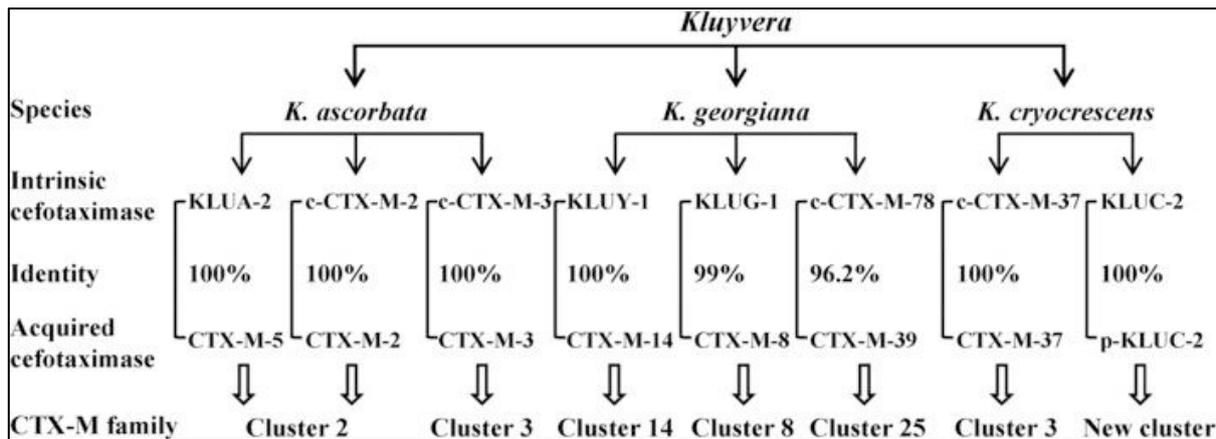


Figure 6. Identification des gènes intrinsèques des céfotaximases chez *Kluvera* spp. comme source originale des enzymes CTX-M acquises sur la base de leurs identités d'acides aminés et des homologies des séquences voisines des gènes associés. D'après Zhao *et al.* (35)

c-CTX-M, CTX-M identifié sur le chromosome de *Kluvera* spp. ; p-KLUC-2, KLUC-2 identifié sur le plasmide dans un isolat clinique de *Enterobacter cloacae*.

Cette « success story » des enzymes CTX-M, et notamment de l'enzyme CTX-M-15, est due à l'association de 2 phénomènes : un transfert « génomique » efficace de gènes de résistance intra- et inter- espèces *via* les plasmides (notamment IncFII, ainsi que le complexe intégron de classe I – ISCR1 et les *ISEcp1* et IS26) et le transfert chez des clones à diffusion inter-continentale comme le clone *E. coli*-O25:H4-ST131 (Figure 7, 37–39).

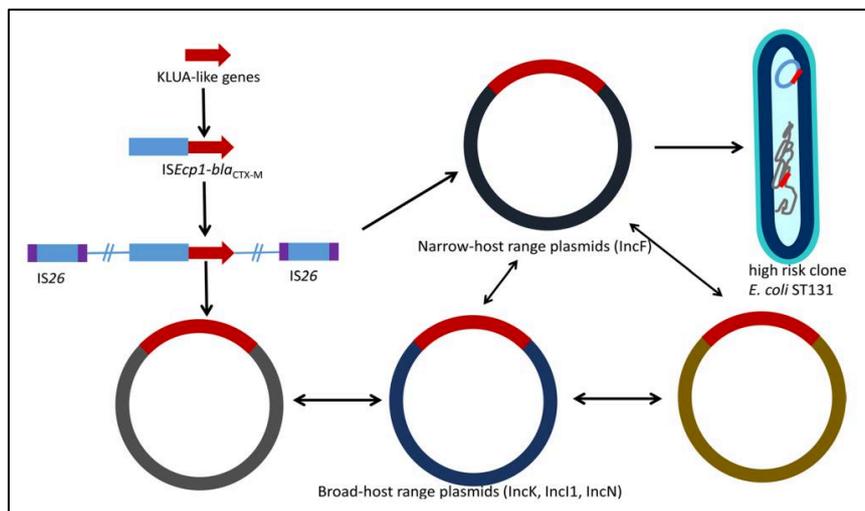


Figure 7. Éléments génétiques mobiles responsables de la capture et de la mobilisation des gènes *bla*_{CTX-M} (42). *ISEcp1* est situé en amont des gènes *bla*_{CTX-M} et est responsable de la capture initiale et de la mobilisation des gènes de type *klua* à partir des chromosomes de *Kluvera* spp. sur des plasmides à spectre d'hôtes étroit (IncF) et à large spectre d'hôtes (c'est-à-dire IncK, IncI1 et IncN). Ces plasmides se sont ensuite retrouvés dans la population de *E. coli*. Les plasmides IncF ont utilisé des systèmes de destruction et d'accoutumance post-ségrégation pour assurer leur propagation parmi les clones à haut risque tel que le clone ST131.

Cette dissémination des enzymes CTX-M chez *E. coli* a abouti à une augmentation importante de la résistance aux C3G chez l'espèce *E. coli* en Europe (1,88% en 2002 vs. 10,8% en 2012, 40) (Figure 8, 43).

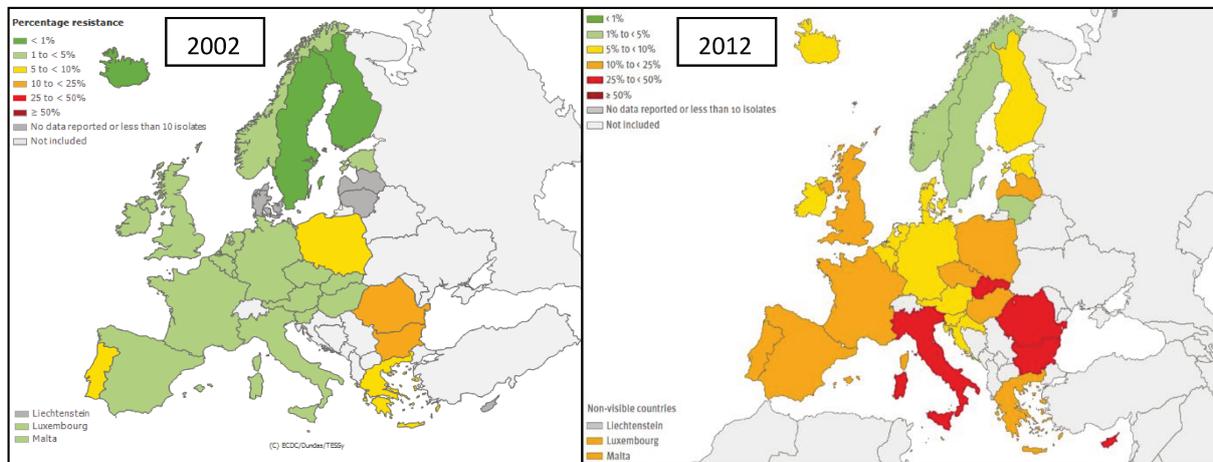


Figure 8. Évolution de la proportion des souches de *E. coli* résistantes ou intermédiaires aux C3G entre 2002 et 2012. Données ECDC, rapports EARS-Net 2002 et 2012 (43).

Le cas particulier de l'association du clone *E. coli* ST131 et de l'enzyme CTX-M-15

Pour rappel, les isolats de *E. coli* pathogènes étaient initialement classés en 8 pathotypes en fonction du tropisme des infections générées ou de l'hôte infecté (44). Les 2 principaux pathotypes étudiés sont les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) et les pathogènes intestinaux responsables de diarrhées (InPEC), mais des groupes hybrides ont été découverts récemment rendant cette classification difficile à suivre (4). Dans une récente revue de 2021, **Denamur et al.** mentionnaient 15 pathotypes dont 14 présents chez l'Homme. Grâce à la démocratisation du WGS, cette organisation de l'espèce *E. coli* a pu être affinée pour mieux comprendre l'émergence des lignées pathogènes de *E. coli* (4). Le genre *Escherichia* est aujourd'hui subdivisé en 3 espèces (*E. coli*, *E. fergusonii* et *E. albertii*) et 5 clades labellisés de I à V (Figure 9). Le clade I et l'espèce *E. coli sensu stricto* correspondant à 2 sous-espèces d'une même espèce désormais dénommée *E. coli sensu lato*. L'espèce *E. coli sensu lato* peut être subdivisée en au moins huit phylogroupes (A, B1, B2, C, D, E, F et G) repartis en 2 clusters, excepté le phylogroupe H classé séparément et potentiellement relié au phylogroupe D. Certaines caractéristiques prédominent dans les génomes des isolats appartenant à ces différents phylogroupes, issus de l'acquisition ou la perte progressive de gènes au cours de la divergence de l'espèce *E. coli*. A titre d'exemple, les isolats des phylogroupes A et B1 ont de plus petits génomes alors que ceux du phylogroupe E possèdent des génomes de plus grande taille. De même, les isolats appartenant aux phylogroupes B2 et D sont reconnus comme les plus fréquemment associés aux isolats pathogènes extra-intestinaux (45).

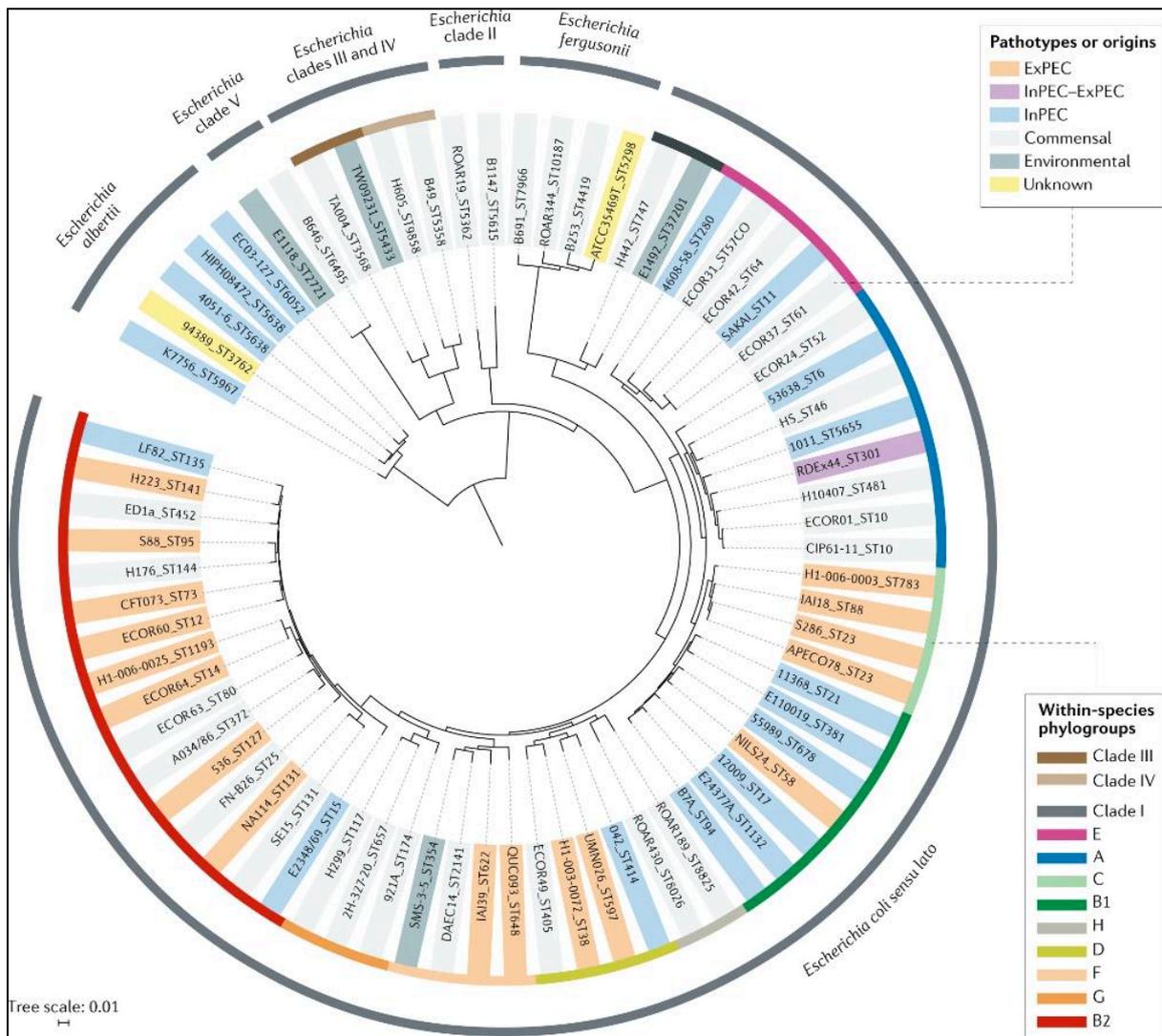


Figure 9. Arbre phylogénétique de 72 souches d'*Escherichia* représentant le genre dans son ensemble. D'après Denamur *et al.* (4)

L'arbre phylogénétique a été construit à partir des SNPs (n = 374678) des gènes du core-genome (n=1302).

Le clone *E. coli* ST131 appartient au phylogroupe B2. Les 2 principaux phénotypes retrouvés dans ce clone sont O16:H5, O25:H4 (4). L'analyse phylogénétique des souches de *E. coli* ST131 a permis de différencier ce clone en trois clades (46) :

- Le clade A ancestral associé principalement au *fimH41*
- Le clade B associé au *fimH22*
- Le clade C, aujourd'hui majoritaire, associé au *fimH30*

Des études longitudinales ont démontré que si le clade B dominait au sein du clone ST131 avant les années 1990, le clade C domine depuis les années 2000 (47). Le clade C, très souvent associé à une résistance aux fluoroquinolones (mutations *gyrA* ou *parC*), peut lui-même être divisé en 2 sous-clades

C1 (associé au gène *bla*_{CTX-M-27} et qui a émergé au Japon) et C2 sur lequel s'est greffé le gène *bla*_{CTX-M-15} dans les années 1990 (48). C'est probablement l'acquisition avant les années 1980 d'îlots génomiques préalable à la future acquisition de cette résistance aux fluoroquinolones qui est, en partie, responsable de l'émergence du clade C au dépend du clade B (sensible aux fluoroquinolones) (Figure 10 ; 49,50). De récentes études ont cependant signalé la dissémination du clone C1-M27 en Europe (51). D'autres sous-clones non *fimH30*, tels que *fimH41* (clade A ancestral) et *fimH22* (clade B) ont également été décrits comme associés aux gènes *bla*_{CTX-M}, notamment *bla*_{CTX-M-14} au Japon (48).

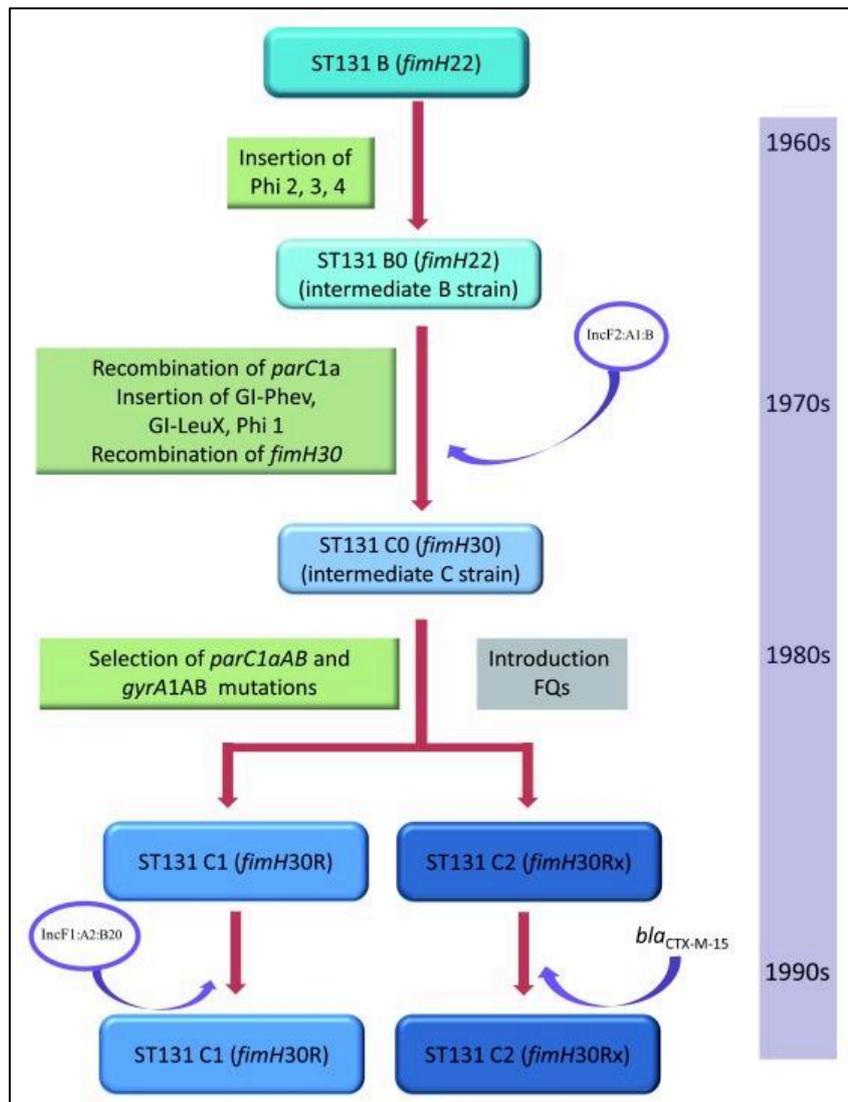


Figure 10. Évolution progressive des clades B, B0, C0 et C du clone *Escherichia coli* ST131. D'après Pitout *et al.* (46)

FQ : fluoroquinolones ; GI : îlots génomiques ; Inc : profils d'incompatibilité ; Phi : prophages ; ST : sequences types.

Les autres enzymes « mineures » de classe A : PER, VEB, GES

D'autres enzymes de classe A dites « mineures » et moins prévalentes que CTX-M, SHV et TEM ont été décrites. Celles-ci présentent des distributions géographiques et des spectres d'hôtes différents, souvent partagés avec les bacilles à Gram négatif (BGN) non fermentant (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, ...).

L'enzyme PER-1 (*Pseudomonas* Extended Resistance) a initialement été décrite chez une souche de *P. aeruginosa* en Turquie en 1993 puis a diffusé chez certaines entérobactéries telles que *S. enterica* (sérotype Typhimurium), *Providencia* spp. et *P. mirabilis* (52). Une étude récente a démontré un pourcentage élevé (78 à 96%) d'homologie de séquence entre PER-1 et certaines enzymes chromosomiques du genre *Pararheinheimera* spp., décrivant cette espèce environnementale comme probable progénitrice des enzymes de type PER (53). Les enzymes PER sont souvent associées au niveau génomique à des IS de type ISCR1, ISPa12 ou ISPa13. Il existe à ce jour 16 variants décrits des enzymes VEB (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#per>).

L'enzyme VEB-1 (Vietnam Extended-Spectrum bêta-lactamase), qui partage 38% d'identité avec PER-1, a été pour la 1^{ère} fois décrite chez une souche de *E. coli* d'un patient vietnamien en 1996 et a rapidement diffusé dans ce pays et en Thaïlande (54). Ces enzymes VEB ont également été décrites chez *E. cloacae* en France et en Chine (VEB-3), ainsi que chez *P. mirabilis* en Corée du Sud (VEB-1), *E. coli* et *S. enterica* (sérovar Worthington) au Royaume-Uni (VEB-5) ou *K. pneumoniae* en Iran (VEB-1) (55–58). Les gènes *bla*_{VEB} sont les plus souvent portés en tant que « cassette » dans des intégrons de classe I et donc souvent associés à d'autres gènes de résistance comme notamment *qnrA*. Il existe à ce jour 27 variants décrits des enzymes VEB (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#veb>).

Les enzymes de type GES (Guyana Extended Spectrum) sont des BLSE émergentes de plus en plus décrites chez les entérobactéries et les BGN non fermentant. Isolée pour la 1^{ère} fois chez une souche de *K. pneumoniae* issue d'une patiente originaire de Cayenne en Guyane, l'enzyme GES-1 est une BLSE qui n'hydrolyse pas l'aztréonam. Les principales BLSE de type GES sont GES-1, GES-3 et GES-7, principalement décrites en Amérique du Sud, au Japon, en Corée du Sud, en Grèce et au Portugal (55). Certains variants (dont les principaux sont GES-2 et GES-5), ont un profil hydrolytique différent et sont capables d'hydrolyser les carbapénèmes +/- les céphamycines (*cf. infra*). Les gènes *bla*_{GES} sont le plus souvent portés par des intégrons de classe I et exceptionnellement de classe 3 (59–61). Il existe aujourd'hui 46 variants de GES décrits, dont 37 avec des profils d'hydrolyse de type BLSE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#ges>).

Enfin, certaines BLSE de classe A ont été décrites de manière très sporadique telles que SFO-1 (*Serratia Fonticola*), BES-1 (Brazilian Extended-Spectrum beta-lactamase), BEL-1 (BELgium extended-spectrum beta-lactamase) et TLA-1 (TLAhuicas, tribu indienne) (55).

Une liste exhaustive des 132 bêta-lactamases de class A a été recensée en février 2019 par **Philippon et al.** Leur phylogénie est référencée en Annexe 2 (62,63).

1.2.2.3 Les BLSE de classe D : Oxacillinases

Les oxacillinases (ou OXA) constituent une famille très diversifiée d'enzymes capables d'hydrolyser la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline mais elles sont généralement peu inhibées par l'acide clavulanique (hormis quelques exceptions comme OXA-18, OXA-45). Elles sont en général subdivisées en 3 sous-classes : les oxacillinases à spectre restreint, les oxacillinases à spectres étendu (ou ES-OXA) et les oxacillinases à activité carbapénèmase.

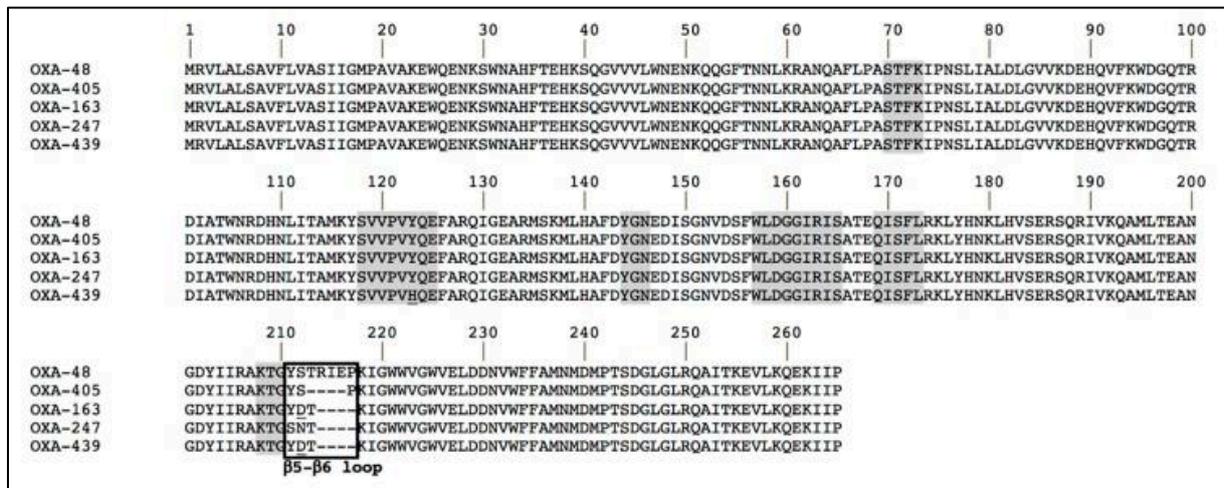


Figure 11. Alignement des séquences d'acides aminés de 4 variants BLSE de l'enzyme à activité carbapénèmase OXA-48. D'après Oueslati et al. (64)

Les motifs d'acides aminés qui sont bien conservés parmi les lactamases de classe D sont indiqués par un dégradé de gris, et le cadre noir correspond à la boucle β5-β6. La numérotation est conforme à la séquence OXA-48.

La première BLSE de la classe D (OXA-11, liée à OXA-10) a été décrite chez une souche de *P. aeruginosa* provenant de Turquie en 1991 (65). Les BLSE de classe D (ou ES-OXA) n'ont que très peu été décrites chez les entérobactéries. Elles dérivent de mutations ponctuelles dans certaines oxacillinases à spectre restreint telles que OXA-2, OXA-10 ou OXA-13 (55). Plus récemment, certains variants d'OXA-48 ayant

un spectre d'hydrolyse de type BLSE ont été décrits tels que OXA-163 (*E. cloacae* et *K. pneumoniae*, Argentine, 2008 ; *K. pneumoniae*, Egypte, 2009-2010), OXA-247 (*K. pneumoniae*, Argentine, 2010), OXA-405 (*E. coli*, USA, 2015) et OXA-439 (*S. marcescens*, France, 2012) (Figure 11, 64,66,67).

1.3 Résistances aux carbapénèmes

1.3.1 Les carbapénèmases

Il existe 3 types d'enzymes à activité carbapénémase correspondant aux enzymes de classes A, B et D de Ambler. En plus d'hydrolyser les carbapénèmes, celles-ci hydrolysent pour la plupart les autres bêta-lactamines de type pénicillinase ou C3G, ou sont associées à des céphalosporinases ou des BLSE de classe A acquises. De plus, de par le support génétique de ces enzymes, ces souches sont fréquemment résistantes à d'autres classes d'antibiotiques et donc qualifiées de bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe) au sens de la définition française du Haut Conseil de Santé publique (68). D'un point de vue plus consensuel, ces bactéries sont qualifiées d'ultra-résistantes (en anglais : eXtensively-Drug Resistant ou XDR) ou toto-résistantes (en anglais : Pan-Drug Resistant ou PDR) selon la définition internationale définie par **Magiorakos et al.** en 2012 (69). Ces Entérobactéries Productrices de Carbapénémase (EPC) constituent ainsi une menace majeure de Santé publique dans la mesure où elles pourraient aboutir à des impasses thérapeutiques dans les prochaines décennies. La lutte contre l'antibiorésistance visant à limiter l'émergence et la propagation des EPC a été placée dans les priorités de nos autorités sanitaires avec de vastes plans à la fois de santé publique et de recherche (cf. introduction générale).

En France, l'ensemble des cas d'EPC sont recensés par Santé Publique France (SPF) et ont connu une croissance très importante au cours de 2 dernières décennies, avec une proportion relativement constante des cas sans lien rapporté avec l'étranger (40-50%) (Figure 12, 70). Le 1^{er} cas d'EPC détecté en France a été signalé à SPF en 2004 : il s'agissait d'une souche de *K. pneumoniae* arborant les enzymes VIM-1 et SHV-5 détectée chez un patient rapatrié de Grèce (71).

1.3.1.1 Les carbapénèmases de classe A

Les carbapénèmases de classe A appartiennent à la classe 2f de Bush et Jacoby et sont capables d'hydrolyser les carbapénèmes +/- les C3G et les céphamycines. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique, mais également d'autres inhibiteurs récemment utilisés en thérapeutique comme l'avibactam, le tazobactam, le relebactam ou le vaborbactam (72).

Parmi ces enzymes, on compte d'une part les carbapénèmases d'origine chromosomique telles NmCA (*E. asburiae*), IMI-1 (*E. cloacae*), Sme (*S. marcescens*) et SFC-1 (*S. fonticola*) (73). Et d'autre part les carbapénèmases acquises, le plus souvent de localisation plasmidique, telles que KPC, BKC-1, IMI-2, -3, -5 et -6, FRI-1 et certains variants de GES notamment GES-5 (74–76). Dans la récente revue de 2019 sur les bêta-lactamases de classe A, une nouvelle enzyme VCC-1 a été détectée chez une souche de *Vibrio cholerae* dans des crevettes originaires d'Inde introduites au Canada (Annexes 2, 63). L'enzyme VCC-1 était localisée sur le chromosome et associée à une séquence d'insertion de type ISVch9 (77).

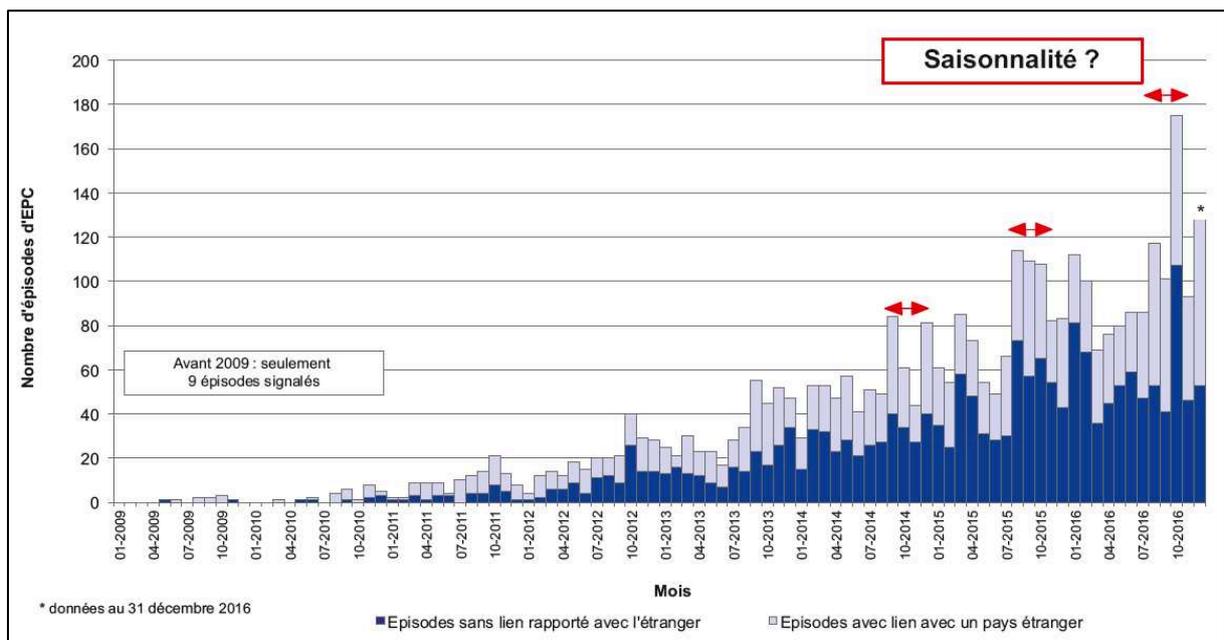


Figure 12. Évolution par mois du nombre d'épisodes impliquant des EPC en France signalés entre 2009 et 2016, selon la mise en évidence ou non d'un lien avec un pays étranger (n=3595). D'après Pontière *et al.* (70)

Les carbapénèmases de type KPC

Les enzymes de type KPC (*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase) sont les plus répandues dans le monde. Le premier variant de cette famille KPC-1 a été identifié en 1996 dans la région de New York (78). Elle a ensuite diffusé dans les états voisins de la côte Est des Etats-Unis et à Porto Rico, puis s'est

répandue en Colombie, en Israël, en Grèce et en Chine (Figure 13, 79). En France, la première enzyme de type KPC a été détectée en 2005 chez un patient précédemment hospitalisé dans un hôpital new-yorkais (80). Aujourd'hui, les carbapénèmes KPC représentent environ 3% des souches d'EPC reçues par le CNR de Bicêtre (81,82).

Les carbapénèmes de type KPC sont le plus souvent produites par des souches de *K. pneumoniae* hospitalières, et peuvent être responsables d'épidémies de plasmides chez différentes entérobactéries (83–85). Le gène *bla*_{KPC} est le plus souvent localisé au sein de transposons (Tn4401, famille de Tn3 pour *bla*_{KPC-2}) (86–88). A l'image du clone *E. coli* ST131 pour CTX-M-15, le clone *K. pneumoniae* ST258 associé aux plasmides du groupe d'incompatibilité IncF et IncI2 ont probablement joué un rôle de vecteur dans la dissémination mondiale de KPC-2 et KPC-3. (89–92).

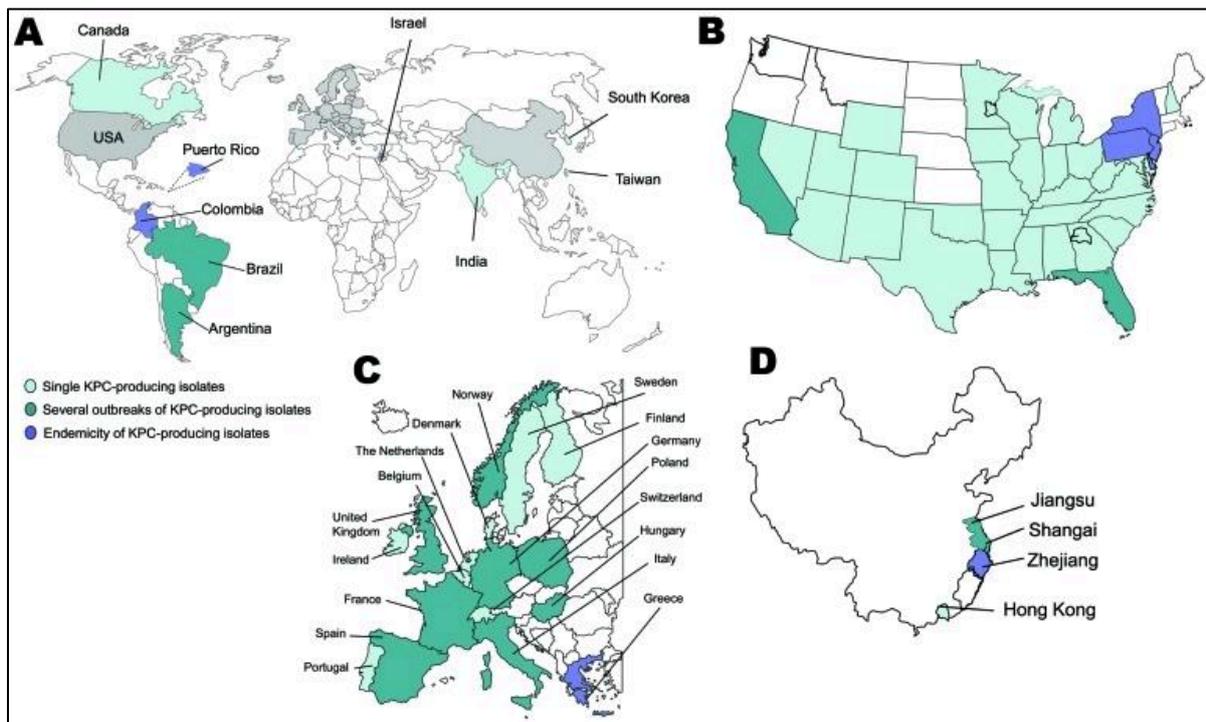


Figure 13. Répartition géographique des enzymes de type KPC. D'après Nordmann *et al.* (79)

En violet, les régions où les bactéries productrices d'enzymes de type KPC sont endémiques ; en vert foncé, les régions dans lesquelles des épidémies ont été décrites ; en vert clair, les régions dans lesquelles des cas sporadiques ont été décrits. **A.** Carte de répartition dans le monde ; **B.** Carte de répartition aux Etats-Unis ; **C.** Carte de répartition en Europe et **D.** Carte de répartition en Chine.

Les carbapénèmases de type GES

Comme mentionné ci-dessus, les enzymes GES sont initialement des BLSE de classe A dont certains mutants (Gly170→Asn ou Ser) ont étendu leur spectre d'hydrolyse aux carbapénèmes. Les carbapénèmases de type GES sont peu décrites chez les entérobactéries. Si les principaux variants carbapénémase sont GES-2 et GES-5, il existe également GES-4, -6, -13, -14, -15, -16, -18, -20 et -24. Les premières souches de type GES-5 ont été identifiées en Corée du Sud en 2003 (*K. pneumoniae*) et en Grèce en 2006 (*K. pneumoniae* et *E. coli*) (93–95). Une première souche de *E. cloacae* productrice de la carbapénémase IBC-1 (ultérieurement reclassée en GES-7) avait été détectée en Grèce en 1999 (96). En France, la première souche d'entérobactérie (*K. pneumoniae*) productrice de carbapénémase de type GES a été décrite en 2016 chez un patient précédemment hospitalisé à Bangkok, mais très peu de souches sont détectées chaque année (97). Les carbapénèmases de type GES sont caractérisées par une hydrolyse lente des carbapénèmes, des céphamycines mais pas de l'aztréonam (à l'exception de GES-14) (Tableau 3, 98,99). Cette caractéristique peut rendre ces enzymes difficiles à détecter par des méthodes basées sur l'hydrolyse d'un carbapénème comme les tests colorimétriques ou la spectrométrie de masse MALDI-TOF (100,101).

Les carbapénèmases apparentées du groupe Nmca, IMI, FRI, SME

Les gènes codants pour les carbapénèmases de classe A Nmca, IMI, FRI et SME ont pour point commun d'être associés à des régulateurs transcriptionnels de type LysR. Les enzymes IMI-1 et Nmca sont très proches et partagent 97% d'identité au niveau de leur séquence d'AA (102). Un autre point important est que ces enzymes ont été détectées dès les années 1980. SME-1 produite par *S. marcescens* a été décrite en 1982 à Londres et IMI-1/Nmca chez des souches cliniques de *E. cloacae* en 1984 aux USA, avant la 1^{ère} utilisation de l'imipénème en thérapeutique dans les hôpitaux américains en 1985 (102,103). Cela suggère fortement que ces 4 enzymes ont un progéniteur commun probablement environnemental inconnu à ce jour (Figure 14, 99). IMI-2 est le premier variant à localisation plasmidique (IncFII) ayant été décrit dans des souches de *E. asburiae* clonalement reliées et détectées dans des rivières du Middle-Ouest aux Etats-Unis (104). Ce variant a également été identifié dans un isolat clinique d'*E. cloacae* en Chine dans les années 2000, et plus récemment chez *E. coli* en Espagne et *K. pneumoniae* en Angleterre (105–107). Les variants IMI-3, -5 et -6 sont également le plus souvent portés par des plasmides (76). Les gènes *bla*_{IMI-2} et *bla*_{IMI-3} sont souvent localisés sur des IS de type *ISEc13*, *ISEc1*, *ISEc36* ou sur des transposons composites de type Tn6306 (75,108). Ces enzymes (principalement IMI-1) sont de plus en plus décrites dans le monde y compris en Europe (Finlande,

Irlande, Autriche, République tchèque, Italie) ou en Asie (Singapour, Japon, Polynésie française) (109–116). Récemment **Boyd et al.** ont identifié la structure génétique commune portant les gènes *bla*_{IMI/NmcA} à savoir Eclo-IMEX 1 à 7 définit comme des *integrative mobile element* dépendant des recombinases XerC/XerD et reconnaissant des motifs de type Dif-R/Dif-L, permettant ainsi la mobilisation de ces gènes hors du chromosome par recombinaison (117). Les enzymes de type IMI représentent environ 0,5 à 1% des souches d'EPC reçues par le CNR de Bicêtre ces 5 dernières années.

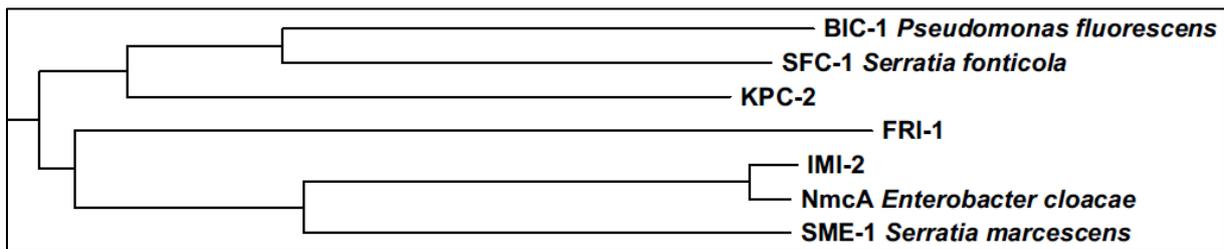


Figure 14. Section d'arbre phylogénétique des carbapénémases de classe A encodées sur le chromosome ou sur des plasmides. Adapté de Naas et al (99).

L'enzyme FRI-1 a été décrite beaucoup plus récemment en 2015 également chez une souche de *E. cloacae* détectée chez un patient hospitalisé à Paris et originaire de Suisse (74). Comme le gène *bla*_{IMI-2}, *bla*_{FRI-1} est bordé par deux séquences d'insertion de type *ISRaq1* et *IS66-like*, et l'ensemble est contenu sur un plasmide non encore caractérisé à ce jour.

Les enzymes de ce groupe ont un spectre de substrat similaire avec une forte hydrolyse des benzylpénicillines, de l'aztréonam et de l'imipénème, mais pas des C3G ou de la céfoxitine. Elles sont peu inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam et fortement inductibles par l'imipénème et la céfoxitine (95,99). Un total de 21 variants de l'enzyme IMI sont décrits à ce jour sur le site du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#imi>).

Une récente revue de **Bonnin et al.** des carbapénémases mineures mentionnait des carbapénémases très peu décrites mais probablement sous-estimées telles que BKC (Brazilian Klebsiella Carbapenemase) ou des mutations ponctuelles d'enzyme appartenant à la classe des BLSE ayant acquis une activité carbapénémase telles que SHV-38 ou CTX-M-33 (75,118–120).

Le Tableau 3 résume les profils de substrats et d'inhibitions des principales carbapénémases de classe A (99).

Tableau 3. Profils de substrats et d'inhibition des carbapénèmases de classe A (adapté de Queenan *et al.* (99,121)).

Enzyme	Number of Variants	Host	Expression Type	Hydrolysis Profile						Inh
				PEN	CEF	CEP-I	CEP-III	AZT	CARBA	CA
Chromosome										
NmcA	1	<i>E. cloacae</i>	inducible LysR	+	+	+	+	+	+	+
IMI-1-like	8	<i>E. cloacae</i>	inducible LysR	+	-	+	-	+	+	+
SME-like	6	<i>S. marcescens</i>	inducible LysR	+	-	+	±	+	+	+
SFC-1	1	<i>S. fonticola</i>	constitutive	+	+	+	-	+	+	-
BIC-1	1	<i>P. fluorescens</i>	constitutive	+	±	+	±	+	+	-
SHV-38	1	<i>K. pneumoniae</i>	constitutive	+	-	+	+	+	±	++
FPH-1	1	<i>F. philomiragia</i>	constitutive	+	-	+	+	+	+	±
PenA	1	<i>B. multivorans</i>	constitutive	+	-	+	+	+	+	±
Plasmid										
IMI-2		<i>E. asburiae, E. coli</i>	inducible LysR	+	-	+	-	+	+	+
KPC-like	22	<i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, A. baumannii</i>	constitutive	+	±	+	+	+	+	±
GES-like	23	<i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, A. baumannii</i>	constitutive	+	± ^a	+	+	- ^b	±	±
FRI-1	1	<i>E. cloacae</i>	inducible LysR	+	-	+	+	+	+	+

^a + pour les variants GES disposant d'une sérine en position 170.

^b À l'exception des variants de GES qui disposent d'une sérine ou d'une alanine en position 243.

Symboles : + : forte hydrolyse (généralement, $k_{cat} > 2 \text{ s}^{-1}$) ; ± : faible hydrolyse (généralement, k_{cat} entre 0,5 et 2 s^{-1}) ; - : pas d'hydrolyse rapportée (généralement, $k_{cat} < 0,5 \text{ s}^{-1}$).

§ Abréviations : Inh : Inhibition ; PEN : Pénicillines ; CEF : Céfoxitine ; CEP-I : Céphalosporine de 1^{ère} génération ; CEP-III : Céphalosporine de 3^{ème} génération ; AZT : Aztréonam ; CARBA: Carbapénèmes ; CA : acide clavulanique.

1.3.1.2 Les carbapénèmases de classe B

La 1^{ère} enzyme à activité « métallo-bêta-lactamase » (MBL) a été décrite en 1966, puis 1970 chez *Bacillus cereus* suite à la découverte d'un co-facteur Zn^{2+} nécessaire à l'action d'hydrolyse de l'antibiotique par l'enzyme (122,123). La première carbapénèmase à activité métallo-bêta-lactamase CcrA n'a été décrite qu'en 1983 chez *Bacteroides fragilis* au Japon en 1983 (124). D'autres carbapénèmases chromosomiques de classe B ont ensuite été décrites comme CphA chez *Aeromonas hydrophila*, ou GOB chez *Elizabethkingia meningoseptica* (ancien *Chryseobacterium meningosepticum*) (125,126). Une seconde catégorie de métallo-bêta-lactamases acquises et médiées par des plasmides ont ensuite été détectées à partir des années 1990, dont les 3 principales sont NDM, VIM et IMP. Ces dernières enzymes ont ensuite connu une dissémination mondiale et constituent aujourd'hui une menace majeure de Santé Publique (127).

Les carbapénèmases de classe B (ou métallo-bêta-lactamases) ont pour caractéristique d'hydrolyser fortement les carbapénèmes mais pas les monobactames tels que l'aztréonam. Elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam. Elles sont par contre inhibées par l'EDTA ou l'acide dipicolinique. Cette caractéristique est due à la présence d'un ou deux ions divalents Zn^{2+} au niveau du site actif de l'enzyme. Le spectre d'hydrolyse de ces enzymes peut varier : certaines d'entre-elles ayant un spectre étroit comme l'enzyme CphA de *Aeromonas hydrophila* (correspondant à la classe 3b de Bush et Jacoby) ; d'autres ont un spectre large et hydrolysent toutes les bêta-lactamines à l'exception de l'aztréonam comme les enzymes NDM ou VIM (classe 3a). Au niveau structural, les bêta-lactamases de classe B sont subdivisées en 3 sous-classes (B1, B2 et B3) sur la base de l'alignement de leur séquence d'AA (128,129). La plupart des « nouvelles » MBLs acquises appartiennent aux classes 3a et B1 (ou B3) et ont donc un spectre d'hydrolyse très large au sein des bêta-lactamines, réduisant les alternatives thérapeutiques en cas d'infections.

A ce jour, 87 MBLs ont été décrites (<http://bldb.eu> (130)) dont 46, 5 et 36 dans les sous-classes B1, B2 et B3, respectivement. Le tableau 4 résume les principales MBLs d'intérêt clinique (72,128).

Tableau 4. Exemples des principales métallo-bêta-lactamases de localisation chromosomique ou encodées par des plasmides. D'après Boyd et al. (131)

MBL type	Species	Enzyme(s)	Subclass
Chromosomal	<i>Bacillus cereus</i>	BcII	B1
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	IND	B1
	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	BlaB	B1
	<i>Myroides odoratimimus</i>	MUS and MYO	B1
	<i>Bacteroides fragilis</i> ^a	CfiA/CcrA	B1
	<i>Aeromonas</i> spp.	CphA	B2
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	L1	B3
	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	GOB	B3
Plasmid associated		Verona integron-encoded metallo-β-lactamase (VIM)	B1
		New Delhi metallo-β-lactamase (NDM)	B1
		Imipenemase (IMP)	B1
		Sao Paulo metallo-β-lactamase (SPM)	B1
		German imipenemase (GIM)	B1
		KHM	B1
		Dutch imipenemase (DIM)	B1
		<i>Serratia</i> metallo-β-lactamase (SMB)	B3
	Adelaide imipenemase (AIM)	B3	

La métallo-bêta-lactamase NDM-1

Epidémiologie et structure

La première enzyme NDM (New Delhi Métallo-bêta-lactamase) a été détectée en 2008 en Suède chez une souche de *K. pneumoniae* détectée chez un patient précédemment admis dans 2 différents hôpitaux en Inde (132). Des études rétrospectives sur des isolats cliniques en Inde ont toutefois détecté le gène *bla*_{NDM-1} dès 2006 (133). Les enzymes NDM sont composées de 270 AA et ne partagent que peu

d'homologie de séquence avec les autres MBLs comme par exemple 34% avec IMP-1 ou 35% avec VIM-2. L'enzyme NDM-1 est composée de 9 hélices α , 17 brins β et 3 tours. Les MBLs se caractérisent par le sandwich distinctif $\alpha\beta/\beta\alpha$ de la superfamille métallo-hydrolase/oxydoréductase et possèdent une rainure peu profonde à site actif avec un ou deux ions de zinc divalents Zn^{2+} , bordés par des boucles flexibles. Dans l'enzyme NDM-1, cette boucle flexible en épingle à cheveux se déplace autour de l'ion zinc pour l'hydrolyse et est ensuite retirée après la catalyse (Figure 15, 134). De plus, l'enzyme NDM a une localisation cellulaire atypique puisqu'il s'agit d'une lipoprotéine qui s'ancre à la membrane extérieure dans les bactéries à Gram négatif (liée à la présence d'une séquence d'acides aminés de lipodation canonique, LSGC ou lipobox, à la fin du peptide signal de NDM), contrairement aux autres MBLs qui sont des protéines solubles dans le périplasma (135). Cette localisation participe à la stabilité (notamment dans des milieux pauvres en zinc) et à la sécrétion de cette enzyme au niveau de la membrane externe de ces bactéries sous forme de vésicules ou OMV (*outer membrane vesicles*). Il est à noter qu'en plus de l'aztréonam, l'enzyme NDM-1 hydrolyse peu le mécillinaam, qui peut être une éventuelle alternative pour le traitement des infections urinaires dues notamment à *E. coli* (136).

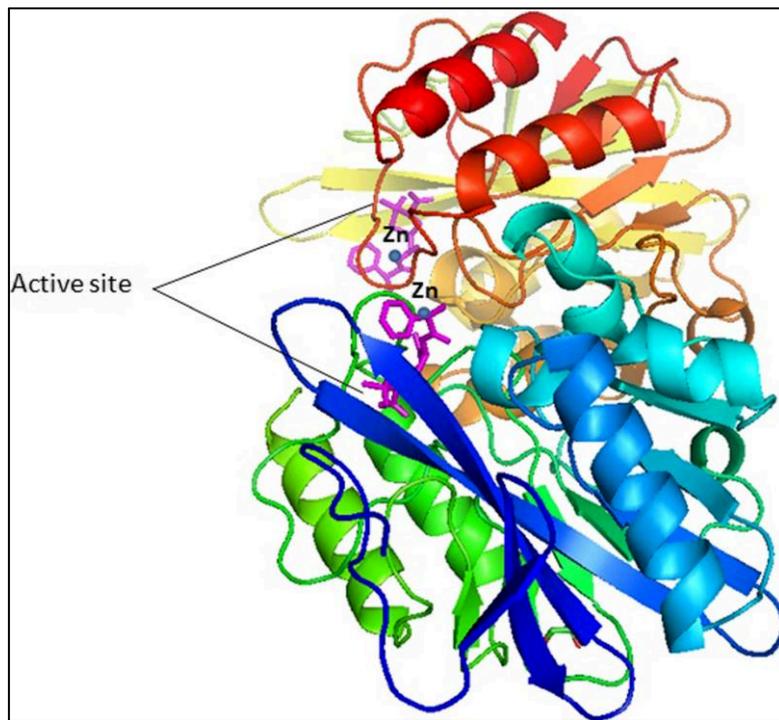


Figure 15. Structure 3D du squelette de la protéine NDM-1 représentée par des hélices et des brins, les deux ions zinc aux sites actifs sont représentés par des sphères bleues. D'après Khan *et al.* (134)

Les isolats porteurs de NDM ont essentiellement été détectés en Inde, au Pakistan et en Chine ; ces 3 pays représentaient par exemple 80% des isolats de *E. coli* NDM détectés dans le monde entre 2008 et 2018 (137). Du fait du lien historique entre l'Inde et le Royaume-Uni et des échanges de populations

entre ces 2 pays, les enzymes NDM se sont rapidement propagées dans ce pays et dans le Nord de l'Europe (138). Ces enzymes sont aujourd'hui endémiques en Inde et au Pakistan. En plus de cette propagation initiale principalement centrée sur le sous-continent Indien, d'autres réservoirs secondaires sont apparus comme les Balkans (Serbie), l'Afrique du Nord (Égypte) et la péninsule arabique (Figure 16, 139–141). De récentes épidémies hospitalières à entérobactéries NDM ont ainsi été répertoriées récemment dans certains pays au pourtour de ces foyers secondaires, comme en Grèce, en République Tchèque ou en Tunisie (142–144). L'implantation des EPC productrices de NDM en Europe est étroitement liée aux voyageurs et aux rapatriements sanitaires vers les pays d'Europe de l'ouest où 57% des cas initialement rapportés en Europe entre 2008 et 2010 avaient préalablement été hospitalisés en Inde ou dans les Balkans (145).

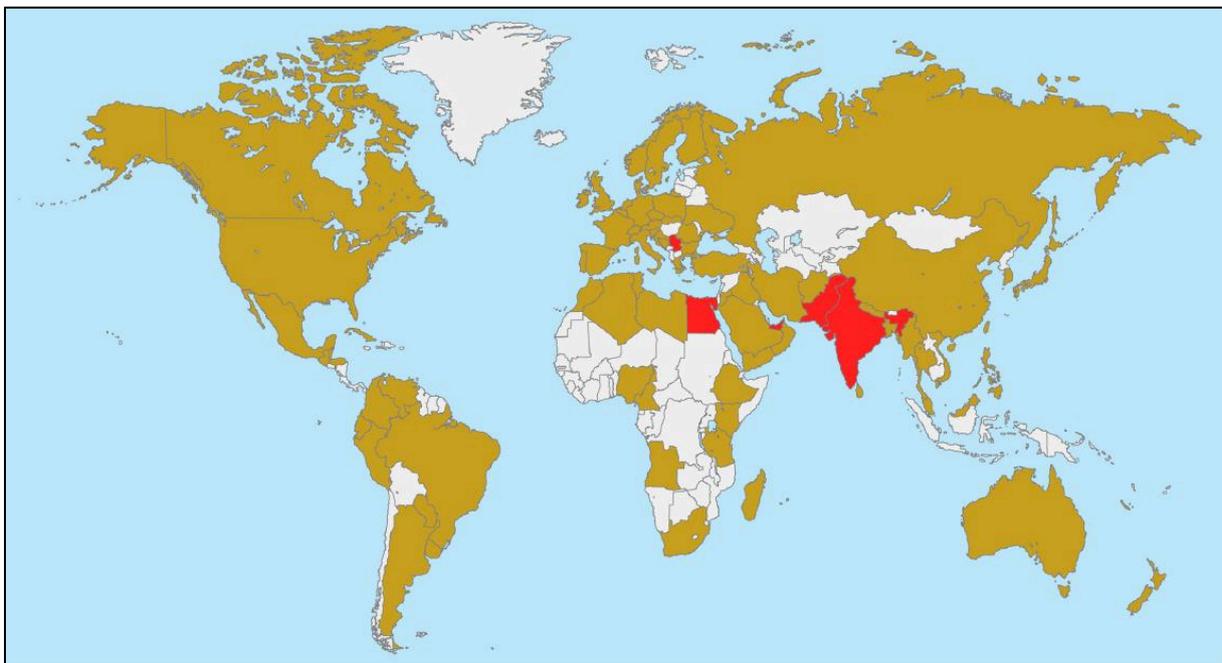


Figure 16. Distribution mondiale des souches d'entérobactéries productrices de NDM. D'après Wu *et al.* (141)
Les pays (Égypte, Inde, Pakistan, Serbie et Émirats Arabes Unis) dont les données montrent une prévalence des souches productrices de NDM parmi les entérobactéries $\geq 5\%$ sont indiqués en rouge, tandis que les pays où l'on signale des souches productrices de NDM mais sans la preuve d'une prévalence $\geq 5\%$ sont indiquées en brun clair. Les pays qui ne disposent pas de rapports ou de données sur les souches productrices de NDM sont indiqués en blanc.

Variants NDM et bactéries hôtes

Les variants NDM ont en général 1 à 5 substitutions par rapport à NDM-1, M154L étant la substitution la plus fréquemment rencontrée (141). Il est également à noter que les variants ayant la substitutions V88L comme NDM-5 auraient une activité carbapénémase augmentée (146). À ce jour, 31 variants

NDM ont été décrits (<http://blddb.eu> et <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pathogens/refgene/#ndm>) principalement chez les entérobactéries (*K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae*), *Acinetobacter sp.* et *Pseudomonas sp.* mais aussi chez d'autres espèces comme *Bacillus subtilis* ou *Vibrio cholerae* (141,147). Outre les mécanismes de conjugaison, *Acinetobacter sp.* a probablement joué un rôle dans cette grande plasticité d'espèces par des mécanismes de transformation à haute fréquence, *via* les OMVs (148).

Dissémination clonale des variants NDM

Contrairement à l'enzyme KPC, la dissémination mondiale de l'enzyme NDM ne semble pas liée à des clones majeurs dits « à haut-risque » ou à des plasmides épidémiques (149). On observe ainsi une très grande diversité dans les séquences types et plasmides impliquées dans les multiples descriptions d'entérobactéries ou autres BGN porteurs du gène *bla_{NDM}*. Une récente revue de **Dadashi et al.** a démontré que chez *E. coli*, les principaux STs impliqués étaient, par ordre de fréquence, ST101, ST167, ST131 et ST405 et qu'il existait une prédominance de certains variants de NDM comme NDM-5 en Afrique ou NDM-1 en Amérique, Europe et Asie (Figure 17, 137). Chez *K. pneumoniae*, une revue de **Safavi et al.** a montré que les STs majeurs portant le gène *bla_{NDM}* étaient ST11, ST290, et ST147(150).

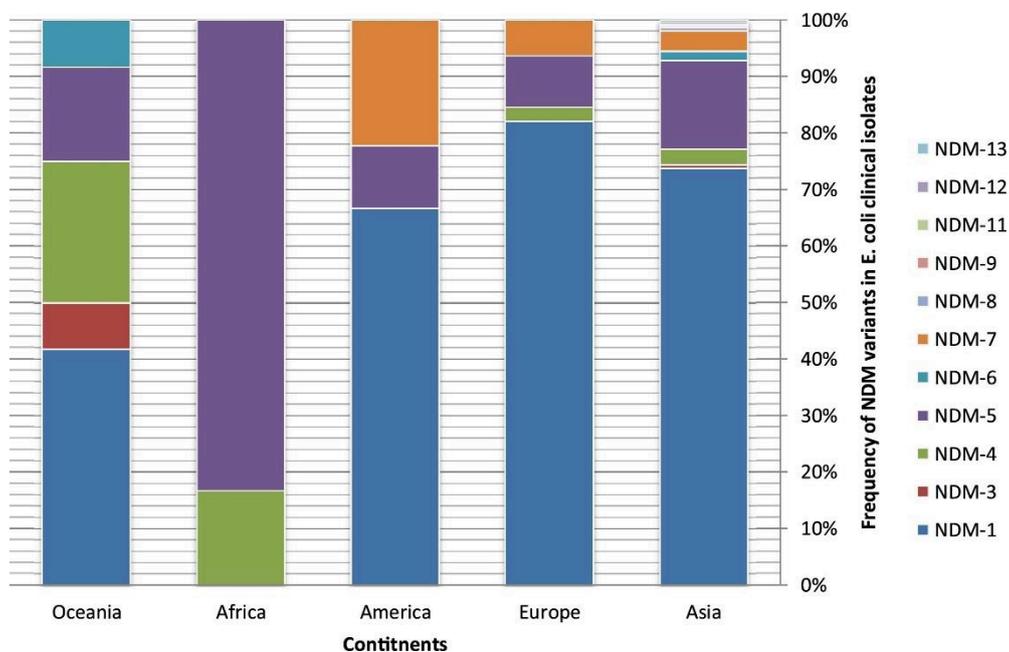


Figure 17. Répartition entre les continents des isolats de *E. coli* producteurs de la métallo- β -lactamase NDM isolés à partir d'échantillons cliniques. D'après Dadashi et al. (137)

En France, NDM est la 2^{ème} carbapénèmase la plus fréquemment rencontrée depuis 2013 (15,7%). Depuis 2012, le variant NDM-5 a connu une forte expansion pour devenir le variant majoritaire chez les souches reçues par le CNR de Bicêtre en 2018 (3,7% en 2012 vs. 32,5% en 2018) (20). Ces données sont corrélées au dernier bilan des épisodes impliquant des EPC réalisé par SPF entre 2004 et 2016, confirmant cette seconde position derrière OXA-48 (Figure 18, 70).

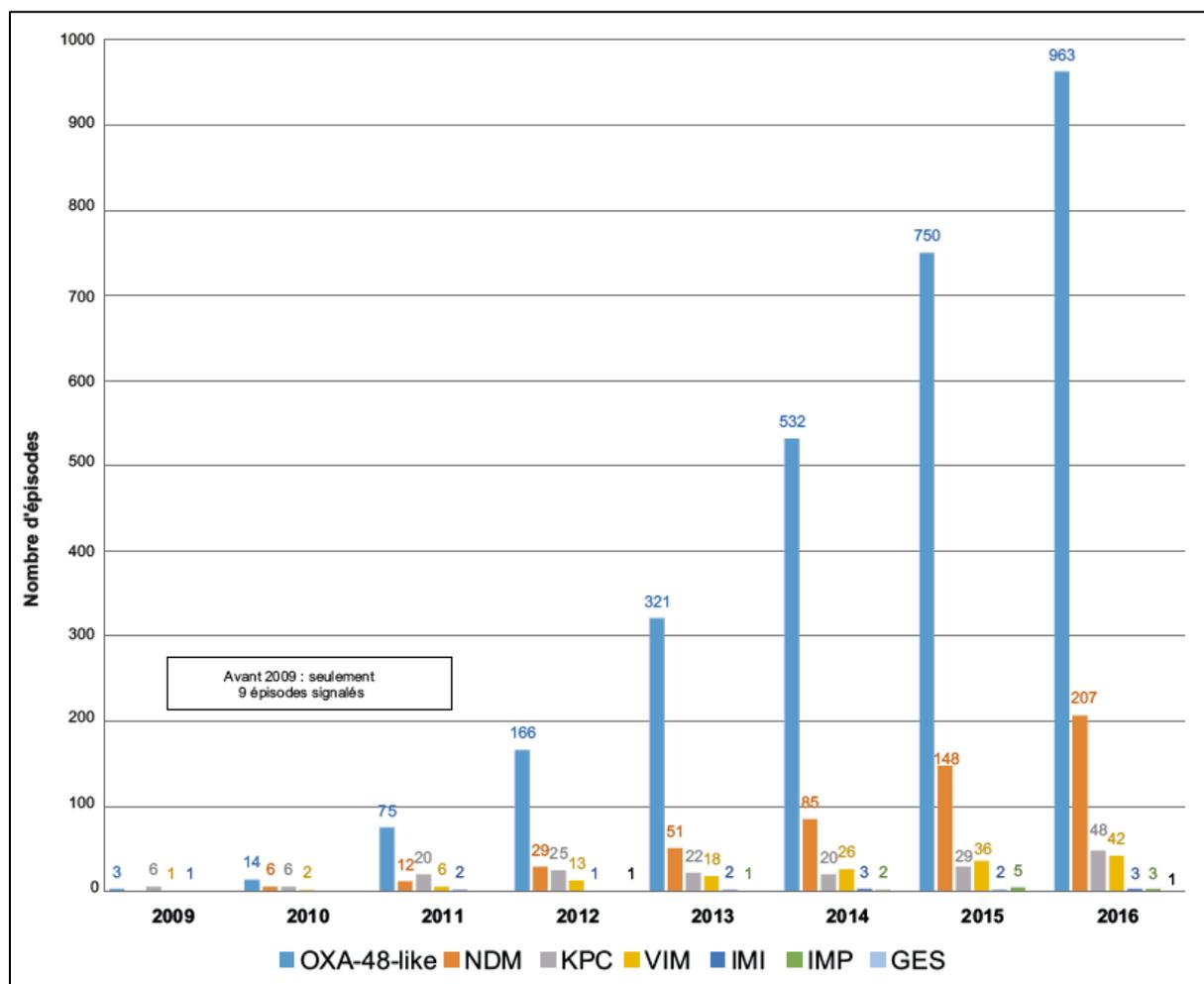


Figure 18. Répartition des épisodes impliquant des EPC en France signalés entre 2009 et 2016, selon les mécanismes de résistance impliqués et l'année de signalement (n=3595). D'après Pontiers *et al.* (70)

Contexte génétique du gène bla_{NDM}

Si le gène bla_{NDM} peut être localisé sur le chromosome, il est dans la très grande majorité des cas porté par des plasmides. Le gène bla_{NDM} a été décrit chez un très grand nombre de plasmides avec des profils d'incompatibilité très divers. Selon **Wu *et al.***, plus de 355 plasmides portant le gène bla_{NDM} sont référencés dans la base de données Genbank, et plus de 20 types de réplicons décrits pour les

entérobactéries. Les trois principaux plasmides portant le gène *bla*_{NDM} appartiennent aux groupes d'incompatibilité IncA/C, IncFI et IncFII et surtout IncX3 chez les entérobactéries (Tableau 5, 141).

Tableau 5. Types de réplicons plasmidiques porteurs du gène *bla*_{NDM} chez les entérobactéries. D'après Wu *et al.* (141)

Type	Replicon type(s) ^b
NDM-1	A/C , ColE, ^a FIA, FIB, FII , HI1, HI3, HIB, L/M, N2, P, R, T, ^a X1, ^a X3 , Y ^a
NDM-3	A/C ^a
NDM-4	FII, HI2, X3
NDM-5	B/O/K/Z, ^a FUA, ^a FIB, ^a FIC, ^a FII, X3 , X4, ^a Y ^a
NDM-6	A/C, FIB, FII, R, ^a X3 ^a
NDM-7	A/C, FIC, FII, X3
NDM-8	FII
NDM-9	B/O/K/Z, FIA, ^a FII, HI2, N, ^a R ^a
NDM-10	FII
NDM-11	FII
NDM-12	F
NDM-13	X3
NDM-17	X3
NDM-19	X3 ^a
NDM-20	X3
NDM-21	X3

Le gène *bla*_{NDM} a été décrit dans de nombreux contextes génétiques, ce qui sous-entend un grand nombre de mécanismes d'acquisition. Deux caractéristiques sont cependant toujours conservées : (i) la séquence d'insertion IS*Aba125* sous forme complète, comme décrite initialement dans le transposon composite Tn125, ou tronquée, et (ii) le gène *ble*_{MBL} de résistance à la bléomycine situé en aval du gène *bla*_{NDM} (141,151). Ces deux gènes ne sont séparés que de 3 pb et forment un même opéron dépendant du même promoteur. L'hypothèse la plus probable est que *bla*_{NDM-1} et *ble*_{MBL} aient été mobilisés ensemble sous pression de sélection due à *ble*_{MBL} chez un progéniteur environnemental inconnu à ce jour. Dans sa forme initialement décrite par **Dortet *et al.***, le transposon Tn125 est bordé par les 2 IS*Aba125* et possède d'autres gènes en son centre à savoir *trpF*, *dsbC*, *cutA1*, *groEL/ES* et l'ISCR27 (151). La formation du gène *bla*_{NDM-1} est elle-même complexe puisque d'après **Toleman *et al.***, il s'agit d'un gène chimérique issu de la fusion de 19 pb issues d'un gène *aphA6* codant pour une enzyme modificateur des aminosides et de 794 pb issues de MBL précédemment décrite (152). De plus, la région *groES/EL-ISCR27* pourrait provenir d'un autre progéniteur du genre *Xanthomonas* (153,154). L'hypothèse la plus probable reconnue à ce jour est que *Acinetobacter spp.* ait joué le rôle d'hôte intermédiaire et qu'il ait intégré l'« ancêtre » du gène *bla*_{NDM-1} associé à *ble*_{MBL} auprès d'un progéniteur commun, suivi d'un remodelage par un mécanisme de transposition en cercle roulant impliquant ISCR27 (152,155,156). Enfin, chez les entérobactéries, les structures génétiques dérivées

du Tn125 sont plus variées intégrant d'autres IS (IS26, IS903, IS3000) ou d'autres structures dérivées de la famille des transposons de type Tn3 nommés TIME (Figure 19, 141,157). Cette diversité indique également la complexité des phénomènes de mobilisation du gène *bla_{NDM}* chez les entérobactéries (156,158).

Les métallo-bêta-lactamases de type VIM

Les 2 principaux représentants des enzymes de type VIM (Verona Integron-encoded Métallo-beta-lactamase), VIM-1 et VIM-2, ont respectivement été décrits en Italie en 1997 et en France en 1996, tous les 2 chez *P. aeruginosa* (159,160). Ils présentent également peu d'homologie de séquence avec les autres MBLs, respectivement 28 et 31% avec IMP-1. Soixante-treize variants de VIM sont aujourd'hui décrits (<http://blddb.eu> et <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#vim>). Ces enzymes ont principalement diffusé chez les bacilles à Gram négatif non fermentant (*P. aeruginosa*), mais aussi secondairement chez les entérobactéries, notamment *K. pneumoniae* et *E. cloacae* complexe (127,161). Hormis quelques cas sporadiques décrits aux Etats-Unis, en Afrique du Sud, en Algérie, en Egypte ou en Inde, les EPC productrices de VIM ont essentiellement été décrites en Europe et notamment en Grèce, puis en Italie, Espagne et Autriche (162–168).

Dans des pays comme la Grèce, il est décrit une ré-augmentation de ces enzymes par rapport aux KPC qui étaient largement majoritaires depuis les années 2000 (38% de VIM en 2018 chez *K. pneumoniae*) (169). Cette proportion croissante de VIM pourrait être due à l'utilisation récente de l'association Ceftazidime-avibactam, inefficace seule contre les bactéries productrices de VIM. En France, ces enzymes de type VIM sont également en progression : elles représentaient 3,9% des souches reçues par le CNR de Bicêtre entre 2012 et 2015 contre 4,9% en 2018 (20,170).

Les enzymes de type VIM ont un spectre large d'hydrolyse (classe 3a) incluant les carbapénèmes, les C3G et les pénicillines + inhibiteurs à l'exception de l'aztréonam. Les gènes *bla_{VIM}* sont le plus souvent des gènes cassettes portés par des intégrons de classe I qui sont liés au transposon Tn402 (plus ou moins complet). Dans ces intégrons de classe I, les gènes cassette *bla_{VIM}* sont souvent associés à des gènes codant pour la résistance aux aminosides : *aac*, *aad* ou *aph*. De plus, les gènes *bla_{VIM}* sont portés par des plasmides, le plus souvent de type IncN, IncF ou IncA/C (171–173). La diffusion des enzymes de type VIM n'est pas liée à de grands clones épidémiques même si certains complexes clonaux chez *K. pneumoniae* tels que CC147, CC18 et CC14 ont été décrits en Grèce dans les années 2000 (174). Chez *E. cloacae* complexe, ce sont les complexes clonaux CC200 (Croatie et Turquie), CC114 (Croatie, Grèce,

Italie et Etats-Unis) et CC78 (Grèce, Italie et Espagne) qui ont été le plus décrits, tous associés au gène *bla_{VIM-1}* (161).

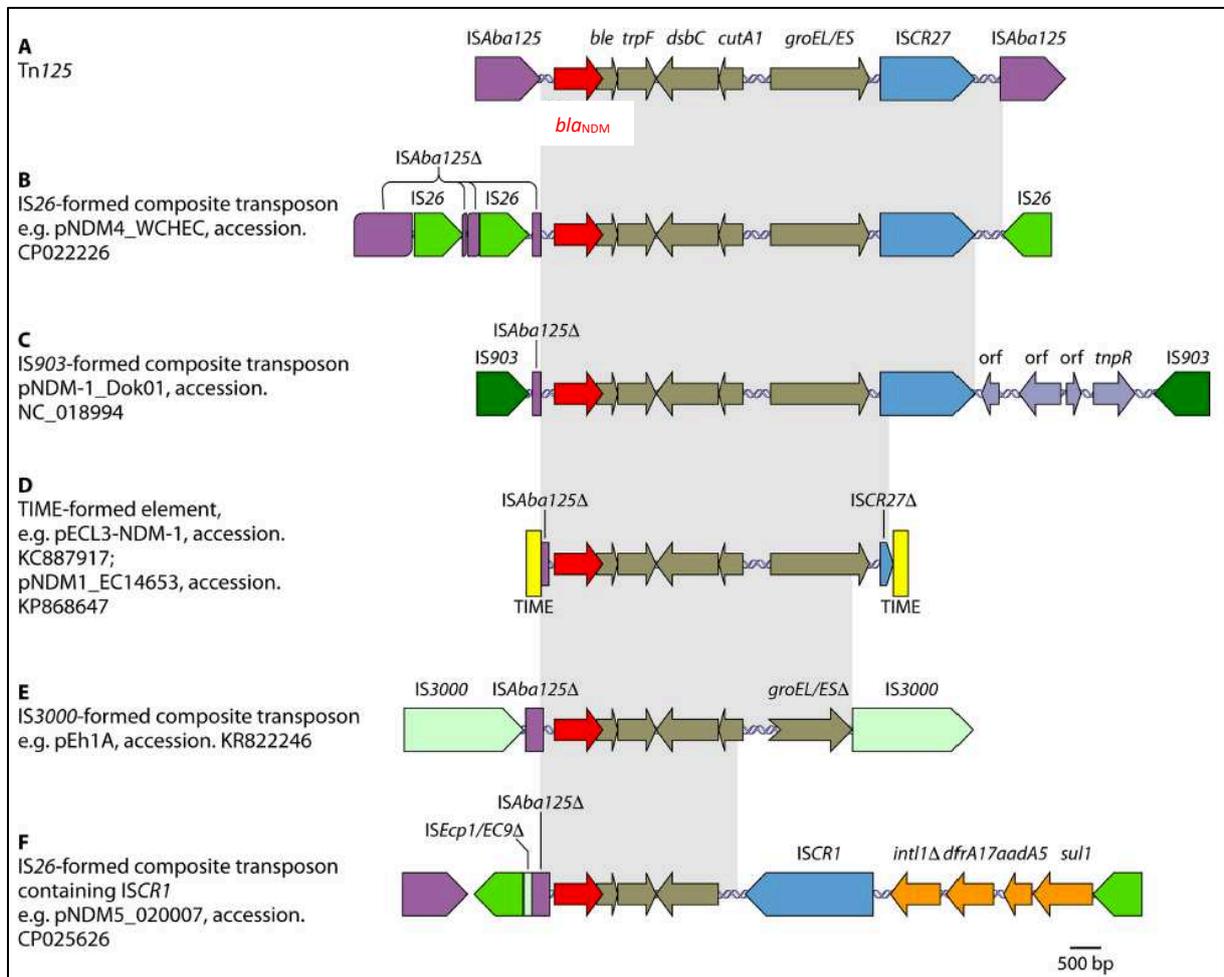


Figure 19. Exemples de contextes génétiques et de mécanismes de mobilisation du gène *bla_{NDM}*. D'après Wu *et al.* (141)

(A) Tn125 formé par deux copies de *ISAbal25*. (B) Transposon composite formé par deux copies de l'*IS26*. (C) Transposon composite formé de deux exemplaires de *IS903*. (D) Élément formé par deux copies du *TIME*. (E) Transposon composite formé par deux copies de l'*IS3000*. (F) Contextes génétiques contenant l'*ISCR1*. Cet élément est également flanqué de deux copies de l'*IS26*. Les noms des plasmides et les numéros d'accès GenBank sont indiqués. Le sigle Δ représente les gènes ou éléments tronqués.

Les métallo-bêta-lactamases de type IMP

Les enzymes IMP (IMiPénémases) sont les premières MBLs acquises à avoir été détectées chez une souche de *P. aeruginosa* en 1988 (IMP-1), puis chez une souche de *S. marcescens* en 1994, au Japon (175,176). Il existe aujourd'hui 89 variants d'enzymes de type IMP (<http://bldb.eu> et <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#imp>). Si ces carbapénémases n'ont pas connu une

expansion mondiale au même titre que NDM ou VIM, elles ont néanmoins diffusé en Asie du Sud-Est, en Chine et en Australie (177–179). De récentes études australiennes ont ainsi décrit la dissémination de souches de *E. cloacae* IMP-4 et de plasmides de type IncHI2 comme vecteur de ces carbapénèmases (180,181). Une épidémie de *E. cloacae* IMP-4, probablement avec une origine australienne et liée aux évacuations sanitaires, a d'ailleurs été observée en 2018 en Nouvelle-Calédonie (20). Les isolats exprimant une carbapénémase IMP ont la caractéristique d'avoir parfois un bas niveau de résistance à l'imipénème, si bien que jusqu'à 20% des entérobactéries IMP peuvent être catégorisées sensibles à cet antibiotique (182). Les gènes *bla*_{IMP} sont également des gènes cassettes d'intégrons de classe I le plus souvent et eux-mêmes portés par des plasmides conjugatifs (177).

La Figure 20 résume la dissémination mondiale des 3 principales MBLs NDM, VIM et IMP chez les entérobactéries ; données récentes publiées en septembre 2020 par **Boyd et al.** (131).

1.3.1.3 Les carbapénèmases de classe D

Les oxacillinasés à activité carbapénémase représentent une petite fraction des bêta-lactamases de type OXA. Ces enzymes, essentiellement décrites chez *A. baumannii*, sont divisées en 2 groupes dont OXA-48 et OXA-23 sont les 2 principales enzymes décrites chez les entérobactéries (183,184).

L'enzyme OXA-48 a été détectée pour la première fois chez une souche de *K. pneumoniae* en Turquie en 2001 (185). Ces enzymes ont depuis largement diffusé dans les pays du pourtour méditerranéen, en Afrique du Nord et en Europe (Figure 21, 186). Certains variants concernant un ou plusieurs AA tels que OXA-181, OXA-232 ont ensuite été détectés dans le sous-continent Indien. D'autres variants tels que OXA-162 (Turquie), OXA-204 (Tunisie), OXA-244 (Espagne) ont également été détectés en Europe ou au Maghreb (187–191).

Ces enzymes sont également décrites de manière sporadique au Canada et aux Etats Unis depuis les années 2010 (192). Les 3 principales entérobactéries portant ces enzymes qualifiées d'OXA-48-like sont *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae*. En France, les EPC de type OXA-48-like représentent la majeure partie des EPC recensées chaque année par le CNR de Bicêtre, même si leur proportion a légèrement diminué ces dernières années (71,8% en 2018 vs. 75,5% en 2012). Depuis 2012, neuf variants de la bêta-lactamase OXA-48 possédant une activité carbapénémase ont été identifiés en France (OXA-48, OXA-162, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-370, OXA-484 et OXA-517).

Une diversification des enzymes OXA-48-like est constatée depuis 2012 et OXA-181 représente le variant le plus prévalent (environ 11% des souches reçues en 2018).

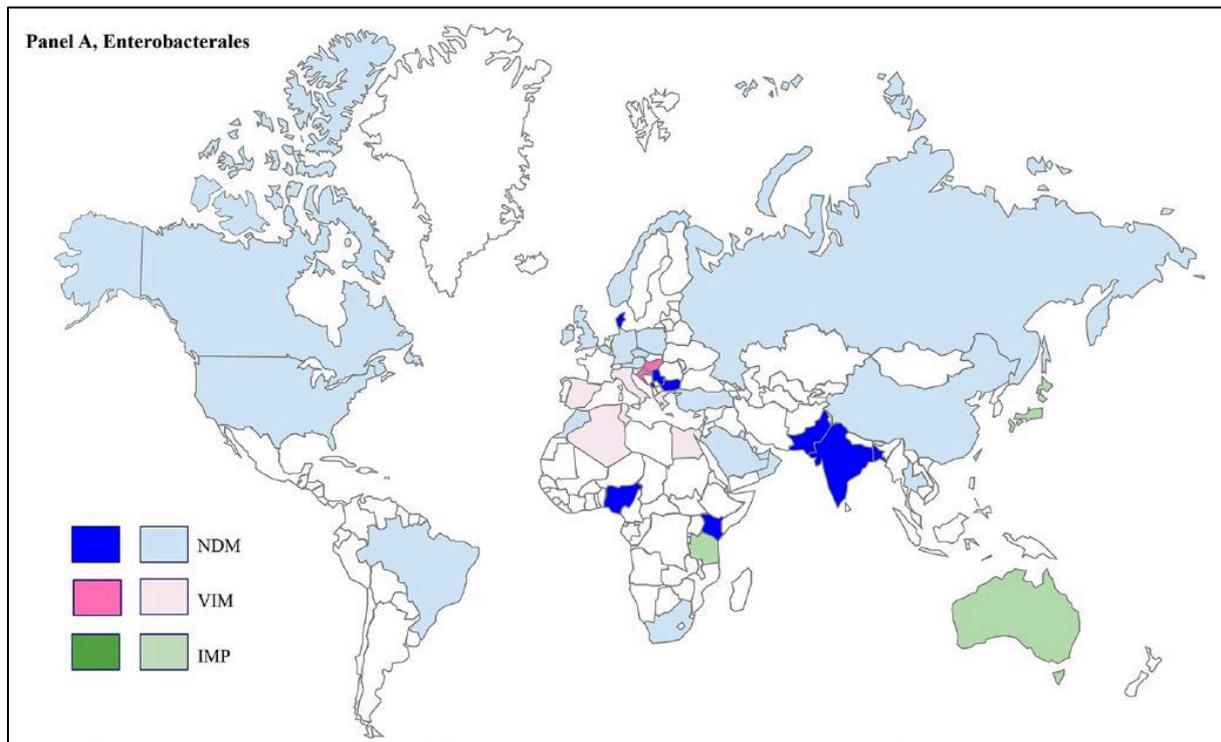


Figure 20. Distribution mondiale des trois principales MBLs NDM, VIM et IMP chez les entérobactéries. D'après Boyd *et al.* (131)

Les couleurs foncées sont utilisées pour les pays où la MBL mentionnée est la plus prévalente. Les couleurs claires indiquent les pays où la MBL mentionnée est la MBL plus prévalente, mais où les sérine-carbapénémases (KPC ou OXA-48-like) prédominent dans le pays.

Les enzymes de type OXA-48-like ont un spectre d'hydrolyse spécifique : elles hydrolysent faiblement les carbapénèmes (l'imipénème, davantage que le méropénème) et la ceftazidime et sont peu inhibées par l'acide clavulanique, l'EDTA, à l'exception de l'avibactam. Elles hydrolysent les pénicillines mais pas les autres C3G ou la témocilline, si bien qu'elles peuvent être catégorisées sensibles à certains carbapénèmes comme l'ertapénème, l'imipénème ou le méropénème. En général, les souches qui expriment un haut niveau de résistance aux carbapénèmes résultent de l'association avec une BLSE sous-jacente ou un mécanisme non enzymatique de type imperméabilité membranaire (193). Ce spectre de substrat peut rendre ces enzymes difficiles à détecter par des méthodes phénotypiques (antibiogramme) même si certains algorithmes, notamment utilisant le claventin et la témocilline ont été proposés (194). Le gène *bla*_{OXA-48} est souvent retrouvé sur un transposon composite de type Tn1999 (composé de 2 séquences d'insertion IS1999 de part et d'autre du gène *bla*_{OXA-48}) et sur des plasmides

du groupe IncL/M. Il est fortement suspecté que le progéniteur naturel des enzymes OXA-48-like soit du genre *Shewanella* (*S. oneidensis* et *S. xiamenensis*) chez lesquelles des analogues du transposon Tn1999 ont été retrouvés (195).

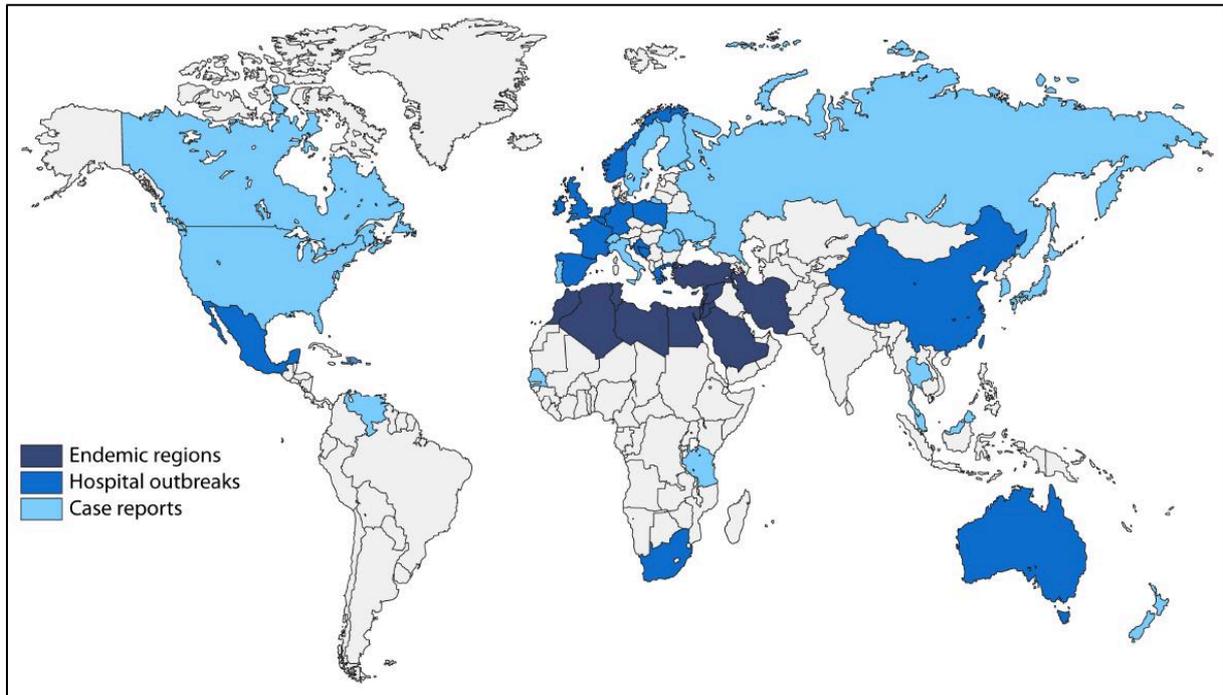


Figure 21. Distribution géographique des entérobactéries productrices de l'enzyme OXA-48. D'après Pitout et al. (186)

L'enzyme OXA-181 a été pour la première fois détectée dans des hôpitaux indiens (New-Delhi, Mumbai) en 2006-2007, puis en France, aux Pays-Bas, à Oman et en Nouvelle-Zélande (Figure 22, 186). Le gène *bla*_{OXA-181} est le plus souvent situé en aval d'un élément d'insertion de type *ISEcp1* sur un transposon Tn2013, lui-même situé sur un plasmide de type IncT (196). L'enzyme OXA-181 a un spectre d'hydrolyse analogue à celui d'OXA-48 au détail près qu'elle hydrolyse plus l'imipénème (k_{cat}/K_m à 550 vs. 330 $\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$) et moins le méropénème (k_{cat}/K_m à 1,5 vs. 6 $\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$) (186).

Il est à noter que l'enzyme OXA-23 a récemment été décrite chez des souches communautaires de *P. mirabilis* en France (197). Ces souches expriment un faible niveau de résistance aux carbapénèmes y compris l'ertapénème, si bien qu'elles sont sans doute sous diagnostiquées par les laboratoires de microbiologie en France.

1.3.1 Autres mécanismes de résistances aux carbapénèmes

Les entérobactéries peuvent devenir résistantes aux carbapénèmes par des mécanismes cumulatifs associant la production d'une pénicillinase/céphalosporinase à haut niveau ou d'une BLSE, associée à un certain degré d'imperméabilité membranaire (24,198). En effet, l'efficacité de l'enzyme dépend de son affinité et sa capacité d'hydrolyse du substrat (k_{cat}/K_m) mais est aussi fortement liée à la concentration de l'antibiotique dans le périplasme. Ainsi, des antibiotiques pénétrant très peu dans le périplasme peuvent être inhibés même si l'enzyme présente un k_{cat}/K_m faible pour cet antibiotique. Cet exemple est bien décrit avec la perte de porine OprD2 chez *P. aeruginosa* aboutissant à une résistance à l'imipénème chez des souches dépourvues de carbapénémase et surproduisant uniquement la céphalosporinase AmpC (199). Certaines souches de *K. pneumoniae* surproduisant la pénicillinase naturelle SHV-1 peuvent ainsi avoir des sensibilités diminuées au ceftazidime et à l'ertapénème en cas d'association avec une imperméabilité membranaire (200).

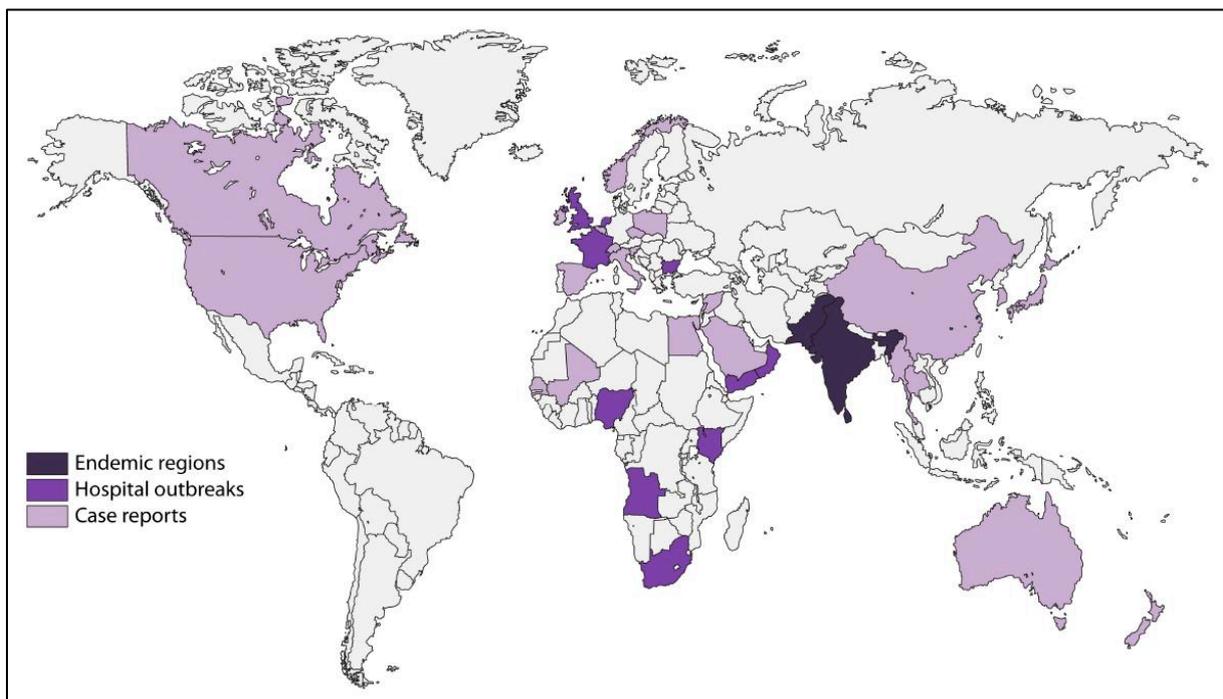


Figure 22. Distribution géographique des entérobactéries productrices de l'enzyme OXA-181. D'après Pitout *et al.* (186)

Concernant les entérobactéries, les principales bêta-lactamases rencontrées en France sont résumées dans le Tableau 6 ci-après (20,201)

Tableau 6. Principales bêta-lactamases rencontrées chez l'Homme en France.

Classes (de Ambler)	Pénicillinases (ou bêta-lactamases à spectre restreint)	BLSE	Céphalosporinases	Carbapénèmes
A	TEM-1, -2 SHV-1	CTX-M-15, -14, -27, -1, -3 SHV-12 TEM-3 VEB-6		KPC-2, -3 IMI-1, GES-5, SME-4
B				NDM-1,-5, -6, -7 IMP-1,-4,-10 VIM-1,-2, -4,
C			AmpC DHA-1, -7, CMY-2, -4, -42 FOX-3	
D	OXA-1, -10			OXA-48, -181, -232, -244, -23

2 Concept *One Health* appliqué à l'antibiorésistance

Le concept *One Health* ou « une seule santé » en français est né en 2004 lors du congrès de la société pour la conservation de la vie sauvage (Wildlife Conservation Society). Prenant sa source dans le concept *One Medecine* qui préconise une réponse aux zoonoses combinant médecine humaine et médecine vétérinaire, il y intègre la santé des écosystèmes. Ainsi, la santé de l'homme n'est pas *stricto sensu* liée à lui seul mais également à son environnement (Figure 23). Il s'agit d'une approche non anthropocentrique abordant un problème comme multifactoriel en émettant des hypothèses sur les facteurs influençant la santé humaine et en tentant de les vérifier par une démarche scientifique. Concernant le problème majeur de l'antibiorésistance, cette approche a émergé dans les années 2000 avec la prise de conscience des liens étroits entre la santé humaine, celle des animaux et l'état écologique global. Cette approche vise à promouvoir une approche pluridisciplinaire et globale des enjeux sanitaires. L'ANSES a été un promoteur de cette vision auprès des autres instituts scientifiques français. Elle coordonne notamment le programme conjoint européen *One Health EJP* (2018-2023) qui rassemble 39 partenaires de 19 pays européens (<https://onehealthjep.eu/>). Ce programme a pour objectif l'acquisition de connaissances nouvelles dans les domaines des zoonoses alimentaires, de l'antibiorésistance et des risques infectieux émergents. Les liens pouvant plus particulièrement relier l'Homme à l'animal sont détaillés Figure 24 (202). Ce concept est aujourd'hui promu par les institutions internationales que sont l'Organisation mondiale de la santé (OMS),

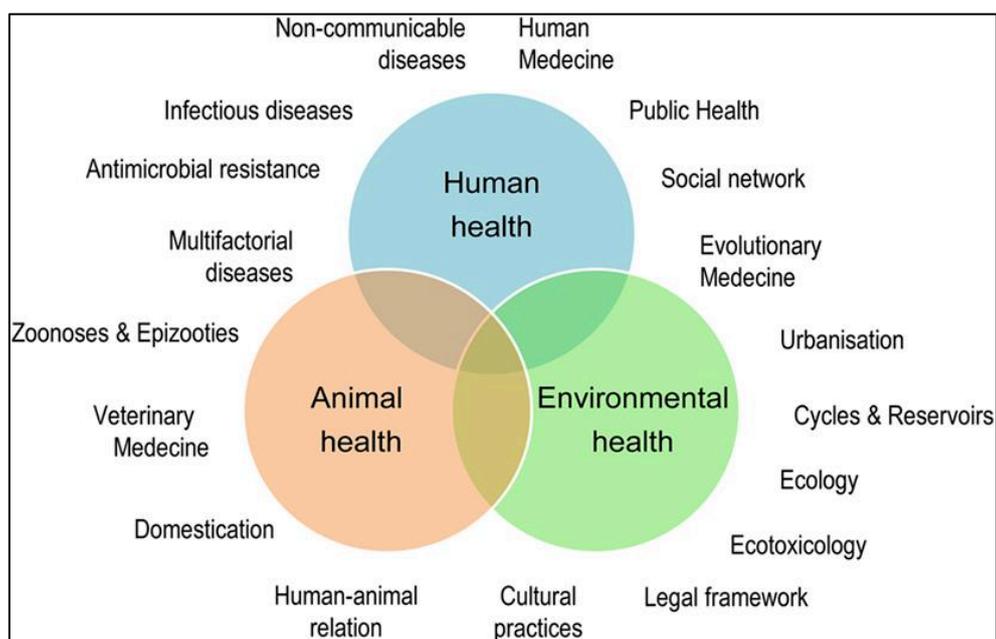


Figure 23. Le concept *One Health*. Ce concept transdisciplinaire promeut une approche unifiée et globale de la santé humaine, animale et environnementale. D'après Destoumieux-Garzón *et al.*(203)

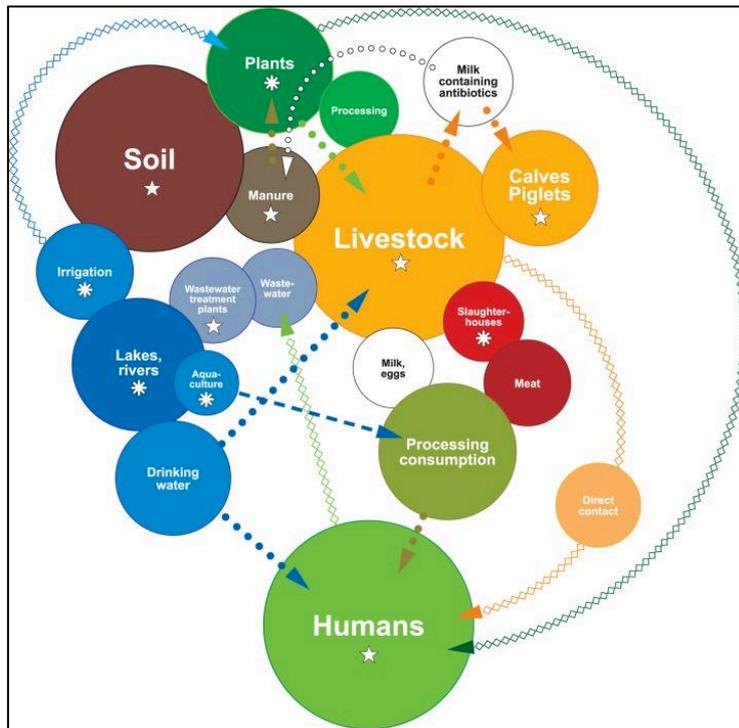


Figure 24. Carte des voies de l'antibiorésistance dans l'agriculture, l'environnement et l'industrie agroalimentaire. D'après Thanner *et al.* (202)

Ces mouvements sont indiqués par des cercles et des flèches qui se chevauchent ; différentes couleurs définissent différents groupes de réservoirs. Les étoiles indiquent les points chauds des gènes de résistance et des bactéries multi-résistantes liés à des densités bactériennes élevées, la disponibilité des nutriments et la pression sélective dans le tube digestif du bétail et des humains, dans les installations de stockage du fumier, les stations de traitement des eaux usées et dans la rhizosphère. Les astérisques indiquent les points chauds possibles dans l'eau, les sédiments et les biofilms en aquaculture, dans les rivières, les lacs et les systèmes d'irrigation, ainsi que dans les abattoirs et sur les surfaces des plantes.

l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) et l'Organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation (FAO). Un accord tripartite a été signé en 2010 entre ces trois organisations pour collaborer sur cette thématique (204). De nombreux appels à projets comme le très récent PPR AMR « Antibiorésistance : comprendre, innover, agir » de l'ANR en France demande aujourd'hui de proposer des projets de recherche dans cet optique de santé globale (<https://anr.fr/fr/detail/call/antibioresistance-comprendre-innover-agir-appel-a-projets-2020/>).

Plusieurs schémas plus ou moins complexes sont proposés pour illustrer cette vision innovante (Figure 25, 205). Les 3 principaux compartiments explorés dans l'antibiorésistance sont l'Homme, l'animal (y compris la filière alimentaire qui en est issue) et l'environnement. Les interactions entre ces 3 secteurs sont fortement influencées par la production (industrie pharmaceutique) et la consommation des antibiotiques. Bien qu'il existe des espèces bactériennes adaptées et retrouvées uniquement

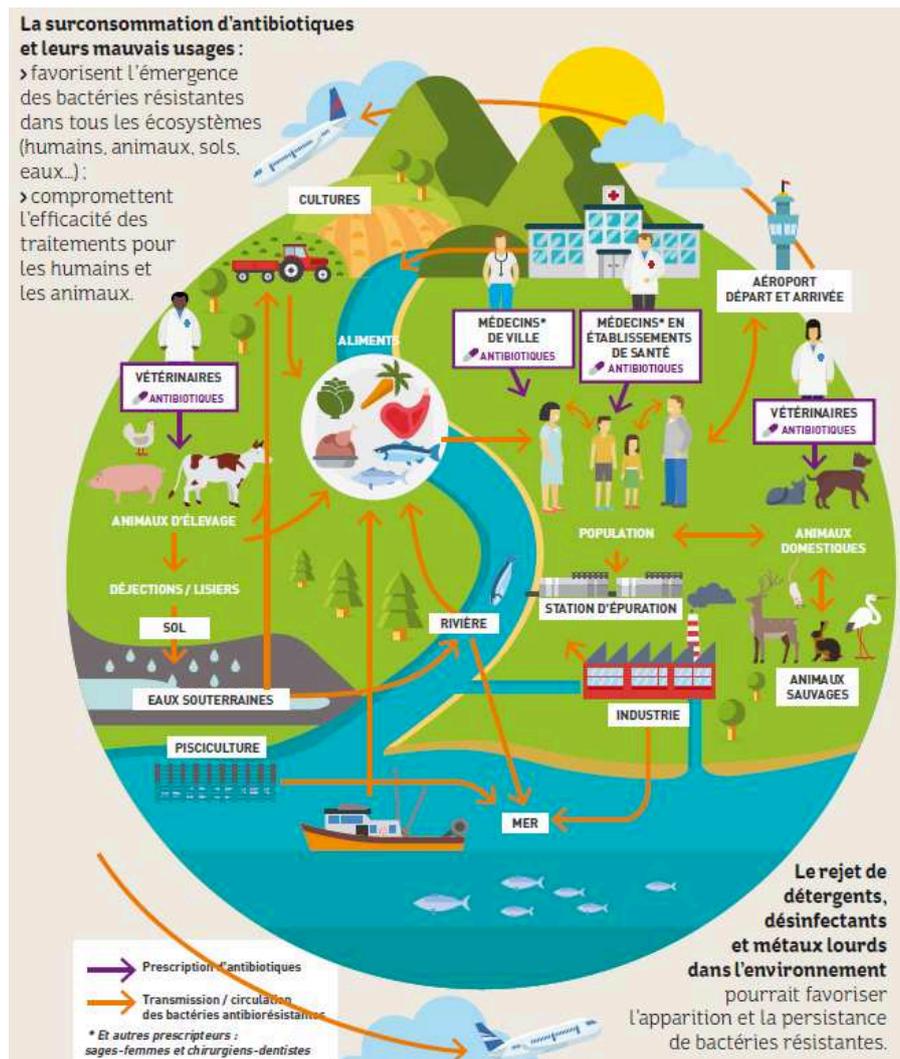


Figure 25. Infographie détaillée illustrant l'approche *One Health* appliquée à l'antibiorésistance (Rapport Santé Publique France, Antibiotiques et résistance bactérienne : une menace mondiale, des conséquences individuelles, Novembre 2019, (205)

dans certains réservoirs, beaucoup sont communes aux humains, aux animaux et à l'environnement. Certains antibiotiques utilisés pour traiter les infections humaines ou animales sont donc similaires comme les bêta-lactamines, les fluoroquinolones, les sulfamides ou les polymyxines.

Aujourd'hui en France, l'évolution de la consommation des antibiotiques n'est pas la même dans le secteur des santé humaine et animale. Suite aux plans EcoAntibio 1, la prescription des antibiotiques chez les vétérinaires a fortement baissé entre 2012 et 2016 (-37%), au-delà de l'objectif fixé de moins 25%. Le dernier rapport 2019 du réseau RESAPATH de l'ANSES sur les résistances au Ceftiofur chez *E. coli* montrait une baisse dans tous les secteurs (Figure 26, 206). En 2019, ce réseau a analysé 53 469 antibiogrammes issus d'élevages de rente, et les bovins, les volailles et les porcins représentaient respectivement 20,2% ; 19,9% et 6,5%.

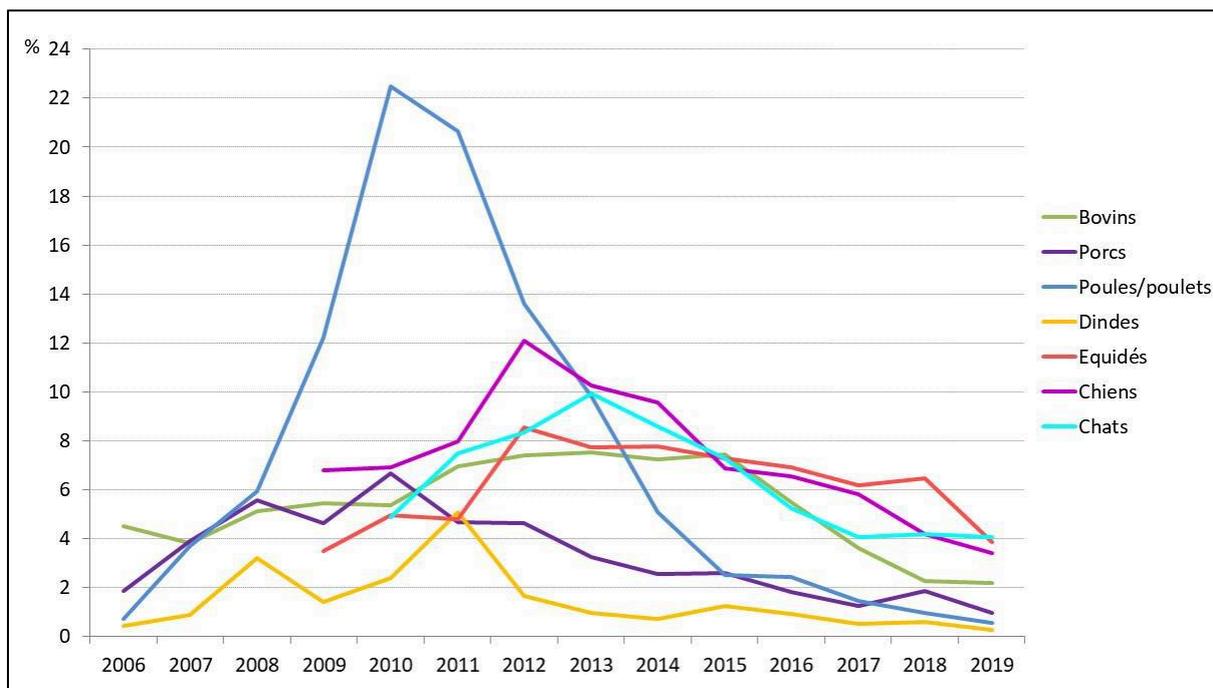


Figure 26. Evolution des proportions de souches de *E. coli* non-sensibles au Ceftiofur chez les animaux en France (2008-2019). Données RESAPATH, bilan 2019 (206).

La situation est différente en médecine de ville ou à l'hôpital où la consommation d'antibiotiques est quasiment restée constante entre 2008 et 2018 (24,1 en 2008 vs. 23,5 doses/1000 hab./jour en 2018) (205). Il faut cependant noter un début de baisse encourageante sur les derniers chiffres de 2019 (-9,6% depuis 2015 en établissement de santé) mais ces résultats sont hétérogènes selon les molécules d'antibiotiques considérées. On note également un infléchissement encourageant des incidences des EBLSE dans les établissements de soins depuis 2017 (0,71 en 2016 vs. 0,53 de densité d'incidence des EBLSE pour 1000 JH). Aujourd'hui, en terme de consommation humaine, 93% des antibiotiques sont consommés en ville ou dans les établissements médico-sociaux (dont 78% sont prescrits par ces mêmes secteurs et 15% pour des patients sortants de l'hôpital). Les autorités de santé insistent aujourd'hui pour réduire cette consommation en médecine humaine dans tous les secteurs. La France est l'un des pays les plus consommateurs d'antibiotiques en Europe. En effet, dans le rapport annuel 2018 du réseau ESAC-Net de l'ECDC, la France était le 4^{ème} pays le plus consommateur d'antibiotiques en Europe derrière la Grèce, la Roumanie et l'Espagne en terme de DDJ par habitant dans la population communautaire (23,6 DDJ/1000 hab./jour pour une moyenne européenne de 18,4 DDJ/1000 hab./jour) (207). La France est aujourd'hui peu concernée par la production à grande échelle d'antibiotiques et les normes appliquées sur les rejets de ces usines y sont contraignantes. Il n'en est pas de même dans des pays tels que l'Inde ou la Chine qui représentent la très grande majorité de la production mondiale et où les rejets dans l'environnement peuvent favoriser le développement de l'antibiorésistance (208,209).

2.1 Approche sectorielle des différentes populations d'entérobactéries multi-résistantes

2.1.1 Les entérobactéries productrices de CTX-M dans les différents compartiments

Dans le compartiment humain, les EBLSE produisent essentiellement les enzymes de type CTX-M, aujourd'hui très majoritaires. Les 2 principales espèces d'entérobactéries produisant ces enzymes sont *E. coli*, suivi de *K. pneumoniae* (35).

2.1.1.1 Les entérobactéries productrices de CTX-M chez l'Homme

Chez l'Homme, la carte mondiale des variants CTX-M est complexe, mais ce sont principalement les variants CTX-M-15, puis CTX-M-14 (Asie et Espagne) qui dominent (Figure 27, 35,210). Les principales CTX-M présentes en Europe sont celles des groupes 1 (CTX-M-15, -1, -3) et 9 (CTX-M-14, -27) (58). Au début des années 2000, certains variants CTX-M étaient spécifiquement retrouvés dans certains pays comme CTX-M-9 et CTX-M-14 en Espagne, CTX-M-14 en Chine, CTX-M-1 en Italie, CTX-M-2 en Amérique du Sud, en Israël ou au Japon, CTX-M-3 en Pologne ou au Japon ; alors que l'enzyme CTX-M-15 était déjà distribuée mondialement (211). Il s'est ensuite opéré un « shift épidémiologique » concernant certains variants, notamment les CTX-M-2 qui ont régressé alors que les CTX-M-27 ont progressé (Figure 27, 209). Le variant CTX-M-9 a également reculé au profit d'autres variants dans des pays comme l'Espagne, l'Irlande ou le Japon. Dans le même temps, les variants CTX-M-15 et CTX-M-14 ont poursuivi leur expansion mondiale et augmenté leur part relative dans la plupart des pays du monde. Il existe peu de données en Afrique australe avant 2005, mais les enzymes CTX-M-14 et CTX-M-15 semblent également prédominer dans cette zone géographique à partir de 2006, notamment en Afrique du Sud et en Tanzanie (212,213). En France, les principaux variants rencontrés sont CTX-M-15 (71,5% des souches BLSE reçues par le CNR de Clermont en 2018), suivi de CTX-M-14 (5,9%) et CTX-M-1 (4,2%). A l'image des autres pays européens, les variants CTX-M-15 ont progressé en terme de part relative puisque la répartition en 2012 était la suivante : CTX-M-15 (49%), CTX-M-1 (18%) et CTX-M-14 (16%). L'enzyme CTX-M-27 est par contre relativement stable en termes de part relative, de l'ordre 3-4% (20).

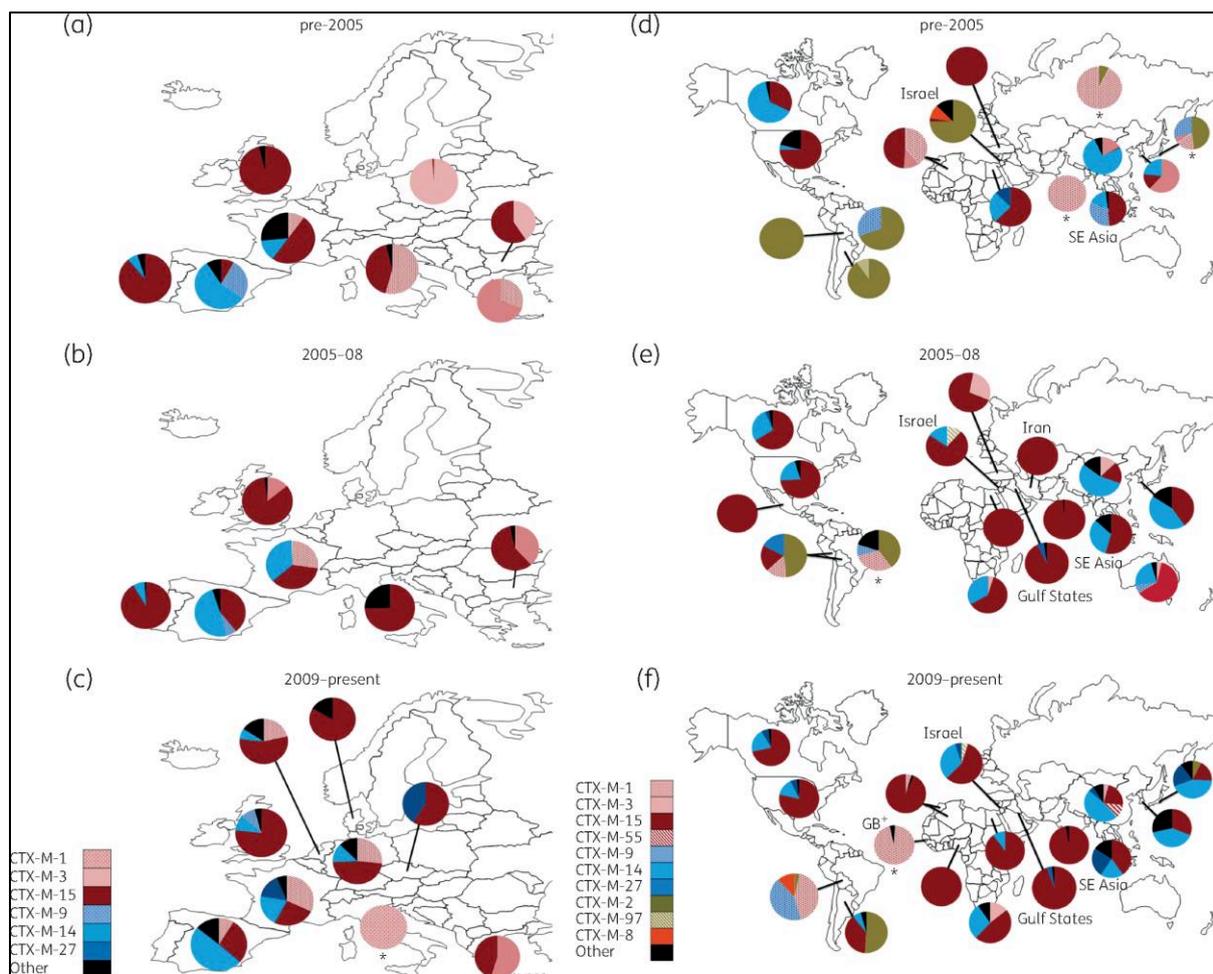


Figure 27. Épidémiologie globale des enzymes CTX-M avec évolution et changement de génotypes au cours du temps. D'après Bevan *et al.* (210)

Les enzymes CTX-M sont principalement produites chez l'Homme par *E. coli* et *K. pneumoniae* ; et dans une moindre mesure par *P. mirabilis* (notamment en Asie : Taiwan, Japon) (35). Mais les enzymes CTX-M peuvent également être produites par les entérobactéries des genres *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp* ou de l'espèce *C. freundii* (42).

2.1.1.2 Les entérobactéries CTX-M chez l'animal et dans la filière alimentaire

Les antibiotiques peuvent être utilisés à faible dose comme facteur de croissance chez les animaux d'élevage. Si cette pratique est interdite depuis 2006 en Europe, elle est toujours pratiquée dans de nombreux pays, notamment aux Etats-Unis. L'utilisation massive des antibiotiques dans les élevages de rente a très probablement favorisée le développement de résistance chez les souches d'entérobactéries de ce compartiment, notamment dans les élevages de volailles et de porcs. Des

souches de *S. enterica* résistantes au Ceftiofur (C2G) par production d'une BLSE ont ainsi connu une forte croissance dans le secteur avicole (214,215). Cette espèce, qui est la 2^{ème} cause de gastroentérites chez l'Homme, peut jouer le rôle de vecteur inter-compartimental de ces BLSE. Les isolats de *E. coli* pathogènes intestinaux peuvent également jouer ce rôle. Concernant les enzymes CTX-M, les principales enzymes rapportées dans ce secteur avicole sont CTX-M-1, CTX-M-8 et CTX-M-15, essentiellement chez les espèces *S. enterica* et *E. coli*. Des souches de *S. enterica* sérotype Infantis CTX-M-1 ont ainsi été décrites en Italie (216). D'autres clones de *S. enterica* sérotype Kentucky CTX-M-1/15 (ST198-X1), à diffusion intercontinentale, ont par ailleurs été décrits en France et au Maroc (217). Des souches de *S. enterica* sérotype Newport, Agona ou Anatum CTX-M-8 (ST113/ST115), possiblement originaire d'Amérique du Sud ont aussi été décrites en Allemagne (218). Plus récemment, des isolats de *S. enterica* CTX-M-1 issus de dinde ont été décrits aux Etats-Unis (219). Plus problématique, on observe également la propagation de l'enzyme CTX-M-1, mais aussi CTX-M-14, -15, -27 et -55 chez des souches de *E. coli* issues d'élevage de poulet au Canada ou aux Philippines (220,221). Une progression de l'enzyme CTX-M-55 a également été décrite entre 2003 et 2012 chez *E. coli* en Chine, où les trois enzymes les plus fréquentes chez les animaux de rente étaient, CTX-M-55, suivie de CTX-M-14 et CTX-M-65 (222). Globalement dans le compartiment animal, CTX-M-14 domine en Asie à l'image du compartiment humain, alors qu'en Europe, c'est l'enzyme CTX-M-1 qui domine, notamment chez les porcs et les volailles, et à l'exception notable des bovins où c'est l'enzyme CTX-M-15 qui a été le plus souvent rapportée (223–225). CTX-M-1 était également décrite comme majoritaire chez les chevaux dans une étude aux Pays-Bas (226). Chez les autres entérobactéries minoritaires dans le compartiment animal comme *K. pneumoniae* et *E. cloacae*, c'est l'enzyme CTX-M-15 qui a été principalement décrite (227–230).

Chez les animaux de compagnie, ce sont principalement les enzymes CTX-M-15 et CTX-M-1 qui ont été décrites, notamment chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, même si les enzymes CTX-M-2 et CTX-M-8 ont été retrouvées en Amérique du Sud (231–234). En France, c'est principalement les BLSE CTX-M-15 et CTX-M-1 qui ont été observées (229,235). De manière intéressante, il a été démontré en Europe et au Japon que certains isolats de *E. coli* CTX-M-15 présents chez les animaux de compagnies appartenaient au même clone épidémique B2-O25b-ST131 prédominant chez l'homme, suggérant ainsi des transmissions inter-compartiments (236,237).

Dans l'alimentation, c'est également CTX-M-1 qui prédomine, principalement chez *S. enterica* et *E. coli*. Il est à noter que dans l'alimentation issue des produits de la mer, un taux important de BLSE a parfois été retrouvé et notamment les enzymes CTX-M-1 et CTX-M-15 (238–240). La contamination des fruits et des légumes par des bactéries productrices de BLSE est moins fréquente (239,241).

Les plasmides les plus fréquemment décrits comme porteurs des gènes *bla*_{CTX-M} chez l'animal appartiennent aux profils d'incompatibilité IncF, IncI1, IncN et IncHI1 (242–244). Plus particulièrement, les plasmides IncI-1 (ST3 et ST7) et IncF(II) sont respectivement associés aux gènes *bla*_{CTX-M-1} et *bla*_{CTX-M-15}, et peuvent représenter de potentiels vecteurs de transmission inter-compartmentaux (241-243).

Enfin, des entérobactéries productrices de BLSE de type CTX-M ont également été décrites dans la faune sauvage et notamment chez les oiseaux (oiseaux migrateurs, mouettes). L'enzyme CTX-M-15 a par exemple été trouvée chez des mouettes et des pélicans aux Etats-Unis, des vautours en Espagne, d'autres oiseaux sauvages en Suisse et des sangliers en Allemagne (248–252). Néanmoins, la prévalence de ces bactéries multi-résistantes semble beaucoup plus faible chez les animaux sauvages que chez les animaux d'élevage.

2.1.1.3 Les entérobactéries CTX-M dans l'environnement

Comme présenté ci-dessus, l'origine même des gènes *bla*_{CTX-M} est l'environnement puisque leur progéniteur *Kluyvera spp* est une entérobactérie présente naturellement dans la rhizosphère (210). L'environnement joue ainsi un rôle important dans le transfert des gènes de résistance, favorisé par les rejets d'antibiotiques dans ce compartiment. De plus, l'environnement est de plus en plus contaminé par des *excreta* d'origine humaine ou animale aboutissant à un potentiel cycle de transmission des entérobactéries BLSE, notamment dans les pays en voie de développement où les conditions sanitaires sont dégradées et favorisent les contaminations féco-orales (209). De plus, la présence de gène *bla*_{CTX-M} dans des cassettes d'intégrons de classe I, souvent associé aux gènes *qnr* de résistance aux fluoroquinolones, permet la co-sélection des bactéries qui en sont porteuses dans des environnements fortement contaminés par ces antibiotiques, comme par exemple en Inde (253). Ce phénomène peut également avoir lieu avec des molécules non antibiotiques tels que les métaux lourds ou certains biocides ou antiseptiques (254). Les principales enzymes retrouvées dans l'environnement sont les enzymes CTX-M-15, CTX-M-14 et CTX-M-1 (255–259). De manière surprenante, une récente étude française a démontré que l'on pouvait trouver une forte prévalence de ces entérobactéries BLSE même dans des environnements peu anthropisés telles que les tourbières et les zones humides d'eau douce où les enzymes CTX-M-15, CTX-M -1, CTX-M -14 et CTX-M-27 étaient retrouvées par ordre décroissant de prévalence (260).

2.1.2 Les entérobactéries productrices de SHV

2.1.2.1 Les entérobactéries SHV chez l'Homme

Dans le monde, les 4 principaux variants BLSE de SHV sont SHV-2/2a, SHV-5 et SHV-12, essentiellement retrouvés chez *K. pneumoniae* et *E. coli*. Les SHV les plus fréquentes en Europe sont SHV-5 et SHV-12 (28). En particulier, les variants SHV-5 ont notamment été décrits en Grèce, où ils représentaient jusqu'à 2006 la première BLSE en termes de prévalence. Des isolats de *K. pneumoniae* ST20/SHV-5 ont été notamment à l'origine d'épidémies intra-hospitalières (261,262). En France, l'enzyme SHV-12 était la plus représentée dans les souches reçues par le CNR, mais cette famille ne représentait que 2,6% des souches résistantes aux C3G reçues par le CNR en 2018 (20).

2.1.2.2 Les entérobactéries SHV dans les autres compartiments

La récente revue réalisée par **Liakopoulos et al.** souligne la dissémination des enzymes SHV dans différentes niches écologiques telles que la nourriture produite à partir des animaux de rente, les animaux de compagnie, les environnements aquatiques, ou les légumes (cf. Figure 3, 27). Les mêmes variants SHV-2/2a, -5 et -12 sont fréquemment retrouvés tant chez les animaux de rente que dans l'alimentation. L'enzyme SHV-2 a été essentiellement décrite chez les poulets aux Pays-Bas, au Japon, en Espagne ou au Canada mais également chez des porcs en Espagne (239,263–265). L'enzyme SHV-5 a été identifiée en Tunisie dans divers marchés et boucheries mais c'est SHV-12 qui est l'enzyme la plus décrite à la fois chez les volailles, les porcs et les bovins mais également chez les oiseaux, les animaux de compagnie et dans les végétaux (239,266–270). Le gène *bla*_{SHV-12} semble être porté par des plasmides de type Inc11-ST5 dans le compartiment animal. Les enzymes SHV-11, SHV-12, SHV-28 et SHV-167 ont également été retrouvées chez les animaux sauvages (249,271).

L'enzyme SHV-12 a également été détectée dans les eaux usées issues d'égouts ou d'effluents de stations d'épuration au Bangladesh mais aussi en Europe (Suisse, Pologne, Croatie et Serbie) ou encore dans des eaux côtières au Portugal (28).

2.1.3 Les entérobactéries productrices de TEM

2.1.3.1 Les entérobactéries TEM chez l'Homme

En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae* et TEM-52 chez *S. enterica* et *E. coli* (30,40). En France, le bilan d'activité du CNR de Clermont rapporte, entre 2012 et 2018, que les enzymes TEM ne représentaient qu'une part négligeable des BLSE retrouvées en médecine humaine (moins de 10 isolats par an), de l'ordre de 1% des souches résistantes aux C3G reçues chaque année.

2.1.3.2 Les entérobactéries TEM dans les autres compartiments

L'enzyme TEM-52 est l'enzyme la plus souvent détectée dans les compartiments animaux et environnementaux (239,271). Dans certaines études comme celle de **Ceccarelli et al.** menée entre 2007 et 2017 aux Pays-Bas sur un panel diversifié d'animaux de rente (poulets, dindes, porcs, bovins, canards), l'enzyme TEM-52 et ses variants occupaient la 2^{ème} place en termes de prévalence (9,7%), derrière CTX-M-1 mais devant SHV ou CTX-M-15 (272). Le gène *bla*_{TEM-52} semble plutôt être porté par des plasmides de type IncI1-ST36 dans le compartiment animal (29).

La Figure 28 illustre l'ensemble des souches de *E. coli* BLSE/AmpC détectées chez l'Homme, l'animal et dans l'environnement aux Pays-Bas entre 2005 et 2017 (239).

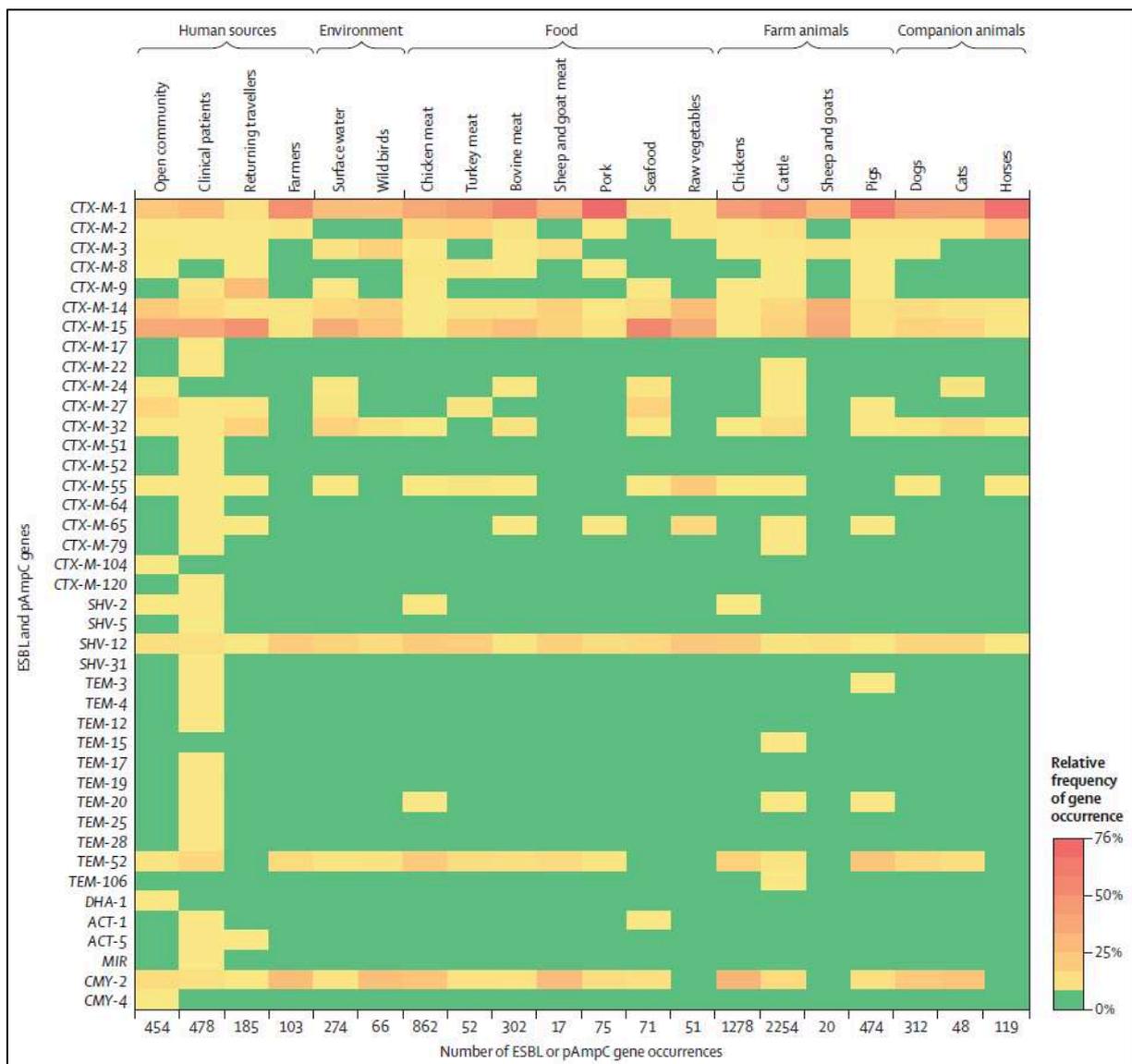


Figure 28. Fréquences des gènes codant pour des BLSE ou des céphalosporinases plasmidiques détectées dans des isolats de *E. coli* de sources humaines et non humaines aux Pays-Bas entre 2005-2017. D'après Mughini et al. (239)

Il est à noter que la céphalosporinase acquise CMY-2 est la plus fréquemment rapportée chez les animaux de rente et de compagnie, notamment associée à des plasmides de type IncA/C et IncFII (239,273–276). Cette BLSE a également été fréquemment décrite chez les mouettes, aux Etats-Unis ou en Australie (248,277).

2.2 Les études *One Health* sur les entérobactéries multi-résistantes

2.2.1 *Escherichia coli*, le meilleur candidat d'étude ?

E. coli est à la fois une bactérie commensale de la flore digestive des vertébrés et un pathogène opportuniste chez les mammifères et les oiseaux (39). Il est le germe aérobie prédominant de la flore commensale digestive chez l'Homme avec une densité dans les selles évaluée à 10^7 à 10^9 UFC par gramme de selles. *E. coli* est ainsi présent dans de multiples écosystèmes animaux et humains, mais également dans l'environnement. En effet, du fait de la contamination des eaux usées par les *excreta* humains, et des charges résiduelles présentes dans les effluents des stations d'épuration, *E. coli* colonise également les rivières mais aussi d'autres environnements moins anthropisés telles que les tourbes et les zones humides (260). Il est un marqueur de contamination fécale dont la quantification (coliformes le plus souvent) est évaluée avec celle des entérocoques pour déterminer la qualité des eaux comme les eaux de baignade et l'eau potable pour les laboratoires d'analyses des eaux assermentés (278). Un autre point intéressant est que *E. coli* est à la fois le 1^{er} germe en termes de prévalence des infections en France tant dans le secteur hospitalier que communautaire (5). De plus, entre 2012 et 2018, la part relative de l'espèce *E. coli* dans les souches productrices de BLSE reçues par le CNR de Clermont-Ferrand est stable (24% en 2012 ; 21,3% en 2018) en 2^{ème} position derrière *K. pneumoniae*. L'espèce *E. coli* est ainsi le candidat de choix pour l'approche *One Health* sur lequel la grande majorité des études se sont focalisées (BLSE uniquement, ou BLSE et AmpC acquises), même si de rares études sur *K. pneumoniae* ont également été réalisées.

Nous avons ainsi réalisé une revue des publications *One Health* les plus pertinentes sur la transmission d'isolats de *E. coli* (et *K. pneumoniae*) résistants aux C3G entre les 3 compartiments humains, animaux et environnementaux.

2.2.2 Homme – environnement

Zarfel et al., Autriche, 2013 (279) : Cette étude a comparé des isolats de *E. coli* collectés (i) d'une part dans 5 stations d'épuration de la région de Graz en 2009 (boues d'épuration) et (ii) chez des patients atteints d'infections urinaires à *E. coli* BLSE dans l'hôpital universitaire de Graz. Cinquante isolats ont pu être obtenus dans chaque compartiment. Les gènes *bla*_{CTX-M-15} et *bla*_{CTX-M-1} étaient retrouvés en proportion analogue dans les boues (44% et 40%, respectivement) alors que *bla*_{CTX-M-15} dominait chez les patients (76%). Sur la base de l'analyse phénotypique (biochimique et co-résistances aux

antibiotiques) et des plasmides (où *bla*_{CTX-M-15} était associé principalement aux plasmides de type IncIA et IncIB), les auteurs concluaient que les isolats responsables d'infections urinaires étaient très probablement une source d'isolats BLSE retrouvée dans les boues d'épuration même si d'autres sources notamment animales devaient également intervenir (*bla*_{CTX-M-1}). Enfin, ils insistaient sur la nécessité d'éliminer ces bactéries BLSE avant l'épandage de ces boues pour éviter la contamination de l'environnement et notamment de la filière alimentaire issue de maraîchage.

Leonard et al., Royaume-Uni, 2018 (280) : Cette étude a tout d'abord consisté à évaluer le taux de contamination des eaux côtières en Angleterre et au Pays de Galles en 2012 puis à réaliser une étude transversale pour évaluer la probabilité d'être colonisés à *E. coli* BLSE chez 2 groupes d'individus. Un groupe exposé aux eaux côtières composé de surfeurs et un groupe contrôle composé d'individus très peu exposés à ces eaux. Les auteurs ont démontré que la fréquence de contamination des eaux côtières par *E. coli* BLSE des eaux côtières était faible (0.07%) mais que les surfeurs (n=143) avaient un risque significativement plus élevé d'être colonisés par *E. coli* BLSE que le groupe contrôle (n=130) ; 6,3% de colonisation vs. 1,5%, respectivement (p=0,046). Les auteurs concluaient que l'environnement pouvait ainsi jouer un rôle de réservoir de contamination pour l'Homme et que des études complémentaires devaient être réalisées dans les autres niches environnementales connues comme colonisées par des entérobactéries BLSE.

Martak et al., France, 2020 (260) : Cette étude avait pour but d'évaluer la persistance dans l'environnement, et plus précisément dans les zones humides associées aux rivières (bras-morts), des isolats de *E. coli* BLSE et de comprendre les sources de contamination de ces environnements. Les auteurs ont collecté 179 isolats d'*E. coli* dans 16 zones humides et 3 rivières entre mars 2015 et mars 2016. Parmi ces 179 isolats, 49 produisaient une BLSE et 5 une céphalosporinase acquise. Les phylogroupes B1, B2 et A prédominaient chez les isolats de *E. coli* tandis le phylogroupe A prédominait chez les souches résistantes aux C3G. Les 4 principales enzymes BLSE retrouvées étaient CTX-M-15, CTX-M-1, CTX-M-14 et CTX-M-27 représentant respectivement 43%, 24%, 17% et 7% des isolats C3G-résistants. Les STs des isolats appartenant aux phylogroupes B2 et D et issus des zones humides ont été associés à d'autres STs issus d'isolats cliniques ou d'effluents de station d'épuration de la même zone géographique, puis comparés à 4195 STs de la base Enterobase. Les isolats cliniques et environnementaux étaient dispersés sur l'ensemble de l'arbre, démontrant qu'il n'existait pas une population spécifique à ces environnements (Figure 29). Les auteurs émettaient ainsi l'hypothèse que la forte proportion d'isolats appartenant au groupe B2/A et B1 ainsi que le résistome des souches étaient probablement dus à des contaminations d'origine humaine (*via* les effluents de stations d'épuration et les boues) ou animale (*via* le ruissellement superficiel ou l'épandage du fumier), respectivement. Enfin, les auteurs concluaient que ces isolats résistants aux C3G d'origine humaine ou

animale étaient capables d'atteindre et de survivre dans ces environnements éloignés et peu anthropisés, et qui apparaissent finalement comme une dilution des isolats de *E. coli* retrouvés dans les flores digestives humaine et animale.

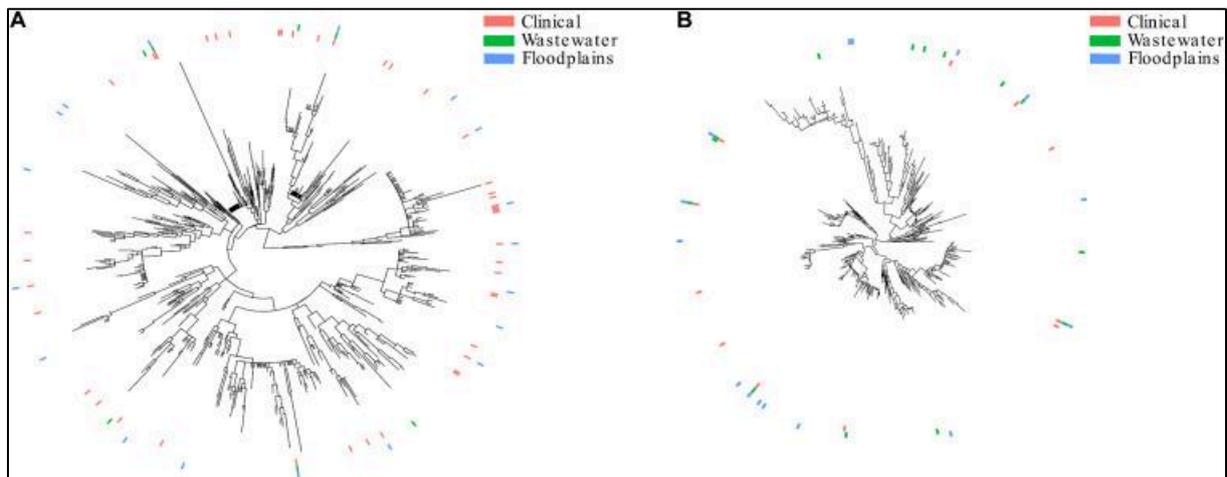


Figure 29. Structure de la population de *E. coli* prélevée dans les plaines d'inondation, les milieux cliniques et les stations d'épuration des eaux usées. D'après Martak *et al.* (260)

(A) Sous-arbre des isolats appartenant au phylogroupe B2.

(B) Sous-arbre des isolats appartenant au phylogroupe D. La présence de ST dans les milieux cliniques, les stations d'épuration et les plaines d'inondation est représentée par des lignes rouge, vertes et bleues, respectivement.

Synthèse de cette minirevue : Il existe finalement peu d'études ayant à la fois détecté des BLSE dans le compartiment environnemental (uniquement) en tentant de les comparer avec les souches humaines, ou de déterminer l'origine de ces contaminations. Cependant, les auteurs s'accordent sur le fait que la contamination de l'environnement par les entérobactéries BLSE, et tout particulièrement *E. coli*, est le résultat des rejets des *excreta* humains, *via* les stations d'épuration et dans une moindre mesure par les animaux. Une question reste néanmoins posée à savoir la re-contamination de l'Homme à partir de l'environnement ? L'étude anglaise sur les surfeurs le démontre dans un environnement aquatique côtier. Cependant, très peu voire aucune autre étude (méthodologiquement pertinente) n'a permis de clairement mettre en évidence de recontaminations humaines issues de milieux anthropisés, notamment à partir des cultures maraichères par l'épandage de boues d'épuration ou d'*excreta* d'origine animale (fumier, lisier).

2.2.3 Homme – animal/filière alimentation

2.2.3.1 Animaux de rente

Leverstein-van Hall *et al.*, Pays-Bas, 2011 (281) : Cette étude avait pour but de comparer des isolats de *E. coli* BLSE étiquetés « associés à la volaille », issus de viandes de poulet vendues au détail et d'animaux d'élevage (poulets), à des isolats cliniques de patients isolés au sein d'un réseau de 31 laboratoires, desservant 58 hôpitaux néerlandais. Ainsi, 81 souches BLSE issues de viandes de poulet, 35 souches issues de poulets ont été comparées à 409 souches humaines par analyse des gènes de résistances aux bêta-lactamines, plasmides porteurs de ces gènes (*pMLST*) et STs des isolats. Les gènes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{SHV-2}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{TEM-20} et *bla*_{TEM-52} étaient considérés comme « associés à la volaille » du fait de leur prévalence dans les populations de volailles aux Pays-Bas en 2006. L'analyse a été centrée sur les isolats porteurs des gènes *bla*_{CTX-M-1} (n= 15 + 16 = 31) et *bla*_{TEM-52} (n= 6 + 11 = 17) localisés sur des plasmides de type IncI1 par *pMLST*. Les auteurs indiquaient qu'en termes de gènes de résistances, 35% des isolats humains portaient des gènes « associés à la volaille ». Cette proportion était de 20% des isolats humains en croisant les données des gènes de résistance avec l'analyse *pMLST* des plasmides IncI1, et finalement de 11% en croisant les analyses des gènes de résistance, *pMLST*, et MLST des souches. Les auteurs concluaient en émettant l'hypothèse d'une très probable transmission à l'homme d'isolats de *E. coli* BLSE « reliés à la volaille », le plus probablement *via* la filière alimentaire.

Dierikx *et al.*, Pays-Bas, 2013 (282) : L'objectif de cette étude était de déterminer la prévalence des *E. coli* BLSE/AmpC dans les élevages de poulets et chez les éleveurs de poulets aux Pays-Bas, et de comparer ces isolats entre eux. Les 26 fermes évaluées avaient toutes au moins un prélèvement positif, et 23/26 avaient une prévalence de *E. coli* BLSE au sein de la ferme $\geq 80\%$. Six fermiers parmi les 18 évalués ont eu un prélèvement rectal positif, correspondant aux enzymes CTX-M-1, CMY-2 et SHV-12. Dans chacune de ces 6 fermes, les entérobactéries des poulets ont été comparées à celles de leur propriétaire vis-à-vis des gènes de résistance, des plasmides (*pMLST* et RFLP) et des STs des isolats. Pour 5 des 6 éleveurs positifs, les gènes de résistance correspondaient à ceux trouvés chez les animaux issus de leur élevage. Mais après l'analyse des plasmides, seuls 2 éleveurs avaient des isolats suspectés d'être les mêmes que ceux des animaux de leur ferme (2/18 au final, 11,1%). Les auteurs concluaient que la forte prévalence des entérobactéries *E. coli* BLSE dans les élevages de poulets aux Pays-Bas pouvait avoir un impact sur la santé humaine, notamment par des transmissions directes par contact avec les éleveurs ou par la filière alimentaire.

De Been et al., Pays-Bas, 2014 (283) : L'objectif de cette étude était de comparer des isolats de *E. coli* BLSE/AmpC issus de 2 collections et provenant des 2 compartiments humains et poulets/viande de poulets en utilisant le WGS pour avoir une haute résolution dans l'analyse comparative. La 1^{ère} collection comprenait 10 binômes de souches humain-animal issues d'études précédentes ayant utilisées des méthodes de typages traditionnelles (MSLT, *p*MLST, gènes de résistances) dont l'étude **Leverstein-van Hall et al., Pays-Bas, 2011**. La 2^{ème} collection était composée de souches isolées chez des éleveurs et des poulets. Au total, 32 génomes ont été comparés par WGS. Les auteurs démontraient que les souches de la 1^{ère} collection et de la 2^{ème} collection n'étaient pas similaires et infirmaient la transmission inter-compartimentale suspectée. Les auteurs notaient cependant que certains plasmides à succès pouvaient potentiellement contribuer à la diffusion inter-compartimentale de ces gènes de résistance.

Huijbers et al., Pays-Bas, 2014 (284) : L'objectif de cette étude était d'évaluer la prévalence et les facteurs de risques de colonisation à *E. coli* BLSE/AmpC chez les éleveurs de poulets, leur famille et leurs employés aux Pays-Bas et de comparer les isolats détectés dans ces 2 compartiments. L'étude a évalué 121 individus travaillant ou vivant à proximité de 47 fermes dédiées à l'élevage de poulets. Dix prélèvements poolés de 2 échantillons ont été évalués pour chaque ferme. La prévalence en *E. coli* BLSE/AmpC était de 96,4% dans les fermes. Celle chez les individus étaient de 37,5% ; 25,5% ; 15,7% et 11,4% chez les employés, les éleveurs, les autres membres de la famille et les partenaires, respectivement. L'analyse des questionnaires a démontré que les éleveurs et les employés avaient une durée de contact avec les animaux significativement plus élevée que les partenaires et autres membres de la famille, ainsi qu'un risque plus important de colonisation à *E. coli* BLSE/AmpC. Un total de 43 isolats humains a pu être comparé à 90 isolats issus des animaux : les gènes *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{SHV-12} prédominaient, ainsi que les plasmides de type IncI1. Chez 5 individus (5/43 soit 11,6%), les STs, les profils *p*MLST et le gène de résistance correspondaient, allant dans le sens d'un transfert de l'isolat lui-même. Dans 2 cas supplémentaires, les gènes de résistance étaient portés par des plasmides de la même famille, évoquant un transfert horizontal entre des isolats de *E. coli* entre poulets et humains (en tout, 7/43 soit 16,3%). Dans un cas, un isolat de *E. coli* ST117/CMY-2 était partagé entre l'éleveur et un membre de sa famille. Les auteurs concluaient que les éleveurs, et les personnes travaillant ou vivant à proximité des élevages de poulets, avaient un risque de colonisation plus important par transmission directe par contact ou indirect *via* l'environnement. Ceci d'autant plus que l'épidémiologie des BLSE/AmpC retrouvée chez ces individus était très similaire à celle des animaux, mais différente de celle de la population générale aux Pays-Bas (où l'enzyme CTX-M-15 prédomine).

Day et al., Allemagne, Pays-Bas, Royaume-Uni, 2016 (285) : L'objectif de cette étude était de comparer des souches de *E. coli* BLSE issues d'une collection de 353 isolats provenant de 3 pays et

provenant d'infections chez l'Homme, l'animal et de la filière alimentaire par méthodes conventionnelles (MLST, *p*MLST, gènes de résistance). Les gènes *bla*_{CTX-M-1} (37,4%) et *bla*_{CTX-M-15} (24,6%) étaient les plus prévalents, prédominant chacun respectivement chez l'animal et l'Homme. Les STs ST131, ST10 and ST88 étaient les plus prévalents, et souvent associés aux plasmides de type Inc-Iy. L'association *bla*_{CTX-M-15} et plasmide IncF était également signalée chez des isolats appartenant aux 2 compartiments. Cependant ces plasmides démontraient une grande diversité. Les auteurs concluaient que les compartiments animaux et humains pouvaient partager les mêmes clones de *E. coli*, les mêmes gènes *bla*_{BLSE} et les mêmes plasmides, mais que ces relations devaient être précisées par des analyses plus discriminantes de type WGS.

Falgenhauer *et al.*, Allemagne, 2016 (286) : Cette étude a porté sur la comparaison génomique des souches de *E. coli* BLSE issues d'un réseau de surveillance en Allemagne et collectées entre 2009 et 2014 chez l'Homme, l'animal (de rente et de compagnie) et dans l'environnement des fermes. Sur les 429 isolats de *E. coli* CTX-M-15 détectés, 97 ont été choisis aléatoirement pour être séquencés. Le ST410 était le plus prévalent (27 isolats) et le plus partagé entre les 3 compartiments (Figure 30). Les auteurs ont démontré que dans cette population, il existait 5 principaux clades dont 2 où les souches étaient clonalement reliées (20 isolats) avec le gène *bla*_{CTX-M-15} localisé sur le chromosome. Les auteurs concluaient qu'il existait une dissémination clonale d'isolats de type ST410/CTX-M-15 entre l'Homme et l'animal en Allemagne en précisant que le ST410 appartenait au phylogroupe A, probablement peu pathogène pour l'Homme.

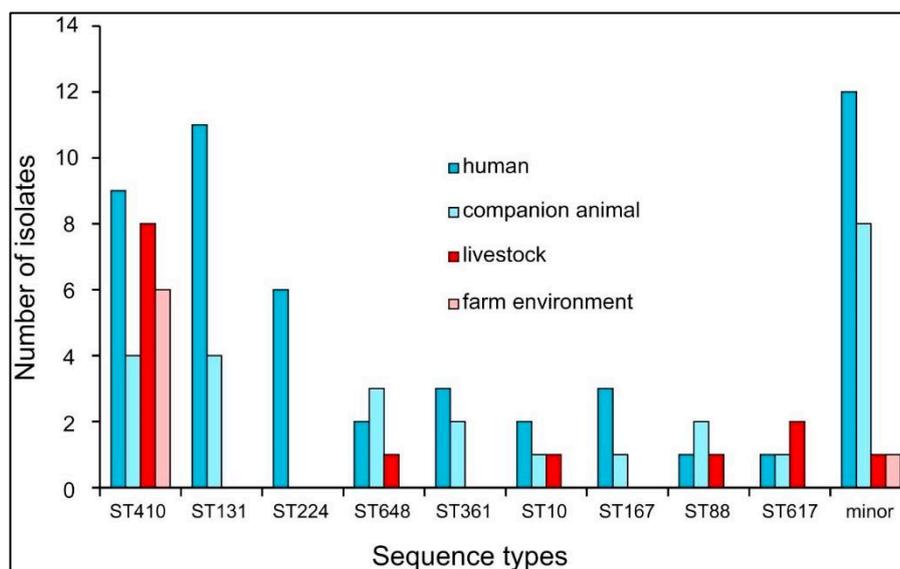


Figure 30. Distribution des séquences types (ST) par analyse MLST des 97 isolats d'*E. coli* séquencés exprimant l'enzyme CTX-M-15. D'après Falgenhauer *et al.* (286)

Ludden et al., Royaume-Uni, 2019 (287) : Cette étude est aussi une comparaison génomique réalisée dans le Sud-Ouest de l'Angleterre sur une collection de 431 *E. coli* (dont 155 producteurs de BLSE) issus d'animaux d'élevage et de viande (2014-2015) comparée à 1517 génomes de *E. coli* humains responsables d'infections invasives (bactériémies) collectés entre 2001 et 2012 dans plusieurs hôpitaux de la région (Figure 31). L'analyse comparative du *core-genome* des 1948 isolats concluait à des origines génétiques distinctes suggérant que les animaux d'élevage ne sont pas directement responsables des infections chez l'Homme. En effet, le phylogroupe B2 était majoritaire dans la population de *E. coli* d'origine humaine et représentait seulement 1% des souches d'origine animale. Les STs majoritaires étaient différents dans chaque compartiment (ST10, ST117 et ST602 chez les animaux vs. ST73, ST131 et ST95 chez l'Homme). L'analyse particulière des *E. coli* des complexes clonaux CC10 et CC117 a démontré que les isolats étaient très largement distincts, malgré un ST commun, chez l'Homme et chez l'animal. Les réseaux de clonalité réalisés entre les différents établissements de recueils des souches montraient que très peu de souches (3 en tout) avaient moins de 15 SNPs de différence avec des souches humaines, alors que ces liens de clonalité étaient nombreux entre les différentes fermes entre elles, ou les établissements de soins entre eux (Figure 32). Les auteurs se sont ensuite intéressés au génome accessoire portant les gènes de résistances aux antibiotiques et aux éléments génétiques mobile associés. Ils ont focalisé leur analyse sur les 2 gènes d'intérêt *bla*_{CTX-M-15} (animal/viande n=32, humain n=87) et *bla*_{CTX-M-1} (animal/viande n=95, humain n=1) partagés entre les 2 compartiments et ont comparé les plasmidomes. Les dendrogrammes de « contigs d'intérêt » réalisés montraient qu'à l'exception d'un isolat humain CTX-M-1 qui partageait un cluster avec 23 autres isolats animaux CTX-M-1, et d'un cluster CTX-M-15 incluant 5 souches humaines et 10 souches animales, l'ensemble des isolats CTX-M-1 et CTX-M-15 étaient d'origines différentes. Enfin, pour finaliser cette analyse du plasmidome, 4 isolats (2 CTX-M-1 et 2 CTX-M-15, chaque binôme avec des isolats originaires des 2 compartiments) ont ainsi été séquencés en *long reads* (Pac Bio). L'ensemble des génomes séquencés en *short reads* (Illumina) ont été ensuite mappés sur ces 4 génomes de référence. Dans l'unique souche CTX-M-1 humaine, le gène *bla*_{CTX-M-1} était porté par un plasmide de type IncI1 qui avait une grande similarité avec 28 autres plasmides de abritant *bla*_{CTX-M-1} et porté par des souches animales (dont 26 souches reliées aux poulets). Par contre, les plasmides portant le gène *bla*_{CTX-M-15} étaient très différents, appartenant aux profils d'incompatibilité IncF chez l'Homme et IncH chez l'animal, et ne matchaient pas avec d'autres génomes à l'exception de quelques souches de bovins de la même ferme pour le plasmide CTX-M-15/IncH d'origine animale. Les auteurs ont même recherché le potentiel transfert d'une région conservée correspondant à un transposon de type Tn3 chez 22 souches animales et l'ont retrouvé chez 3 des 75 souches CTX-M-15 d'origine humaine. Les auteurs concluaient que les isolats humains et animaux dans cette zone géographique étaient d'origine génétique différente avec des éléments mobiles génétiques partagés dans moins de 5% des souches.

Ils insistaient sur l'importance d'évaluer d'autres sources de contamination par *E. coli* BSLE chez l'Homme.

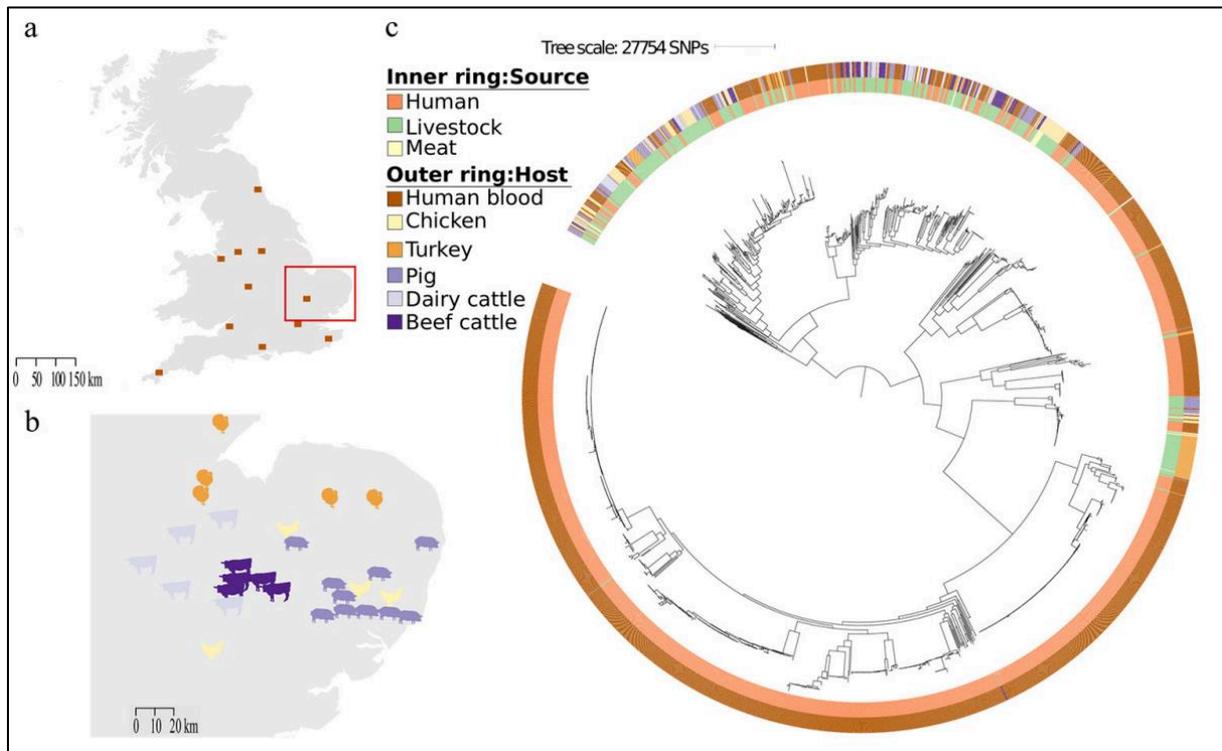


Figure 31. Cartes et dendrogramme circulaire illustrant le recrutement et la relation phylogénétique entre les 1948 isolats de l'étude. D'après Ludden *et al.* (287)

- (a) Carte du Royaume-Uni montrant les emplacements des isolats cliniques humains, avec l'Est de l'Angleterre mise en évidence par un carré rouge.
- (b) Carte de l'Est de l'Angleterre montrant la localisation des exploitations agricoles (les images indiquent les espèces d'animaux d'élevage).
- (c) Arbre phylogénétique basé sur les SNPs dans les gènes du core genome de 1948 isolats de *E. coli* isolés à partir des fermes d'élevage, de la viande au détail et des patients atteints d'infections invasives (bactériémies).

Nguyen *et al.*, Vietnam, 2019 et 2021 (288,289) :

La première étude avait pour but d'établir la prévalence de la colonisation des *E. coli* BLSE chez les éleveurs de poulets et les élevages de poulets au Vietnam et de réaliser une analyse génomique comparative entre (i) d'une part les isolats retrouvés dans ces fermes et (ii) d'autre part des isolats de *E. coli* BLSE retrouvés chez des individus n'ayant pas de lien avec ces élevages. Quatre cent huit prélèvements ont été réalisés dans les fermes (éleveurs n= 204 ; poulets n=204). La prévalence en *E. coli* BLSE était de 20% et 35,2% dans les fermes et chez les éleveurs, respectivement. Au final, 95 souches BLSE issues des fermes d'élevage (éleveurs n=65, poulets n=30) ont été comparées à 140 souches d'origine humaine de patients des zones urbaines ou rurales du même district. *bla*_{CTX-M-55} était le gène codant une BLSE le plus fréquent dans la collection animale (74,4%) alors que *bla*_{CTX-M-27} était le

plus fréquent dans la collection humaine (47%). Les isolats humains et animaux étaient intercalés dans les phylogroupes A, B1, C et F alors que les isolats humains prédominaient dans le phylogroupe B2. Au final, dans 3 fermes (1,5%) des isolats partageaient les mêmes gènes de résistance entre poulets et éleveurs, mais le support génétique de ces gènes n'était similaire que dans une seule ferme (0,5%). Les auteurs concluaient à une contribution très limitée des fermes d'élevage de poulets dans les colonisations humaines en *E. coli* BLSE dans le Sud du Vietnam.

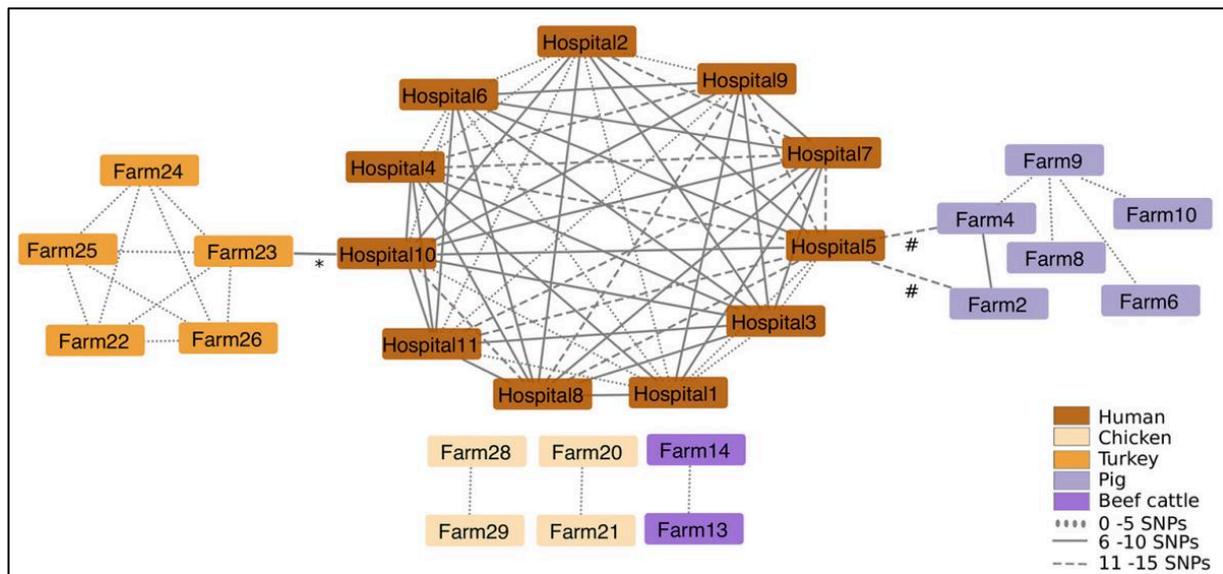


Figure 32. Analyse en réseau de clonalité des isolats de *E. coli* cultivés dans des fermes d'élevage et de patients atteints d'infection invasives. D'après Ludden *et al.* (287).

La seconde étude était une comparaison génomique réalisée sur des isolats de *E. coli* détectés entre 2014 et 2015 dans la région d'Hanoi et issus de prélèvements d'urines associés à des infections urinaires chez l'Homme (n=8564), de prélèvements issus d'animaux ou de leur *excreta* (poulets et porcs ; n=448) et de prélèvements réalisés dans des abattoirs (n=78). Au final, 235 isolats de *E. coli* producteurs de BLSE ont été identifiés (Homme n=152 ; animaux n=74 ; abattoir n=9) dont 84% (n=198) étaient des enzymes de type CTX-M. Hormis les isolats ST10 et ST155 (dont les isolats étaient d'origine génétique distincte), la plupart des ST étaient spécifiques de chaque compartiment (Figure 33). Le gène *bla*_{CTX-M-27} était prédominant chez les isolats d'origine humaine (77%) alors que c'était le gène *bla*_{CTX-M-55} chez les isolats issus d'animaux. Quatorze isolats portant 5 types de gène *bla*_{CTX-M} (-15, -55, -14, -27 et -65) ont été séquencés en long reads (MinION Nanopore). Les plasmides portant ces gènes appartenaient à 5 profils d'incompatibilité différents, et dont la structure génétique était différente entre les compartiments humains et animaux, suggérant une contribution limitée des plasmides portant les gènes *bla*_{CTX-M} dans la transmission entre animaux de rente et l'Homme. A

contrario, des profils similaires de plasmides ont été trouvés entre les isolats issus des animaux et des abattoirs. Un cas particulier était un plasmide *bla*_{CTX-M-55}/IncFII partagé entre les abattoirs et l'Homme dans plusieurs isolats. Enfin, certaines séquences d'insertion de type IS₆ ont été retrouvées dans des isolats humains et animaux portant les gènes *bla*_{CTX-M-27} et *bla*_{CTX-M-55}, suggérant un possible rôle dans le transfert inter-compartmental de ces gènes. Les auteurs concluaient que les gènes *bla*_{CTX-M} associés à des plasmides chez l'Homme et les animaux étaient d'origine différente.

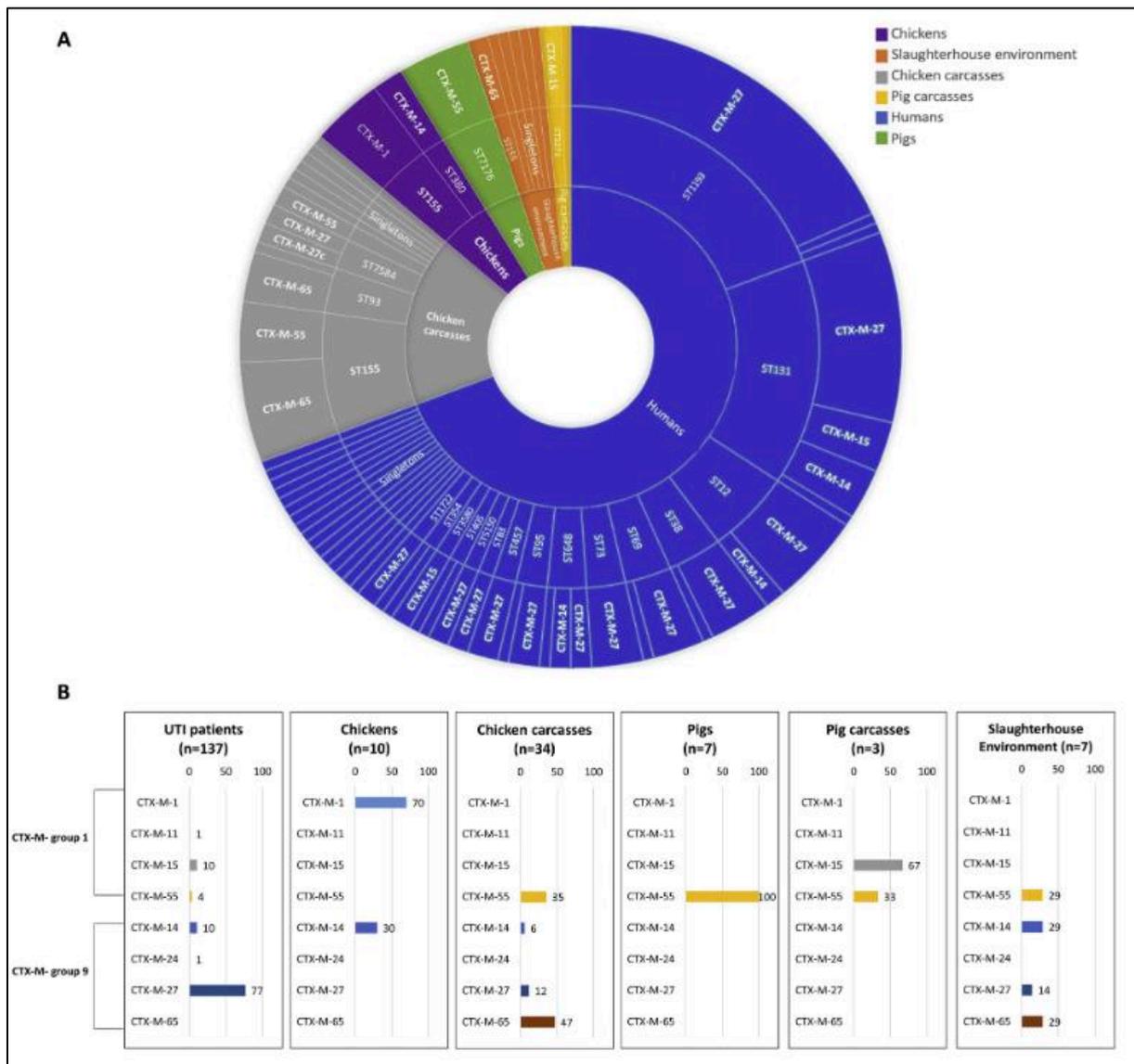


Figure 33. Répartition des différents STs et variants des gènes *bla*_{CTX-M} en fonction des origines des échantillons. D'après Nguyen *et al.* (289)

(A) Association et distribution des clones dominants de *E. coli* porteuses du gène *bla*_{CTX-M} en fonction des différentes origines des échantillons.

(B) Prévalence des variants du gène *bla*_{CTX-M} en fonction des origines des échantillons.

Reid et al., Australie, 2019 (290) : Cet article décrit la comparaison génomique de 2 souches de *E. coli* ST131-H22 (non BLSE et non AmpC) isolées d'une part chez un porc en 2007 et dans les urines d'un patient hospitalisé à Sydney en 2009. Les souches ont été comparées en détail au niveau du *core-genome*, des plasmides et des éléments mobiles (IS, transposons). Les 2 isolats sont très similaires avec notamment les mêmes plasmides de type IncHI-2 et un transposon de type Tn7 (même si quelques réarrangements sont constatés), attestant de la probable transmission entre l'Homme et l'animal. Les auteurs insistent sur le fait que le clone ST131-H22 était le précurseur du clone épidémique humain ST131-H30Rx et qu'il était de plus en plus retrouvé chez l'animal, attestant l'importance d'une approche *One Health* dans la surveillance de ces souches de *E. coli* potentiellement porteuses de gènes codant pour des BLSE.

Valcek et al., Danemark, 2019 (291) : Cette étude a consisté à comparer des plasmides IncI-1 obtenus chez des isolats de *E. coli* producteurs de CTX-M-1 détectés chez l'Homme et chez l'animal. Les auteurs se sont plus particulièrement intéressés à comparer 2 sous-types de plasmides : IncI1-ST3 (n=10) et IncI1-ST7 (n=2). Les analyses ont montré une très grande similarité (mêmes gènes de résistance, même contexte génétique *ISEcp1* du gène *bla*_{CTX-M-1}, mêmes IS et transposon) entre ces isolats détectés au Danemark (Figure 34). Les auteurs ont ensuite étendu la comparaison à 10 autres plasmides IncI1-ST3 et IncI1-ST7 détectés en Australie, en France et aux Pays-Bas. Cette comparaison a abouti au même haut niveau de similarité. Les auteurs concluaient que le fait de retrouver cette correspondance dans plusieurs pays attestait du probable succès de ces plasmides porteurs du gène *bla*_{CTX-M-1} avec un potentiel de transmission inter-compartimentale ; tout en admettant que la « route des transmissions » de ces plasmides, directe ou *via* l'environnement ou la nourriture, restait à préciser.

Alzayn et al., Royaume-Uni, 2020 (292) : Cette étude avait pour but de caractériser la présence et les facteurs de risque d'acquisition de souches de *E. coli* avec AmpC hyperproduite et de réaliser une comparaison génomique de ces souches recueillies dans des fermes laitières et chez des humains dans la même aire géographique (50x50 km) au Sud-Ouest de l'Angleterre. Les auteurs ont déterminé que la prévalence des *E. coli* AmpC étaient de 46,2% dans les exploitations. Au final, 25 isolats issus de fermes laitières ont ainsi été comparés à 20 isolats humains issus d'échantillons urinaires. La comparaison des souches basée sur le *core-genome* (SNPs) a montré que les isolats bovins et humains n'étaient mélangés que dans une faible mesure. Pour les rares isolats partageant les mêmes clusters ST88, ST75 et ST23, les souches n'étaient pas clonales (≥ 1200 SNPs au minimum, Figure 35). Par contre, il existait de probables transmissions inter-exploitations récentes avec des souches clonales de même ST (1-13 SNPs). Les auteurs concluaient qu'ils n'avaient pas de preuve de transfert récent de

souches de *E. coli* productrice d'AmpC entre l'Homme et le bétail dans cette zone géographique restreinte.

Budel *et al.*, Zanzibar (Tanzanie), 2020 (293) : Cette étude avait pour objectif de comparer les populations d'entérobactéries résistantes aux C3G ou résistantes à la colistine obtenues d'une part chez les volailles et les viandes de poulet vendues au détail, et d'autre part chez les souches responsables de colonisation dans la population communautaire à Zanzibar (île située dans le canal du

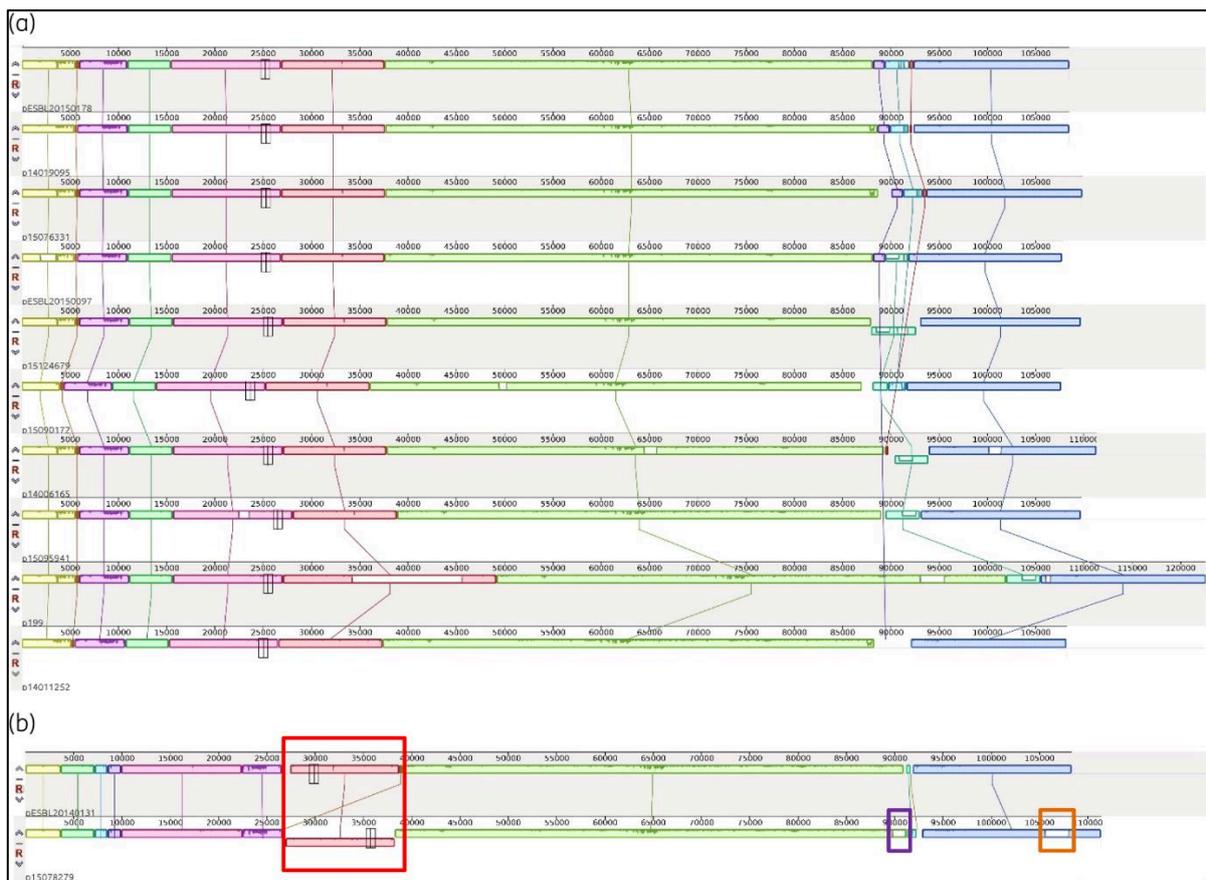


Figure 34. Comparaison des plasmides de type Inc11-ST3 et Inc11-ST7 d'origine humaine et animale. D'après Valcek *et al.* (291)

(a) La comparaison des plasmides ST3 Inc11 montre des structures très similaires et des zones ou des structures inversées seulement légèrement différentes. L'ordre des séquences est basé sur la similarité selon les blocs de la figure et est le suivant (de haut en bas) : pESBL20150178 (humain) ; p14019095 (poulet) ; p15076331 (bovin/porc) ; pESBL20150097 (humain) ; p15124679 (canard) ; p15090172 (porc) ; p14006165 (poulet) ; p15095941 (poulet) ; p199 (porc) ; et p14011252 (poulet).

(b) Comparaison des plasmides Inc11 du groupe ST7 pESBL20140131 d'un échantillon humain (en haut) et p15078279 d'un échantillon de porc (en bas) représentant la zone inversée du transposon de type Tn3 (dans le cadre rouge) et deux éléments IS supplémentaires (IS2-like dans le cadre violet et ISEc22-like dans le cadre orange) à la fin de la séquence plasmidique p15078279.

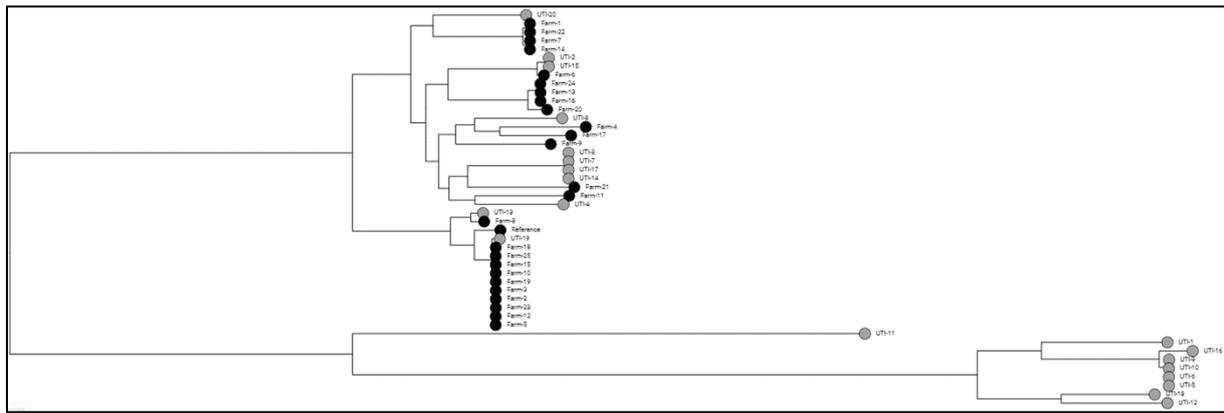


Figure 35. Arbre phylogénétique des isolats de *E. coli* hyperproducteurs de AmpC d'origines animales et humaines. D'après Alzayn *et al.* (292)

Mozambique, Tanzanie). Une collection de 144 isolats de *E. coli* a été obtenue à partir des prélèvements animaux. La prévalence des souches résistantes aux C3G était de 88,7% et 43,2% chez les volailles et dans la viande de poulet, respectivement. Celle des souches résistantes à la colistine était de 48,4% et 18,9% dans ces deux sources, respectivement. Les populations d'entérobactéries résistantes aux C3G les plus prévalentes étaient *E. coli* CTX-M-15 et *K. pneumoniae* CTX-M-9. Le gène *mcr-1* était le mécanisme majoritaire de résistance à la colistine chez *E. coli* (95,8%), tandis qu'il s'agissait de mutations dans le système PhoQ chez *K. pneumoniae*. Au final, 38 souches de *E. coli* résistantes aux C3G et 13 *K. pneumoniae* résistantes aux C3G ont été respectivement comparées à 18 *E. coli* résistantes aux C3G et 15 *K. pneumoniae* résistantes aux C3G issues de la population humaine communautaire. L'analyse WGS a permis de mettre en évidence de multiples clones (0-13 SNPs) inter-compartimentaux notamment *E. coli* ST361/CTX-M-15 et *K. pneumoniae* ST17/CTX-M-14 et ST1741/CTX-M-15. Un clone inter-compartimental de *E. coli* ST46/*mcr-1* a également été détecté. Les auteurs concluaient que la population communautaire de Zanzibar est souvent colonisée par les mêmes souches d'entérobactéries multirésistantes que celles retrouvées chez la volaille ou dans la viande de poulet. Ils indiquaient qu'il s'agissait de la 1^{ère} étude démontrant avec un haut degré de discrimination (WGS) un phénomène *One Health* d'une telle ampleur.

van Hoek *et al.*, Pays-Bas, 2020 (294) : Cette étude a analysé 11 évènements suspectés de transmission d'isolats de *E. coli* BLSE/AmpC ou d'EGM portant sur des gènes de résistances entre poulets et individus vivant ou travaillant dans 8 fermes d'élevage de poulets aux Pays-Bas et en utilisant une méthodologie de type WGS (ces transmissions sont reprises de 2 études précédentes dont **Huijbers *et al.*, Pays-Bas, 2014** décrite ci-dessus). Sur les 8 transferts de souches suspectés, 6 ont été confirmés (même *cgMLST*) et 1 correspondait finalement à un transfert horizontal d'EGM (ferme E, isolats ST10 avec le même plasmide, en bleu foncé, Figure 36). Sur les 3 transferts d'EGM suspectés, 1 a été confirmé. Au final,

l'analyse a confirmé un transfert de souches ou d'EGM (plasmides) dans 8 sur les 11 évènements suspectés). Ces transferts concernaient les gènes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM-52} et *bla*_{CMY-2}. À noter que parmi les évènements infirmés, un possible transfert du gène *bla*_{SHV-12} a pu se faire *via* une séquence d'insertion de type IS26 sur 2 différents plasmides (mais non comptabilisé). Les auteurs concluaient que les transmissions avaient été confirmées avec une bonne corrélation avec les « anciennes techniques classiques de typage » mais que cela pourrait être moins le cas dans des études où les isolats ne sont pas reliés au niveau spatio-temporel comme c'était le cas pour cette étude.

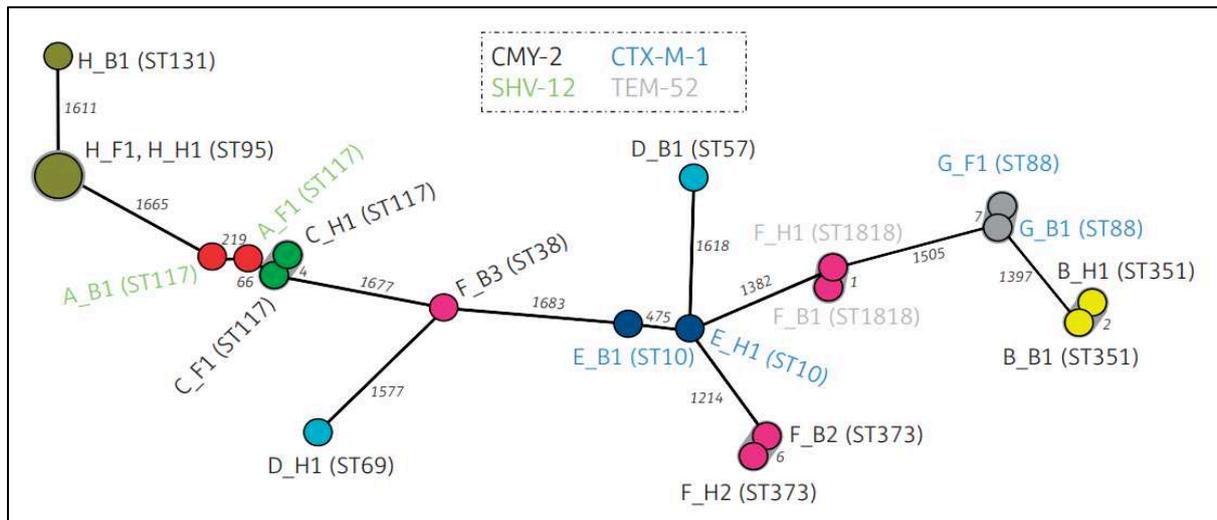


Figure 36. Arbre de couverture minimum de l'analyse par cgMLST. D'après van Hoek *et al.* (294)

Les isolats de *E. coli* BLSE d'une même exploitation sont représentés par des cercles de couleur identique. Le séquence-type de chaque isolat de *E. coli* est précisé entre parenthèses. Les évènements de transmission clonale possibles sont indiqués en gris. Les chiffres à côté des branches indiquent les différences génétiques selon l'analyse cgMLST.

2.2.3.2 Animaux de compagnie

Bortolaia *et al.*, Etats-Unis, 2014 (295) : Cette étude avait pour but de déterminer la structure et la relation génétique entre les plasmides portant le gène *bla*_{CMY-2} dans des souches de *E. coli* d'origine humaine et d'animaux de compagnie dans une aire géographique limitée du Midwest. Au final : 6, 56 et 6 souches porteuses du gène *bla*_{CMY-2} ont été détectées respectivement chez l'Homme, les chiens et les chats et ont été comparées par des techniques traditionnelles (MLST, pMLST). La prévalence de *bla*_{CMY-2} était plus importante chez les animaux (chiens : 86%, chats : 75%) que chez l'Homme (14%). Les plasmides retrouvés étaient d'une grande hétérogénéité dont les 3 principaux étaient de type IncI1 (52%), IncA/C (13%), IncFII (10%). Les auteurs concluaient à des échanges probablement très limités entre les animaux de compagnies et les humains dans la communauté.

Hong et al., 2020, Corée du Sud (274) : L'objectif de cette étude était d'évaluer la distribution des isolats de *E. coli* BLSE/AmpC détectés en portage rectal chez des animaux de compagnie et d'humains vivants dans le même domicile en Corée entre 2018 et 2019. Un total de 221 souches BLSE/AmpC ont été détectées, 95 chez les animaux et 126 chez les humains à partir de 968 prélèvements réalisés dans 130 foyers. La prévalence des BLSE/AmpC était de 24,9% chez l'Homme vs. 21,5% chez les animaux. CTX-M-14 (26,3%), CMY-2 (20%), CTX-M-55 (12,6%) étaient les 3 bêta-lactamases les plus prévalentes chez les animaux, tandis que chez les humains il s'agissait de CTX-M-14 (34,9%), CTX-M-15 (19%), CTX-M-27 (16,7%) et CMY-2 (6%). L'étude a permis d'identifier 4 cas (4,8%) impliquant des souches de *E. coli* produisant CTX-M-14, où les souches humaines et animales du foyer appartenaient à un même pulsotype. À noter la présence d'une sous-population de *E. coli* ST405 produisant l'enzyme CMY-2 qui semblait proliférer chez les animaux de compagnie en Corée du Sud.

2.2.3.3 Animaux sauvages

Si de nombreux articles ont détecté des entérobactéries BLSE chez les oiseaux sauvages (269,296), et que les oiseaux migrateurs sont maintenant reconnus comme de potentiels vecteurs de bactéries multi-résistantes, aucune étude *One Health* (hormis l'étude globale **Mughini et al.** et **Dorado-Garcia et al.** aux Pays-Bas) n'a évalué la relation entre ces isolats et ceux d'origine humaine (239,297).

2.2.3.4 Alimentation

Nadimpalli et al., Cambodge, 2019 (298) : Cette étude avait 2 objectifs : (i) évaluer la prévalence des isolats de *E. coli* producteurs de BLSE ou de carbapénèmase dans la viande de porc, de poulet et les poissons vendus sur les marchés de Phnom Penh, et (ii) comparer les isolats producteurs de BLSE à ceux retrouvés en portage chez des femmes dans la population communautaire et chez des patients hospitalisés infectés. La prévalence des isolats de *E. coli* BLSE dans ces denrées était de 62% tous échantillons confondus (porc : 75%, poulet : 53%, poissons : 53%). Deux souches d'EPC ont été détectées dans 2 échantillons de porcs et de poisson (*E. coli* OXA-48-type, prévalence : 1,3%). Le gène *bla*_{CTX-M-55} prédominait dans la nourriture alors que *bla*_{CTX-M-15} prédominait chez l'Homme. La comparaison génomique des 196 isolats de *E. coli* BLSE (nourriture n=93, femmes bien portantes n=88, patients infectés n=15) a permis de mettre en évidence 3 clades principaux : **un clade I/B2-D/ST131-ST38 essentiellement humain (où prédominaient les gènes *bla*_{CTX-M-15} et *bla*_{CTX-M-27})** ; un clade II/A/ST10 et un clade III/B1/ST58-ST156 composés d'isolats issus des colonisations humaines et de la nourriture (Figure 37). Environ 40% des isolats des femmes colonisées étaient regroupés dans le même

clade (II ou III) et appartenait au même ST que des isolats issus de la nourriture. La résistance de ces isolats aux phénicolés (utilisés en médecine vétérinaire mais plus en médecine humaine) faisait déduire aux auteurs une origine probable animale de ces isolats. Les auteurs concluaient que, dans les pays de « revenus intermédiaires à faibles », les animaux pouvaient être des réservoirs de transmission de *E. coli* BLSE *via* la nourriture pour la population communautaire et notamment les isolats de type *E. coli* producteurs de CTX-M-55 résistant à l'amphénicol au Cambodge.

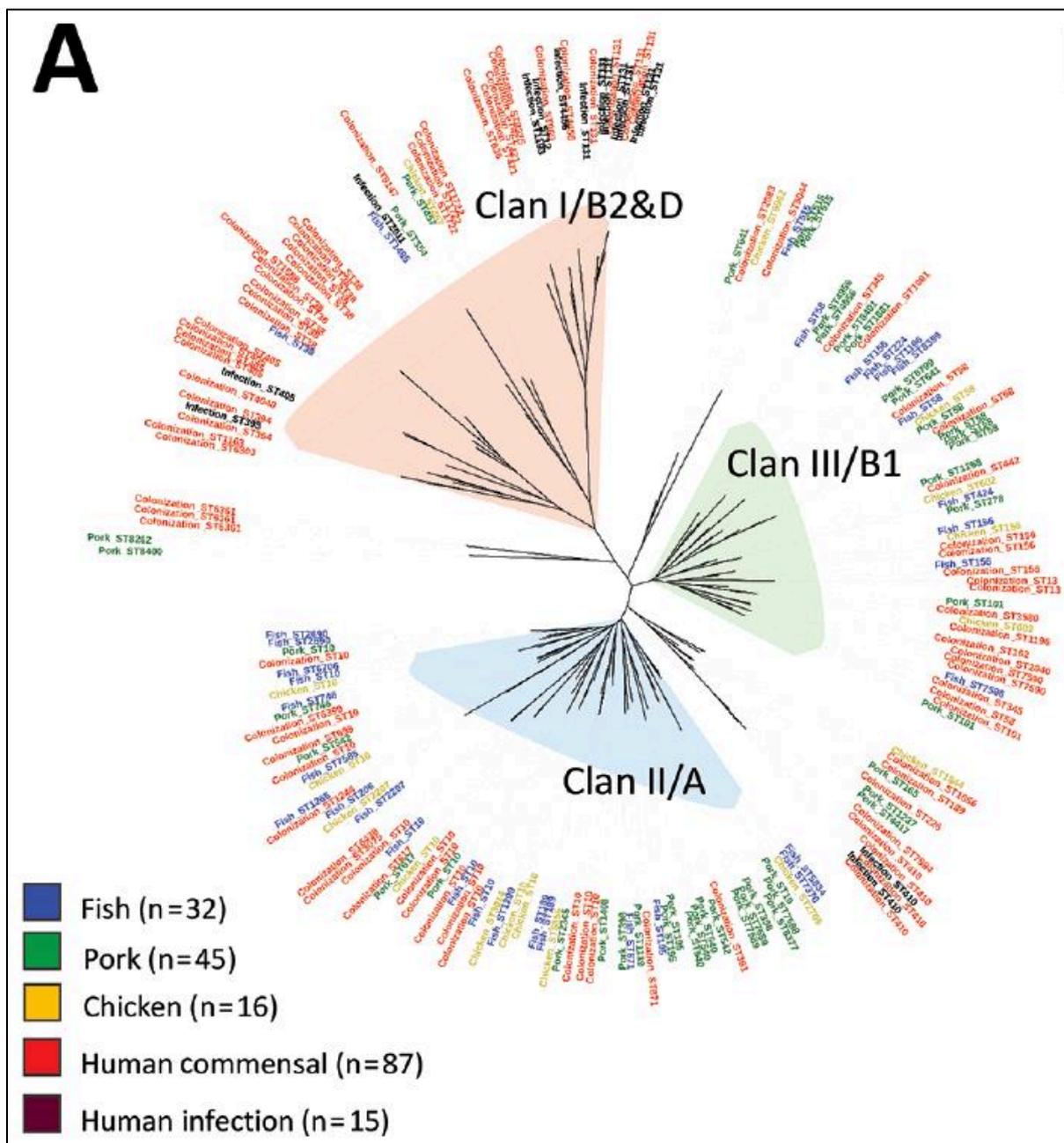


Figure 37. Arbre phylogénétique basé sur la séquence du génome entier de 195 isolats de *E. coli* producteurs de BLSE d'origine humaine et alimentaire. D'après Nadimpalli *et al.* (298)

Synthèse de cette minirevue : Certaines études, notamment aux Pays-Bas, ont décrit dans les années 2010 la transmission d'isolats de *E. coli* BLSE ou AmpC entre l'Homme et l'animal. Ces transmissions ont été en partie confirmées par une analyse à haut pouvoir discriminant basée sur le WGS et s'intéressant à la fois au *core-genome* et aux EGM porteurs des gènes de résistance. De plus, certains plasmides très similaires (comme par exemple IncI1 porteur du gène *bla*_{CTX-M-1}) ont été retrouvés chez l'Homme et chez l'animal, suggérant un transfert horizontal inter-compartimental de ces gènes de résistance dont le chemin reste à préciser. Le secteur qui semble principalement pourvoyeur de ces transmissions (à la fois d'isolats ou d'EGM) est l'élevage de volailles, où la prévalence des *E. coli* BLSE est la plus élevée. De plus, des échanges inter-exploitations ont fréquemment été relevés. Cependant, les études décrivant ces transmissions ne s'intéressaient qu'à des populations humaines très ciblées ayant des contacts importants avec les animaux (éleveurs, famille d'éleveurs vivant dans la ferme, employés) et n'ont abouti qu'à un nombre limité de transmissions réellement documentées par WGS. Certaines études chez les animaux de compagnie (**Hong et al.**) ont également mis en évidence des transmissions très ciblées comme pour des isolats de *E. coli* produisant l'enzyme CTX-M-14. On peut ainsi qualifier ces transmissions volaille-Homme ou animaux de compagnie-Homme de limitées, voire sporadiques. Dans leur revue de 2015, **Lazarus et al.** insistaient dans leur conclusion sur le fait que, si la preuve d'une transmission Homme-animal avait été apportée dans certains cas, il était important de quantifier l'intensité et l'étendue de ce phénomène par des études de plus grands effectifs basées sur le WGS (299). En effet, les études de plus grande puissance comme celles de **Ludden et al.** ou **Nguyen et al.** incluant la population humaine hospitalière ou communautaire (et non uniquement aux populations à risque au contact des animaux), ont abouti à la conclusion d'un apport très limité des isolats de *E. coli* BLSE/AmpC ou des plasmides d'origine animale dans la population des isolats cliniques humains. Le fait que (i) les ST majoritaires soient différents dans chacun des 2 compartiments et que (ii) l'analyse fine des STs inter-compartimentaux comme par exemple ST10, ST38, ST88 ait démontré qu'il existait des sous-populations séparées et adaptées à chaque réservoir ; semble accréditer cette hypothèse. Ce paradigme était vérifié jusqu'aux études menées par **Nadimpalli et al.** au Cambodge en 2019 et **Büdel et al.** à Zanzibar en 2020. En effet, ces études montraient pour la 1^{ère} fois, par une analyse de haute résolution basée sur le WGS, des transmissions multiples de *E. coli* (et *K. pneumoniae*) BLSE entre la volaille/viandes et poissons et la population communautaire humaine. L'étude de **Büdel et al.** est très informative quand on analyse 4 caractéristiques principales de l'île Zanzibar à savoir (i) un milieu insulaire (très) densément peuplé (710 habitants par km²), (ii) des standards sanitaires limités proches des pays en voie de développement avec animaux souvent présents dans le foyer, (iii) un usage non contrôlé des antibiotiques vendus au détail dans des épiceries et pharmacies sans prescription médicale et (iv) une très forte prévalence des entérobactéries R-C3G dans les élevages de volailles

(88,7%). Cet écosystème peut contribuer à des interconnexions Homme-volaille aboutissant à ce modèle *One Health*.

2.2.4 Homme – animal/filière alimentation – environnement

Purohit *et al.*, Inde, 2017 (300) : Il s'agissait d'une étude observationnelle réalisée dans une population rurale communautaire au centre de l'Inde incluant 292 isolats de *E. coli* issus de jeunes enfants de 1 à 3 ans et de leur environnement (animaux, déchets, eau consommée). La prévalence de *E. coli* BLSE chez les enfants, les animaux, les eaux de déchets et les eaux consommées était respectivement de 57%, 23%, 33% et 23%. Les auteurs notaient que le gène *bla*_{CTX-M-1} prédominait chez les enfants et les animaux tandis que c'était le gène *bla*_{CTX-M-9} dans les eaux consommées ou les déchets. Les profils de résistances aux antibiotiques étaient similaires entre les enfants et leur environnement. Les isolats n'ont pas été comparés au niveau génomique ou par des méthodes classiques de type MLST.

Runcharoen *et al.*, Thaïlande, 2017 (301,302) : 2 études en 2017 sur *E. coli* et *K. pneumoniae*

La première étude était une comparaison génomique d'une collection de *E. coli* BLSE isolés entre 2014 et 2015 chez des patients, des effluents de ferme et dans l'environnement (canaux) en Thaïlande. Ainsi, 84 isolats consécutifs non redondants de *E. coli* issus de prélèvements à visée diagnostique dans un hôpital de l'Est de la Thaïlande ont été comparés à 65 isolats d'origine environnementale issus de canaux (n=55), d'effluents d'hôpital (n=3) et d'effluents issus de fermes (n=6). ST131 prédominait dans la collection humaine (28,6%) alors qu'il n'y avait pas de ST prédominant dans la collection environnementale. Concernant les BLSE, les gènes *bla*_{CTX-M} étaient très majoritaires, avec *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15} et *bla*_{CTX-M-27} les plus prévalents. Le gène *bla*_{SHV12} a également été retrouvé mais de manière minoritaire (Figure 38). Les isolats montraient une très grande diversité génétique à l'exception de 3 paires d'isolats Homme-environnement clonalement reliés. Une analyse spécifique des *E. coli* ST131 a été réalisée : les sous-clones majoritaires retrouvés étaient H30-R majoritairement associés au gène *bla*_{CTX-M-14} et **H41 associés à *bla*_{CTX-M-27}**. Trois isolats producteurs de carbapénèmase avaient également été retrouvés (NDM-1, NDM-5 et GES-5) ainsi que 3 autres résistants à la colistine. Les auteurs concluaient que les isolats humains et environnementaux étaient très majoritairement différents et que les efforts devaient maintenant s'orienter vers la limitation de la progression des EPC et entérobactéries résistantes à la colistine.

La seconde étude était une comparaison génomique similaire s'intéressant aux isolats de *K. pneumoniae* obtenus dans les mêmes conditions que l'étude précédente. Un total de 77 isolats a été analysé : 48 issus de prélèvements cliniques à visée diagnostique, 24 isolats issus des canaux, 2 d'effluents d'hôpitaux et 3 d'effluents issus de fermes. La population des isolats était répartie entre 3

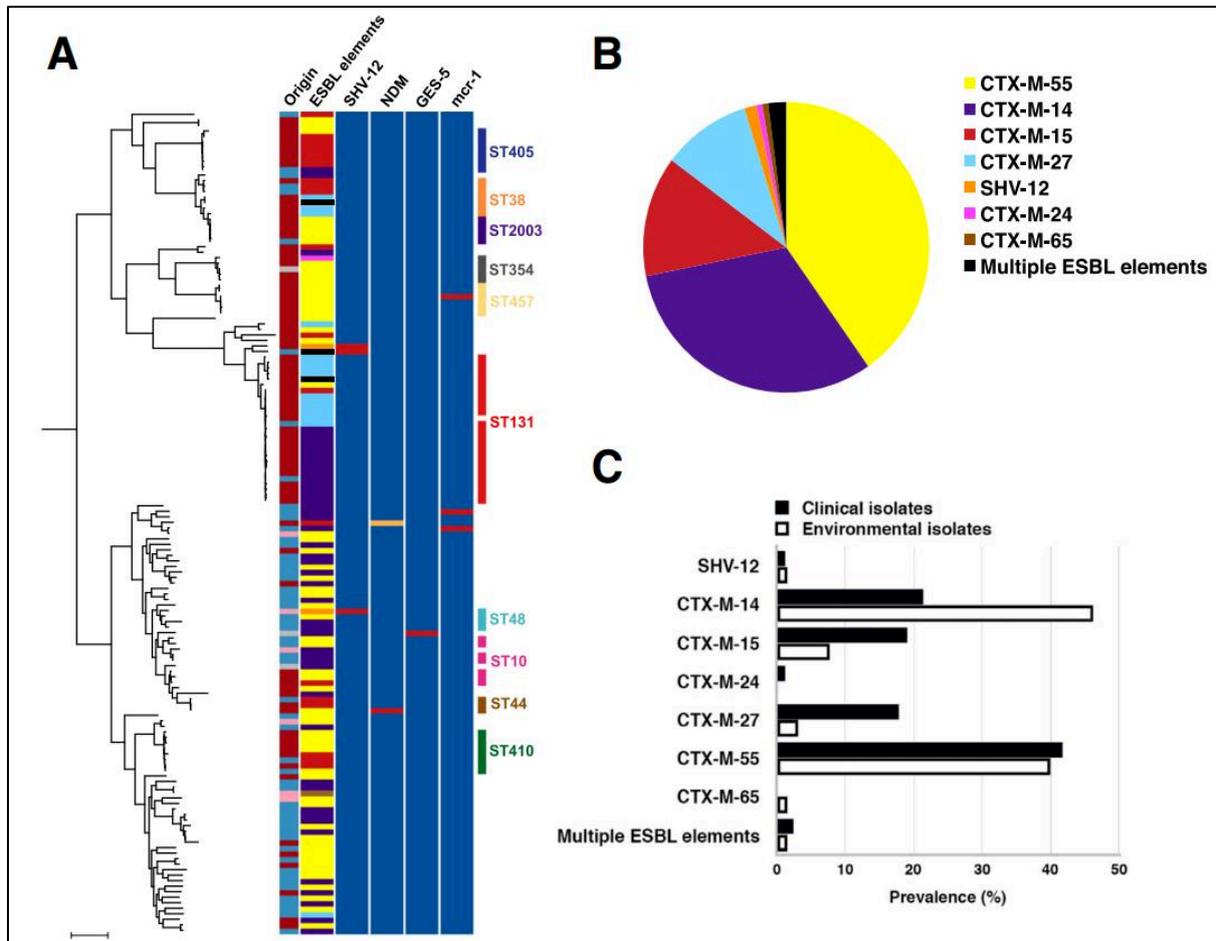


Figure 38. Figure illustrant la relation entre les 149 isolats de *E. coli* BLSE de l'étude et leurs gènes de résistances. D'après Runcharoen *et al.* (300)

(A) À gauche : arbre construit en maximum de vraisemblance à partir de 149 génomes d'isolats d'étude basés sur les SNPs dans le core-genome. Les colonnes décrivent l'origine (rouge, clinique ; bleu, canal ; rose, eaux usées ou effluents agricoles ; gris, eaux usées hospitalières non traitées), éléments BLSE (blanc, absent ; jaune, CTX-M-55 ; violet, CTX-M-14 ; rouge, CTX-M-15 ; bleu clair, CTX-M-27 ; rose, CTX-M-24 ; brun, CTX-M-65 ; orange, SHV-12 ; noir, plusieurs éléments BLSE) et les données pour SHV-12 (bleu, absent ; rouge, présent), NDM (bleu, absent ; rouge, NDM-1 ; orange, NDM-5), GES-5 (bleu, absent ; rouge, présent), et *mcr-1* (bleu, absent ; rouge, présent). À droite : les dix STs les plus prévalents.

(B) Prévalence des enzymes BLSE (variants CTX-M et SHV-12) dans les 149 isolats de l'étude. Trois isolats contenaient des éléments multiples (CTX-M-15 et CTX-M-27, CTX-M-27 et CTX-M-55, et CTX-M-14 et SHV-12, respectivement).

(C) Pourcentage de chaque variant d'enzyme CTX-M et de l'enzyme SHV-12 dans les 84 isolats cliniques et les 65 isolats environnementaux.

grandes origines génétiques, dont 1 lignée qui contenait la majorité des isolats (phylogroupe Kpl, Figure 39). Au sein de cette lignée majoritaire, il existait différents clades reliant des isolats cliniques et environnementaux entre eux. Les isolats associés aux animaux étaient soit reliés aux isolats environnementaux, soit aux isolats cliniques et environnementaux au sein de ces clades (Figure 39).

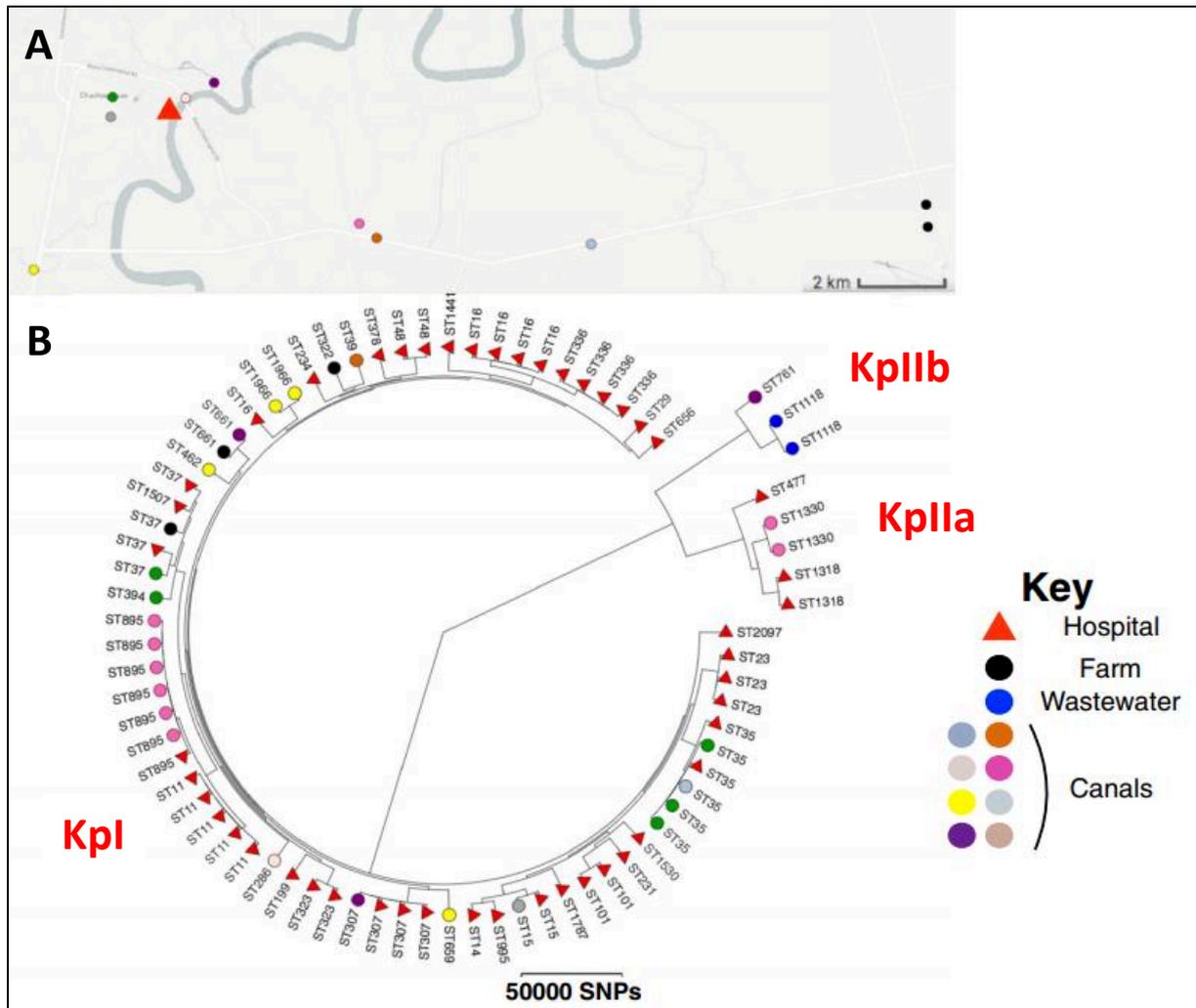


Figure 39. Carte illustrant la zone de prélèvements des isolats de *K. pneumoniae* BLSE et arbre construit en maximum de vraisemblance reliant les 77 isolats comparés. Adapté de Runcharoen *et al.* (302)

(A) Carte montrant l'origine géographique des isolats de l'étude. Le triangle indique l'hôpital Buddhasothon.

(B) Arbre construit en maximum de vraisemblance pour les 77 isolats de *K. pneumoniae* provenant d'échantillons cliniques et environnementaux (canaux, bétail et eaux usées des hôpitaux) montrant la distribution des STs dans l'ensemble de la population. Les triangles et les cercles correspondent respectivement à des isolats cliniques et environnementaux. Les isolats d'eaux usées ont été récupérés de l'hôpital et ont donc la même localisation que l'hôpital sur la carte.

Les 77 génomes issus des isolats de l'étude ont ensuite été comparés par une analyse phylogénétique à une collection internationale de 286 génomes de *K. pneumoniae*. Les isolats étaient dispersés dans cette population, la majorité appartenant au phylogroupe Kpl, indiquant que les isolats thaïlandais appartenaient aux différentes populations circulant au niveau international. Les gènes *bla*_{CTX-M-15} et *bla*_{SHV} codant pour des BLSE étaient présents dans les 2 collections et 4 isolats exprimaient une carbapénèmase (2 NDM, 2 GES). Les auteurs aboutissaient à plusieurs conclusions : (i) les isolats cliniques et environnementaux étaient phylogénétiquement issus d'un ancêtre commun dans plusieurs cas et cette divergence était récente, il existait ainsi un lien épidémiologique étroit entre les isolats de ces 2 compartiments ; (ii) les isolats cliniques semblaient s'être adaptés au compartiment humain en ayant acquis plus de gènes de résistance et de virulence que les isolats environnementaux ; et (iii) la présence d'EPC chez les patients ou dans les effluents de l'hôpital démontrait l'importance de traiter ces effluents pour les éliminer et éviter que le compartiment environnemental devienne un réservoir de bactéries multi-résistantes.

Seni et al., Tanzanie, 2018 (303) : Il s'agit d'une revue de l'ensemble des études s'intéressant aux entérobactéries BLSE (et leurs clones majoritaires) chez l'Homme, l'animal et l'environnement entre 2005 et 2016 en Tanzanie. Sur les 131 articles issus de leurs recherches, les auteurs ont analysé 9 articles considérés comme éligibles. La prévalence des BLSE tous compartiments confondus était de 22,6% (IC95% : 21,1–24,2) avec une prédominance des isolats de *E. coli* (51,6%) et de *K. pneumoniae* (41,6%). Chez *E. coli*, ST131 et ST617 prédominaient respectivement chez l'Homme et l'animal. ST38, ST131 et ST2852 étaient retrouvés de manière variable dans les trois interfaces. Le gène *bla*_{CTXM-15} était largement majoritaire dans les 3 compartiments (en moyenne 78,8%) et a été retrouvé principalement dans des plasmides de type IncF, ce qui indique un potentiel de transmission horizontale. Les auteurs concluaient que la forte prévalence des E-BLSE et des clones partagés dans les trois interfaces, notamment le clone mondial de *E. coli* ST131, indiquait une propagation large et inter-compartimentale appelant à réaliser des études génomiques pour suivre ces flux de gènes de résistance dans une approche *One Health*.

Dorado-Garcia et al., Pays-Bas, 2018 (297) : Cette étude est une méta-analyse de 35 études réalisées (>27 000 échantillons et 5800 isolats analysés) pour la plupart entre 2005 et 2015 aux Pays-Bas et visait à quantifier les similarités moléculaires entre les différents réservoirs de *E. coli* BLSE/AmpC et ceci dans la perspective d'une première étape avant d'établir un risque d'attribution en fonction des différents réservoirs. Les données correspondant aux gènes codant pour les enzymes CTX-M, TEM ou SHV et pour les céphalosporinases CMY, ACC, ACT, DHA et MIR, les caractérisations des plasmides ainsi que les STs des isolats ont été récupérés et analysés. L'analyse quantitative s'est réalisée à 2 niveaux :

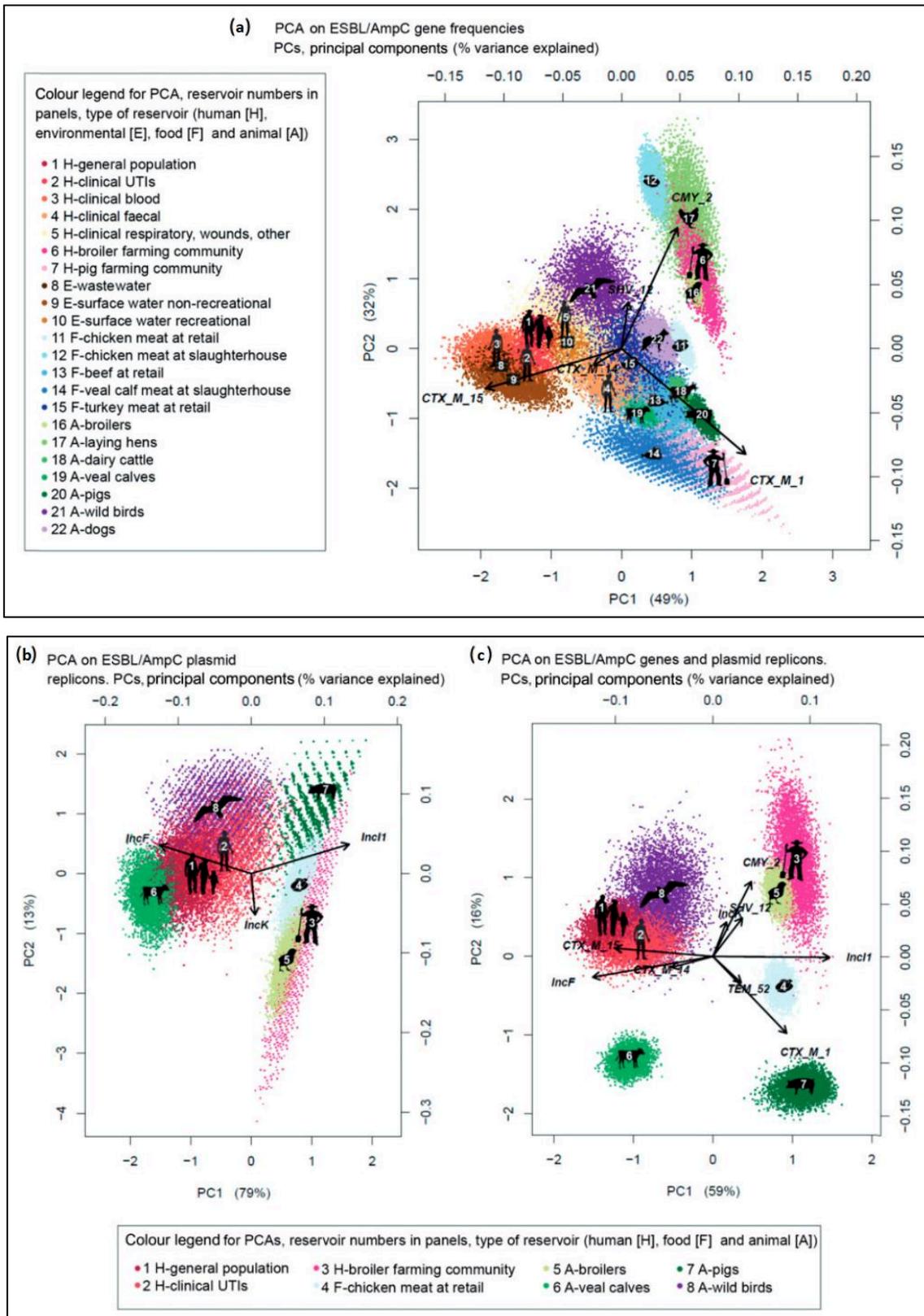


Figure 40. Répartitions des différents isolats de *E. coli* en fonction de la fréquence des gènes de résistance et des profils de réplicons (des plasmides) sous forme de nuages de points dont chaque couleur correspond à un réservoir. D'après Dorado-Garcia *et al.* (297)

(i) l'index proportionnel de similarité (IPS) qui évaluait 2 à 2 les similarités dans la fréquence de distribution des différents gènes et de leurs plasmides dans chaque réservoir, et (ii) une analyse en composante principale (ACP) effectuée sur la collection de gènes mis en commun, pour les réplicons plasmidiques et pour la combinaison des réplicons et des gènes. Les gènes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-12} et *bla*_{TEM-52} étaient les plus fréquemment retrouvés alors que *bla*_{CMY-2} était plus particulièrement détecté chez les poulets et les humains ayant des contacts rapprochés dans les élevages de volailles. Les plasmides IncI1 and IncF, et dans une moindre proportion IncK, étaient les plus prévalents. L'analyse en composante principale intégrant les gènes de résistance (Figure 40a) et les gènes de résistances associés aux profils des réplicons (Figure 40c) a révélé des associations ou clusters entre humains de la population générale/oiseaux et eaux usées (CTX-M-14, CTX-M-15) alors que les humains liés aux exploitations agricoles étaient davantage associés aux animaux et à la viande, *via* des clusters distincts (CMY-2, CTX-M-1, SHV-12). L'analyse cumulée avec les profils des réplicons aboutissait à une clusterisation comparable entre les différents réservoirs. Une observation importante était que la plupart des réservoirs associés aux animaux de rente ou à l'alimentation n'ont pas montré un niveau élevé de similarité dans leurs profils génétiques par rapport aux humains, qu'ils proviennent de la population générale ou hospitalière. Cela suggère que les réservoirs liés aux élevages, y compris la volaille et la viande de volaille, ne sont pas des contributeurs importants d'entérobactéries BLSE/AmpC pour ces populations. Les auteurs concluaient (i) qu'ils n'avaient pas réussi à démontrer un lien épidémiologique étroit des gènes codant pour des BLSE/AmpC et des types de réplicons entre les exploitations d'élevage et les personnes dans la population générale, et que (ii) d'autres modèles quantitatifs devaient être élaborés sur des données issues du WGS pour affiner la vision sur les interactions entre ces différents réservoirs.

Day et al., Royaume-Uni, 2019 (304) : Il s'agit d'une vaste étude de surveillance épidémiologique et de comparaison par typage d'une collection de *E. coli* BLSE issue de Londres, de l'Est et du Nord de l'Angleterre, d'Écosse et du Pays de Galles entre 2013 et 2014. Les isolats humains étaient issus de prélèvements de selles ou de bactériémies et ont été comparés à des isolats provenant de la filière alimentaire, d'animaux (réseau de surveillance vétérinaire d'animaux de rente), de boues issues d'exploitations agricoles bovines, et enfin d'eaux usées. Un total de 653 souches d'origine humaine (bactériémies n=293 et selles n=360) a été comparé respectivement à 111, 83, 24 et 65 souches issues d'aliments, d'animaux, de boues et d'eaux usées. Les isolats ST131 prédominaient dans les 2 collections humaines ainsi que dans les eaux usées, suivis des ST38 et ST648. Dans les aliments et chez les animaux, ST602, ST23 et ST117 prédominaient (Figure 41). Ces STs prédominants étaient retrouvés rarement dans les autres compartiments à l'exception du ST10. L'enzyme CTX-M-15 (77%) dominait dans le compartiment humain et dans les eaux usées, notamment associée au ST131, CTX-M-14 était

associée de manière prédominante au ST38. L'enzyme CTX-M-1 prédominait chez les animaux et les viandes, notamment associée aux STs majoritaires, ST602 et ST23. L'association ST10/CTX-M-14 était majoritaire dans le bétail. Les auteurs trouvaient ainsi des points communs entre les isolats humains (bactériémies et selles) et les eaux usées d'une part, et les prélèvements d'animaux et de viande d'autre part. Les auteurs concluaient que les animaux et la filière alimentaire ne représentaient pas une source significative de *E. coli* BLSE responsable d'infections invasives humaines même s'il pouvait y avoir des transmissions occasionnelles. Ils terminaient en précisant que les interventions de santé

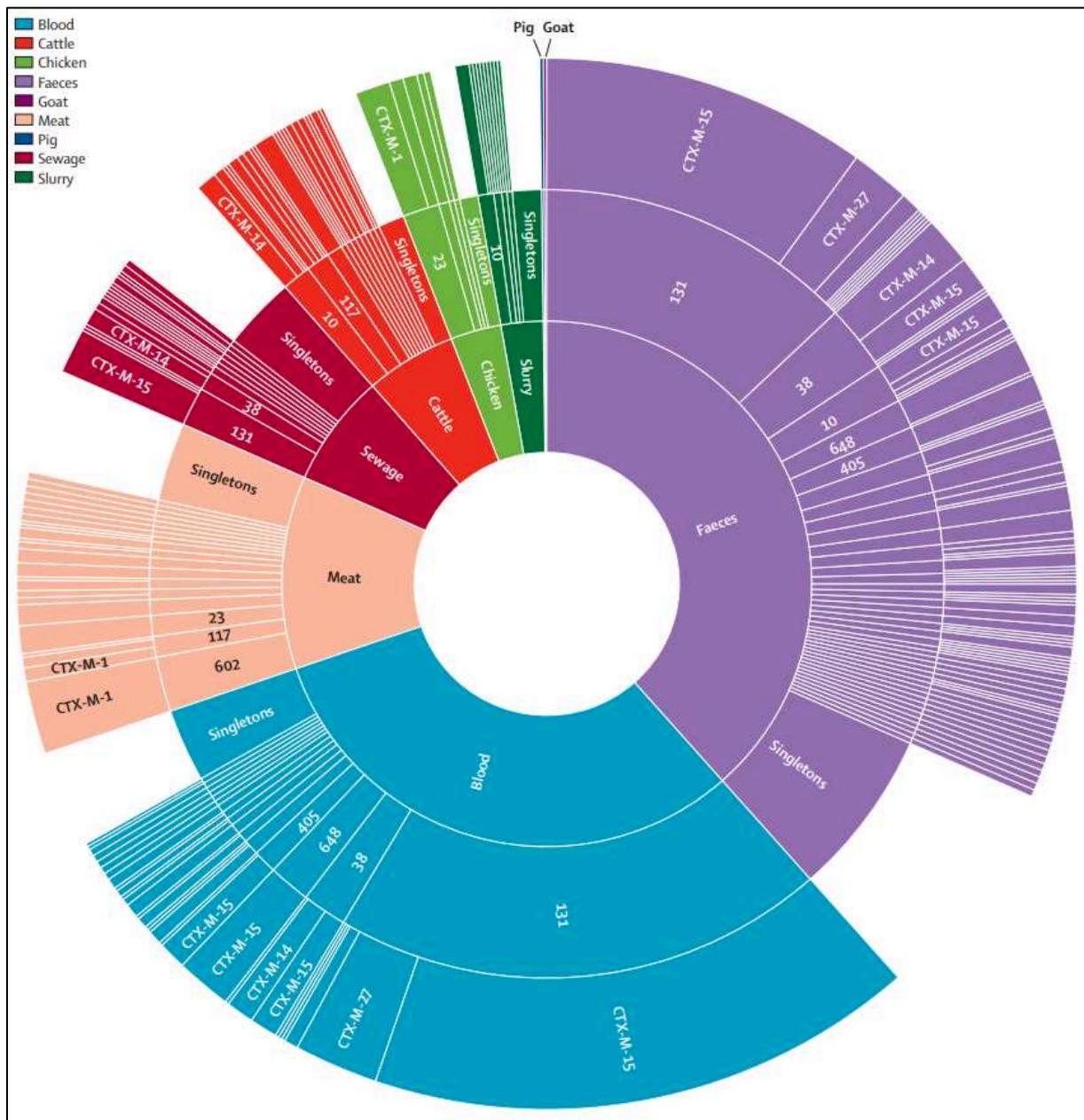


Figure 41. Répartition des isolats de *E. coli* BLSE en fonction de leur origine de prélèvement, leur *sequence type* et des gènes de résistances codant pour les BLSE. D'après Day *et al.* (304)

publique devaient prioritairement s'orienter vers la limitation du péril oro-fécal et de la transmission inter-humaine.

Tansawai et al., 2019, Thaïlande (305) : Cette étude avait pour objectif de comparer les isolats de *E. coli* BLSE isolés à partir de 587 prélèvements réalisés dans 27 fermes du Nord de la Thaïlande chez des animaux, des éleveurs et dans l'environnement des fermes. La prévalence moyenne des *E. coli* était de 27,1% tous prélèvements confondus (50% ; 25,9% et 25% chez les éleveurs, les volailles et dans l'environnement, respectivement). Les 3 gènes codant pour des BLSE les plus retrouvés étaient *bla*_{CTX-M-55} (54,1%), *bla*_{CTX-M-14} (28,3%) et *bla*_{CTX-M-15} (8,8%). La clonalité des 142 souches (parmi les 159 détectées) exprimant une BLSE de type CTX-M a été évaluée par électrophorèse en champ pulsé. S'il existait de nombreux profils communs entre les animaux et l'environnement au sein des mêmes fermes, seuls 3 pulsotypes appartenant à des fermes différentes ont été détectés (CTX-M-55). De plus, 2 isolats ST131/CTX-M-14, dont 1 isolé de volailles et 1 provenant d'un éleveur de la même ferme partageaient le même pulsotype, suggérant ainsi une transmission entre animal et éleveur. Les auteurs concluaient qu'il y avait une dissémination importante des enzymes de type CTX-M chez *E. coli* dans les fermes de volailles en Thaïlande avec une prévalence importante chez les éleveurs, mais que la transmission inter-fermes ou animal-Homme restait peu commune.

Ludden et al., 2020, Royaume-Uni (306) : Cette étude s'est intéressée aux isolats de *K. pneumoniae* issus de plusieurs compartiments dans le Sud-Est de l'Angleterre. Les données correspondaient à des prélèvements cliniques (bactériémies) et à des prélèvements de dépistages (selles) de patients de 2 services d'hématologie d'un hôpital de Cambridge en 2015, ainsi que de leur environnement hospitalier. Ces données ont été corrélées aux prélèvements issus d'une étude transversale intégrant 29 fermes, 97 produits alimentaires, ainsi que des effluents de 20 stations d'épuration de la région et de l'hôpital étudié entre 2014 et 2015. La prévalence des *K. pneumoniae* parmi les patients dépistés positivement était de 2%. La comparaison génomique des isolats issus des selles et de l'environnement des patients a mis en évidence 2 contaminations de l'environnement à partir de 2 patients où les isolats étaient très similaires (ST268 et ST307). Les 16 isolats issus des bactériémies de 5 patients appartenaient à 5 ST différents : 4 n'avaient été retrouvés dans aucun autre prélèvement mais 2 isolats ST307 étaient clonalement reliés aux autres souches ST307 isolées des selles plus tardivement, prouvant ainsi une persistance dans l'environnement ou transmission croisée à partir de patients non échantillonnés. Des isolats de *K. pneumoniae* ont également été détectés chez les animaux (bétail et volaille n=32), dans les effluents de stations d'épuration (n=28) et dans les effluents hospitaliers (n=27), mais pas dans l'alimentation. Il n'y avait pas de recoupement entre les isolats humains et les autres compartiments hormis 2 STs mais dont les souches n'étaient pas clonalement reliées. Le gène *bla*_{CTX-M-15} était très majoritaire parmi les souches BLSE (95,8%). Les auteurs concluaient que des

transmissions avaient eu lieu entre les patients et leur environnement hospitalier, et dans l'environnement hospitalier à plus grande échelle, soulignant l'importance de limiter les réservoirs environnementaux hospitaliers de *K. pneumoniae*. Enfin, ils n'avaient pas pu mettre en évidence la preuve selon laquelle les *K. pneumoniae* ou leurs EGM pourraient couramment être acquis par l'Homme à partir des animaux de rente.

Synthèse de la minirevue : Les études incluant des isolats provenant des 3 compartiments, humain, animal et environnemental sont plus rares. Nous n'avons recensé que 8 études pertinentes, dont uniquement 5 incluaient une analyse comparative basée sur le WGS. Cependant, ces études sont très informatives car de forte puissance avec inclusion d'un très grand nombre de prélèvements ou d'isolats de *E. coli* BLSE ou AmpC à l'image de l'étude de **Day et al.** Ces études proviennent essentiellement de 3 pays ayant les plus étudiés cette transmission inter-compartimentale à savoir les Pays-Bas, le Royaume Uni et la Thaïlande. Le point fort de ces études génomiques est qu'elles incluaient des souches humaines issues de réseau de surveillance ou de population hospitalière à grande échelle. Leur point faible était que les collections de souches animales étaient souvent sous représentées, pouvant induire un biais sur la détection de transmission à partir de ce compartiment. Hormis l'étude de **Purohit et al.** qui notait des analogies parmi les souches de *E. coli* CTX-M-1 entre les enfants et les animaux en Inde (mais sans comparaison génomique), les « *take home messages* » des autres études de grande ampleur sur les *E. coli* BLSE étaient très similaires : (i) les populations bactériennes étudiées sont souvent très diverses avec des distributions différentes des STs, des gènes de résistance et des plasmides entre les différents compartiments même si des similarités Homme-environnement sont souvent constatés en fonction de la méthodologie de recrutement des souches utilisées ; et (ii) les animaux ne jouent très probablement pas un rôle majeur de réservoir de *E. coli* BLSE dans la population humaine générale dans ces pays (**Ludden et al.** <5%, ou **Day et al.**). Concernant *K. pneumoniae*, 2 études ont permis d'établir que les isolats BLSE sont moins diversifiés pour cette espèce et parfois étroitement liés aux isolats environnementaux, issus soit d'effluents (**Runcharoen et al.**), soit de l'environnement hospitalier direct autour des patients (**Ludden et al.**). De plus, le gène *bla*_{CTX-M-15} semble largement dominer chez cette espèce. Enfin, ces études ont mis en exergue des particularités épidémiologiques puisque *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-14} et *bla*_{CTX-M-27} dominaient en Asie du Sud-Est (Thaïlande, Vietnam) devant *bla*_{CTX-M-15} dans le compartiment humain, alors que c'est cette dernière enzyme qui dominait en Europe. Enfin, le gène *bla*_{CTX-M-1} semblait être le principal gène inter-compartimental chez l'espèce *E. coli* (soit par transfert d'isolats, soit par transfert horizontal de plasmides).

La récente étude menée aux Pays-Bas par **Mughini *et al.*** vient confirmer la tendance « *Two Health* » vis-à-vis du compartiment animal dans les pays développés. Dans cette étude incluant 7495 isolats, les

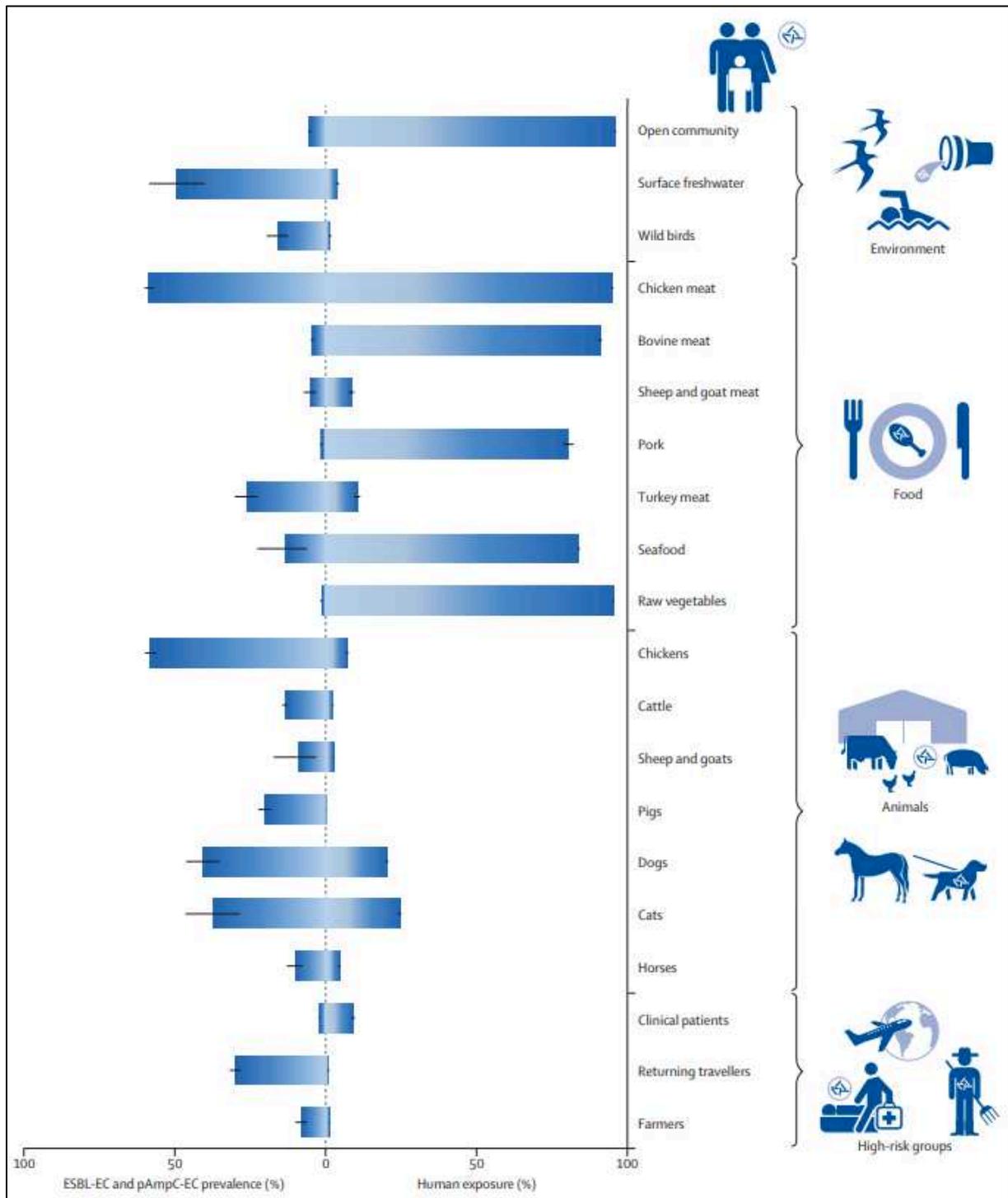


Figure 42. Prévalence des isolats de *E. coli* BLSE ou AmpC dans chaque source et probabilité d'exposition de la population communautaire à chaque source. D'après Mughini-Gras *et al.* (239)
 Les barres d'erreur en noir sont des intervalles de confiance à 95%.

auteurs ont tenté de corrélérer la prévalence des *E. coli* BLSE/AmpC de chaque réservoir à la probabilité d'exposition de l'Homme à ces mêmes réservoirs (Figure 42, 239). Ils ont ensuite calculé la probabilité d'acquisition de chaque gène pour chaque source et ont fini par proposer une estimation de l'attribution de chaque source en *E. coli* BLSE/AmpC dans la population communautaire aux Pays-Bas. Dans cette estimation, l'Homme représentait 67% des sources de transmissions pour la population humaine communautaire, décrivant ainsi majoritairement des transmissions inter-humaines ; les animaux de rente ne représentaient que seulement 3% des sources d'attribution. Associés à l'alimentation, ces derniers représentaient néanmoins un potentiel d'attribution de 20,6% (Figure 43).

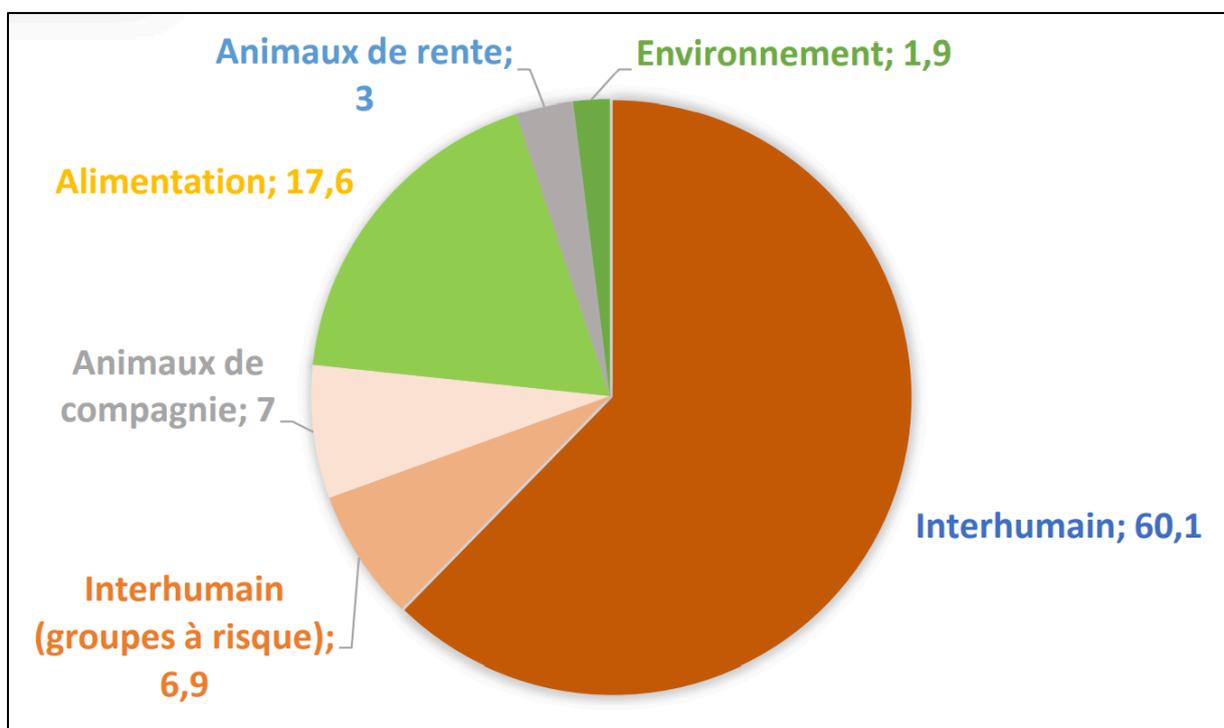


Figure 43. Pourcentage des attributions estimées de chaque source en considérant le portage intestinal de *E. coli* BLSE ou AmpC détecté dans la population communautaire aux Pays-Bas entre 2005 et 2017. Adapté de Mughini-Gras *et al.* (239)

2.2.5 Cas particulier des EPC hors du compartiment humain

De plus en plus d'études signalent la dissémination des EPC hors du compartiment humain et notamment chez les animaux (de rente et de compagnie) ainsi que dans l'environnement. Plusieurs revues récentes ont tenté d'évaluer l'importance de ce phénomène et les conséquences pour la santé humaine.

Chez les animaux, **Madec et al.** précisait en 2017 que la présence des EPC chez les animaux était encore rare, mais néanmoins en forte augmentation. Les gènes codant pour ces EPC (bla_{KPC} , bla_{OXA-48} , bla_{NDM} , bla_{VIM} et bla_{IMP}) ont pour la plupart été décrits chez *S. enterica* dans la filière alimentaire. Chez les animaux de rente, ces gènes ont été décrits chez *S. enterica* mais également *E. coli* et *K. pneumoniae* (223). Il est à noter qu'un clone de *E. coli* ST1284/NDM-5 a été décrit en Algérie, chez des chiens et surtout chez des bovins et dans leur lait, faisant potentiellement craindre une transmission secondaire à l'Homme (307). Des isolats de *E. coli* et de *K. pneumoniae* NDM-5 ont également été décrits respectivement en Inde et en Chine chez des bovins (308–310). Des isolats de *K. pneumoniae* OXA-48 ont également été détectés dans du lait cru au Liban (311). Les auteurs rappelaient que l'utilisation des carbapénèmes était interdite en médecine vétérinaire, et qu'il n'existait ainsi pas de pression de sélection comme chez l'Homme dans le compartiment animal. Toutefois, la plupart des gènes codant pour ces carbapénémases étant situés sur des plasmides véhiculant d'autres gènes de résistance, ces plasmides et isolats pourraient ainsi être co-sélectionnés dans ce compartiment par d'autres antibiotiques comme la tétracycline, les sulfamides ou les phénicolés, qui sont eux largement utilisés en médecine vétérinaire. En 2018, **Köck et al.** réalisaient une seconde revue à partir de 68 études sur les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes retrouvées chez les animaux (de rente, de compagnie et sauvage) et dans l'alimentation (Figure 44a et 44b, 312). En plus des animaux de rente et de compagnie, où les EPC étaient le plus fréquemment rapportées, celles-ci étaient également présentes dans la faune sauvage chez les mouettes et d'autres oiseaux (en Australie et en Europe) et

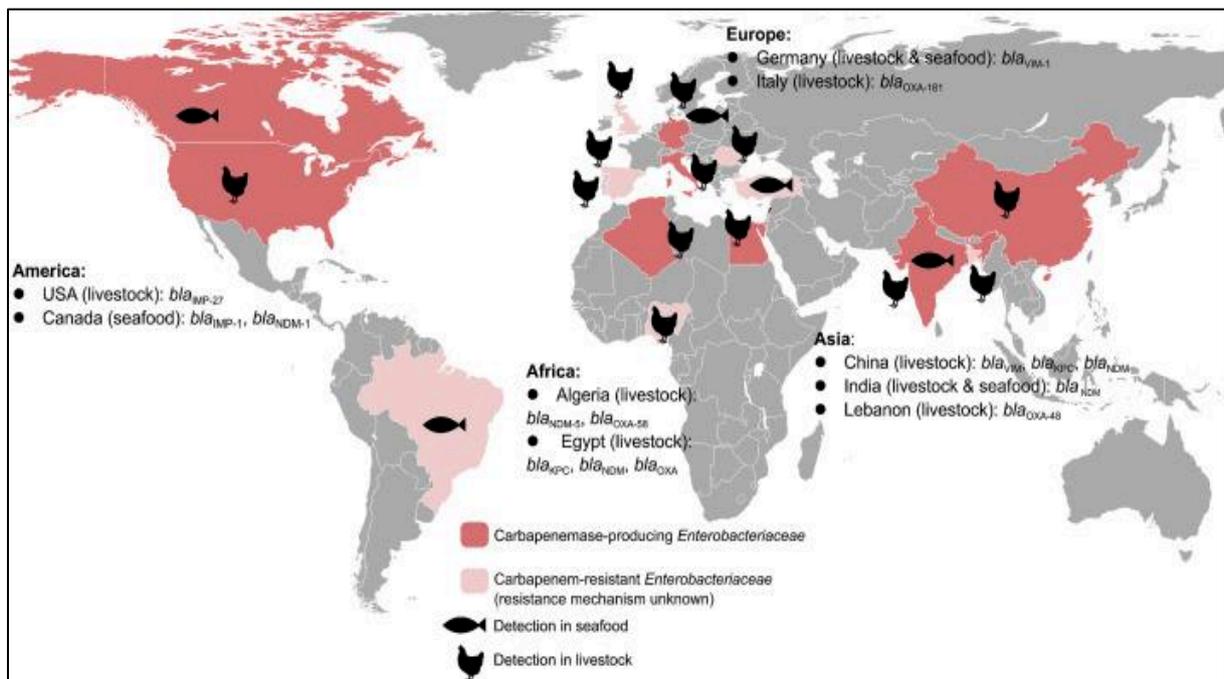


Figure 44a. Distribution mondiale des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et productrices de carbapénémase dans le bétail et les aliments issus de la mer. D'après Köck et al. (312)

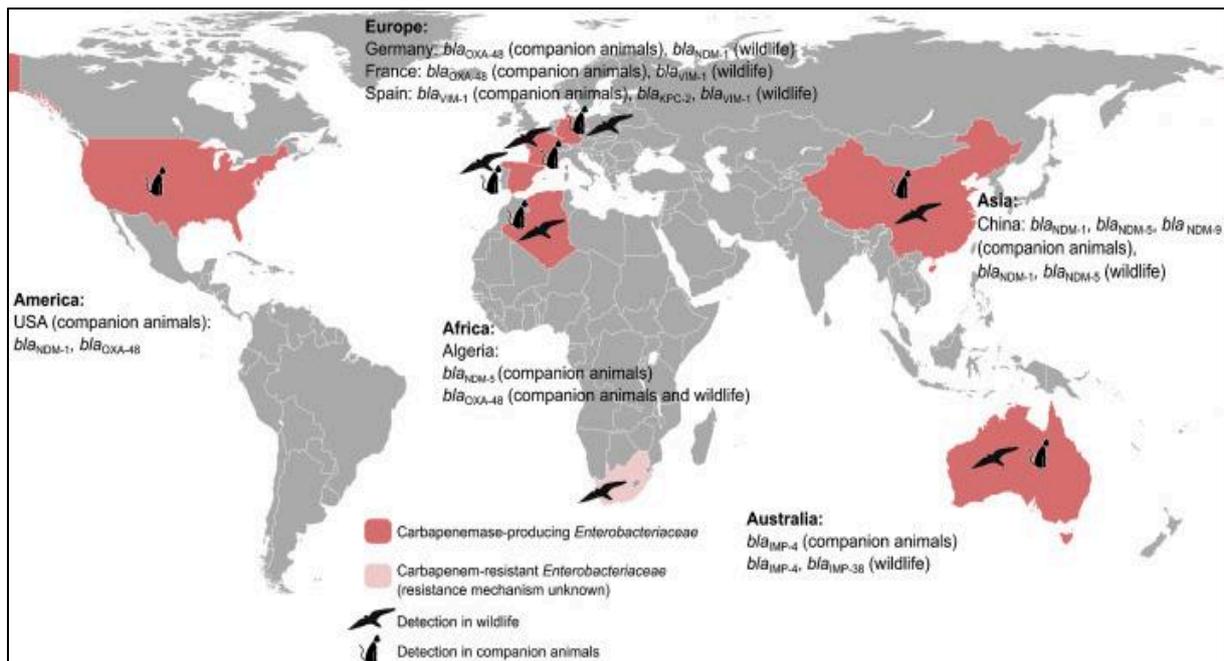


Figure 44b. Distribution mondiale des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et productrices de carbapénémase chez les animaux de compagnie et la faune sauvage. D’après Köck *et al.* (312)

dans les aliments issus de la mer. À noter que des transmissions Homme-animal avaient été décrites chez *E. coli* et *K. pneumoniae* en Chine et en Egypte, respectivement. Les auteurs notaient que le design des études dans lesquelles les EPC avaient été détectées, souvent associées à une exposition humaine, ne rendait pas possible une évaluation fiable de la prévalence de EPC dans ces compartiments. Enfin, les carbapénèmes de type IMI et notamment *bla*_{IMI-1} et *bla*_{IMI-2} ont été, à plusieurs reprises, décrites dans les produits alimentaires issus de la mer (crevettes, bivalves, maraîchage flottant) originaire d’Inde ou d’Asie du Sud-Est (Birmanie, Vietnam) et parfois détectés dans leur pays d’importation en Amérique du Nord (Canada) (313–315). Très récemment, elles ont même été décrites dans la faune sauvage aux Etats-Unis, chez des corbeaux (316).

Dans l’environnement, une récente revue réalisée par **Mills *et al.*** a permis d’identifier les principaux réservoir de gènes de carbapénémases dans l’environnement ainsi que les potentiels modes de transmission à l’Homme (317). Les auteurs décrivaient une dissémination globale des EPC de type OXA-48, KPC, NDM et VIM dans de nombreux réservoirs tels que les eaux usées hospitalières et municipales, l’eau potable, les cours d’eau naturels, les eaux de baignade, les sédiments, les animaux de compagnie, la faune et la flore sauvages, les environnements agricoles, les animaux destinés à l’alimentation et les produits alimentaires au détail (Figure 45). Les deux principales voies d’exposition aux EPC environnementales proposées étaient les suivantes : l’ingestion d’eau potable/de loisirs, d’aliments/produits animaux ou de produits contaminés, et le contact physique avec des animaux,

l'environnement lui-même ou des surfaces contaminées. Si des transmissions de *E. coli* étaient fortement suspectées en Egypte ou en Chine, seuls deux cas d'infections à EPC documentés comme étant d'origine environnementale ont été décrits dans la littérature : un cas d'infection post quasi-noyade à *E. asburiae* IMI-2 en France et un cas d'infection urinaire d'origine communautaire à *K. pneumoniae* OXA-48 en Algérie (318,319). Les auteurs concluaient qu'il existait un potentiel risque de transmission *via* l'environnement lié à l'usage non contrôlé des antibiotiques qui crée une pression de sélection permettant à ces EPC de persister dans l'environnement, mais que des études complémentaires étaient nécessaires afin de quantifier ce phénomène. Enfin, rappelons que les carbapénèmes de type IMI ont été décrites dans des environnements hydriques telles que des rivières en Amérique ou en Espagne (104,320).

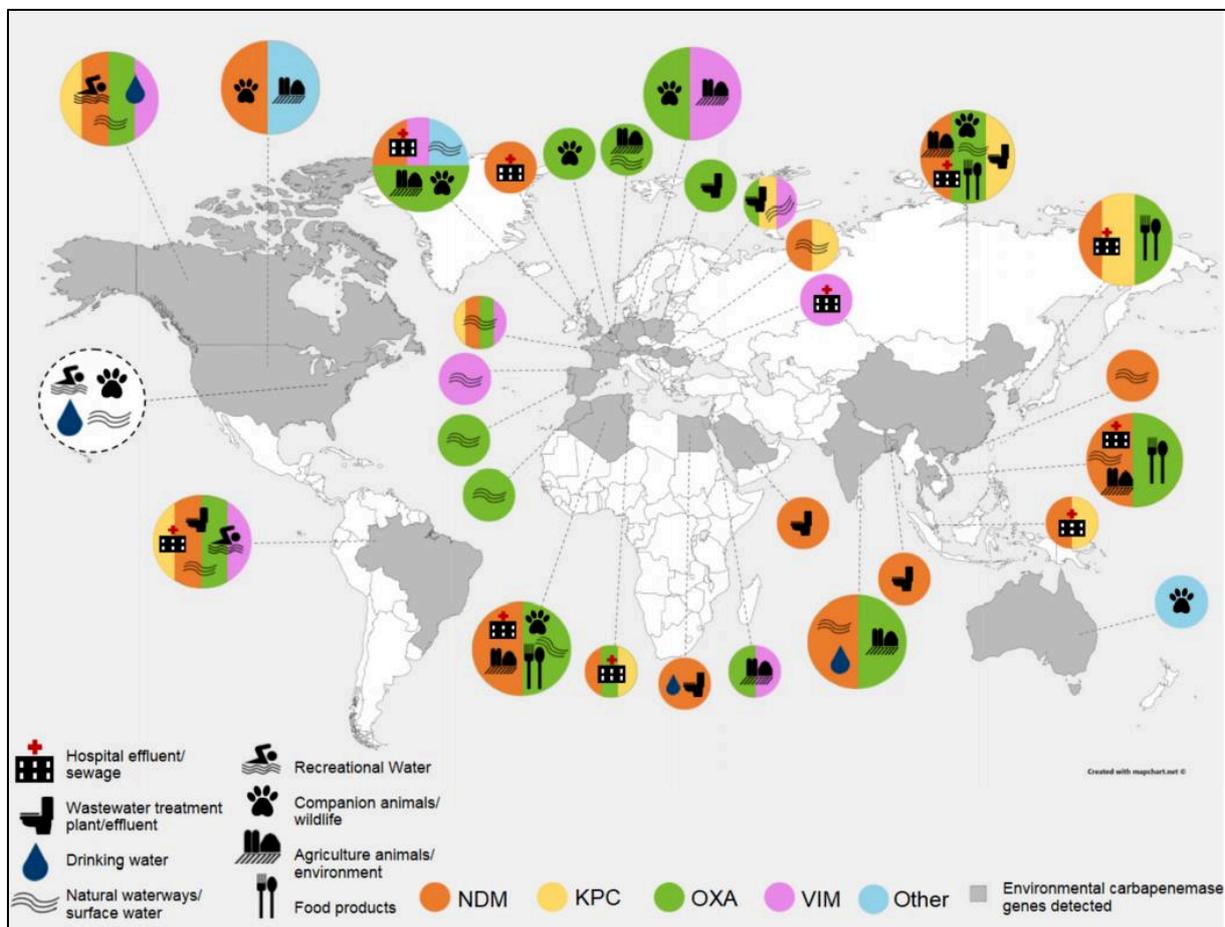


Figure 45. Résumé de l'identification des gènes producteurs de carbapénémase dans les réservoirs environnementaux, signifiés par des couleurs et des symboles correspondants. D'après Mills *et al.* (317)

Sur cette carte, cette revue inclue les enzymes KPC, NDM, OXA, et VIM. Une catégorie « autre » est incluse pour identifier tout autre gène producteur de carbapénémase dans la littérature. La quantification n'est pas représentée dans cette carte, mais la présence ou l'absence du gène respectif au niveau du pays. Des données non publiées provenant du bassin versant de la rivière Scioto et de Columbus (Ohio, Etats-Unis) sont représentées dans le cercle blanc avec une bordure en pointillés.

3 Les particularités des DOM du Sud-Ouest de l’Océan Indien

3.1 La Réunion

3.1.1 Carte d’identité

La Réunion est une île située dans la partie Sud-Ouest de l’Océan Indien (SOOI), proche de Madagascar. Sa superficie est de 2 512 km² et sa population compte 855 000 habitants (recensement INSEE 2018). Il s’agit ainsi du département d’Outre-Mer le plus peuplé de France. La Réunion est ainsi une île plus densément peuplée (341 hab./km²) que la France métropolitaine (94 hab./km²). Son chef-lieu est la ville de Saint-Denis, situé au Nord de l’île. La topographie de cette île volcanique qui appartient à l’archipel des Mascareignes est forgée par ses 2 volcans (le Piton des Neiges, endormi, et le Piton de la Fournaise, actif) et les 3 cirques situés au centre de l’île (Cilaos, Mafate et Salazie, Figure 46). Les « Pitons, cirques et remparts » de la Réunion sont inscrits au patrimoine mondial de l’UNESCO depuis 2010. La répartition des habitants sur l’île est très inégale, avec près de 90% des habitants sur les côtes, et très peu d’habitants dans le centre. L’île de La Réunion est souvent surnommée « l’île intense » en rapport avec sa très grande diversité culturelle et aux diverses activités récréatives qu’elle propose.

Si les austronésiens, les arabes ou les portugais y ont fait escale avant, La Réunion n’a réellement été peuplée qu’à partir du XVII^{ème} siècle (1642, 1646, puis 1665) par des colons français tout d’abord exilés de Madagascar, puis de la métropole. D’abord appelée **île Mascarin**, elle devient sous le nom d’**île Bourbon**, une escale de la Compagnie française des Indes orientales sur la route des Indes puis acquiert son nom définitif d’**île de La Réunion** en 1848, qui est également l’année d’abolition de l’esclavage sur l’île. À partir des années 1710, la Réunion devient une vraie colonie française dédiée à la culture du café et des épices, puis de la canne à sucre. La Réunion accède à la départementalisation en 1946, tout comme la Guadeloupe, la Martinique et la Guyane. À partir des années 1960, et au cours des 60 dernières années, La Réunion a connu un essor économique et démographique très important initialement dû à l’indépendance de Madagascar (1960) puis à l’élection de certains députés comme Michel Debré (1962) qui en font aujourd’hui le DOM le plus proche de la métropole en termes d’infrastructures, de santé ou d’éducation. Aujourd’hui, l’économie de l’île repose essentiellement sur le tourisme et le BTP, et dans une moindre mesure à la culture de la canne à sucre. Il existe aussi un grand nombre de fonctionnaires de l’éducation nationale, de la fonction publique hospitalière ou territoriale.

Le peuplement de La Réunion est fortement lié à l’esclavage et aux migrations successives qui ont suivi son abolition en 1848. Ce peuplement progressif a abouti à un métissage très important mélangeant de nombreuses ethnies d’origines géographiques très diverses. Ce peuple tire ainsi ses origines d’un métissage précoce entre colons français et femmes malgaches dès le XVII^{ème} siècle, puis par l’esclavage ou l’engagisme après 1848. De nombreux peuples issus d’Afrique australe (les Cafres), de l’Ouest et du Sud-Est de l’Inde (les *Zarabes* originaires du Gujarat et les *Malbars* originaires du Tamil Nadu), du Sud de la Chine (les *Chinois*, notamment originaires de Canton) et d’Europe (les *Yabs*) ont ainsi peuplé progressivement La Réunion. Du métissage de ces communautés émerge une culture créole basée sur une langue (le créole réunionnais), la cuisine et la musique locale (Séga, Maloya, ...).

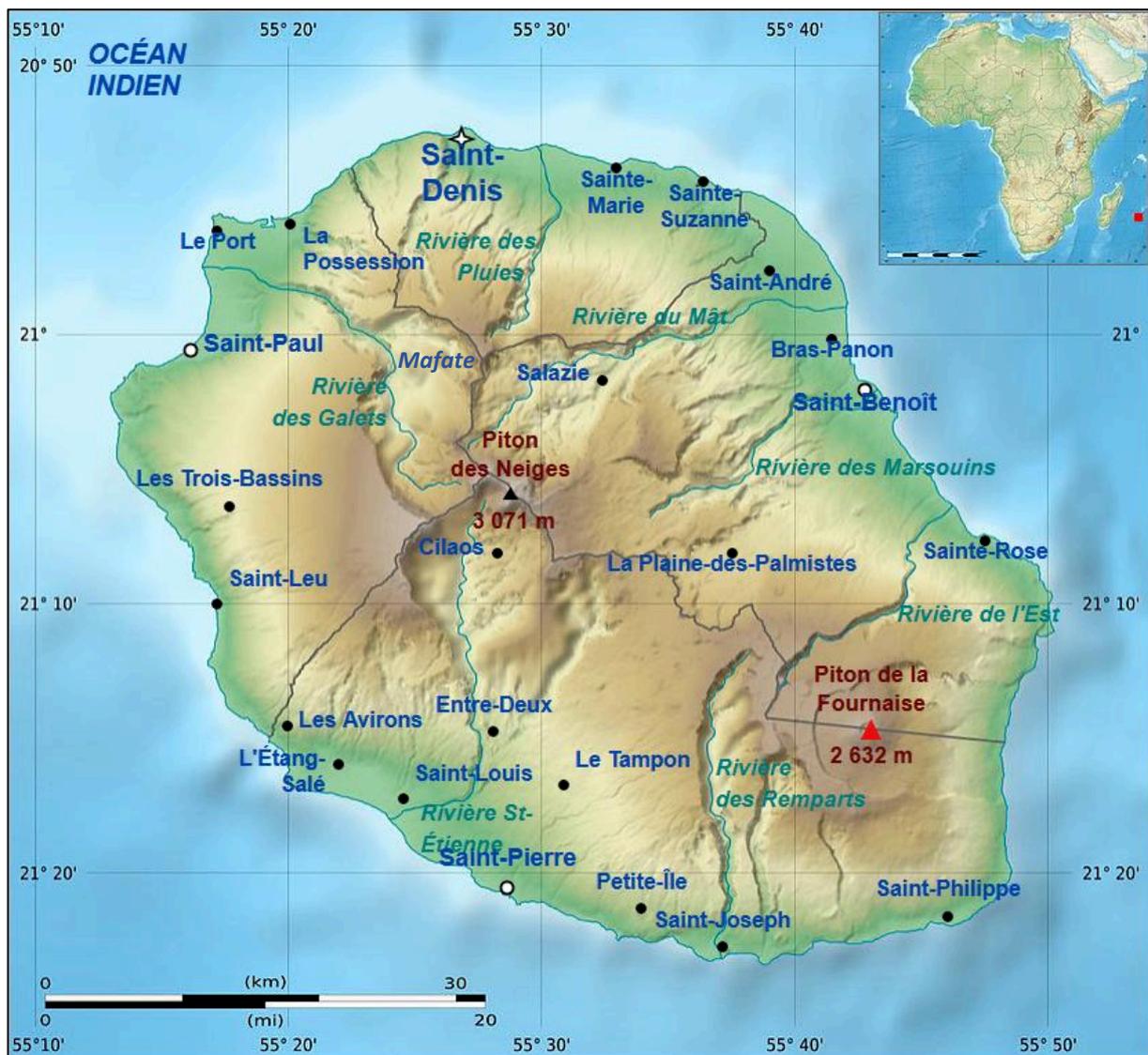


Figure 46. Carte géographique de La Réunion avec ses communes et son chef-lieu (Saint-Denis).

Il existe également, depuis plus récemment, des échanges de populations avec l'archipel des Comores (Comoriens et Mahorais) mais avec moins de métissage, ces communautés étant moins intégrées. La Réunion abrite enfin une forte endémicité, essentiellement des espèces végétales mais aussi des oiseaux tels que le Tuit-tuit (*Lalage newtoni*), le Tec-tec (*Saxicola tectes*) ou le Pétrel de Barau (*Pterodroma barau*), ainsi qu'une micro chauve-souris insectivore appelée Ti Moloss (*Mormopterus francoismoutoui*).

3.1.2 Un carrefour migratoire dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien

De par sa population aux origines très diverses et son statut de territoire français développé dans la zone, La Réunion est le point de passage de nombreux flux migratoires dans la zone Océan Indien le liant d'une part à la France métropolitaine, mais surtout à l'Afrique australe et au sous-continent Indien. On peut séparer ces flux selon 2 principaux motifs d'échanges de populations : (i) le tourisme, surtout familial, et les échanges de populations liés aux voyages réguliers des réunionnais dans leurs régions d'origine comme l'Inde, la Chine ou les Comores ; et (ii) les migrations de patients liés à des motifs sanitaires comme des évacuations sanitaires vers le CHU de La Réunion pour des patients atteints de pathologies sévères ou le tourisme médical vers l'île Maurice (321). Aujourd'hui, quasiment l'exclusivité des déplacements de populations dans la zone se fait par les transports aériens (Figure 47).

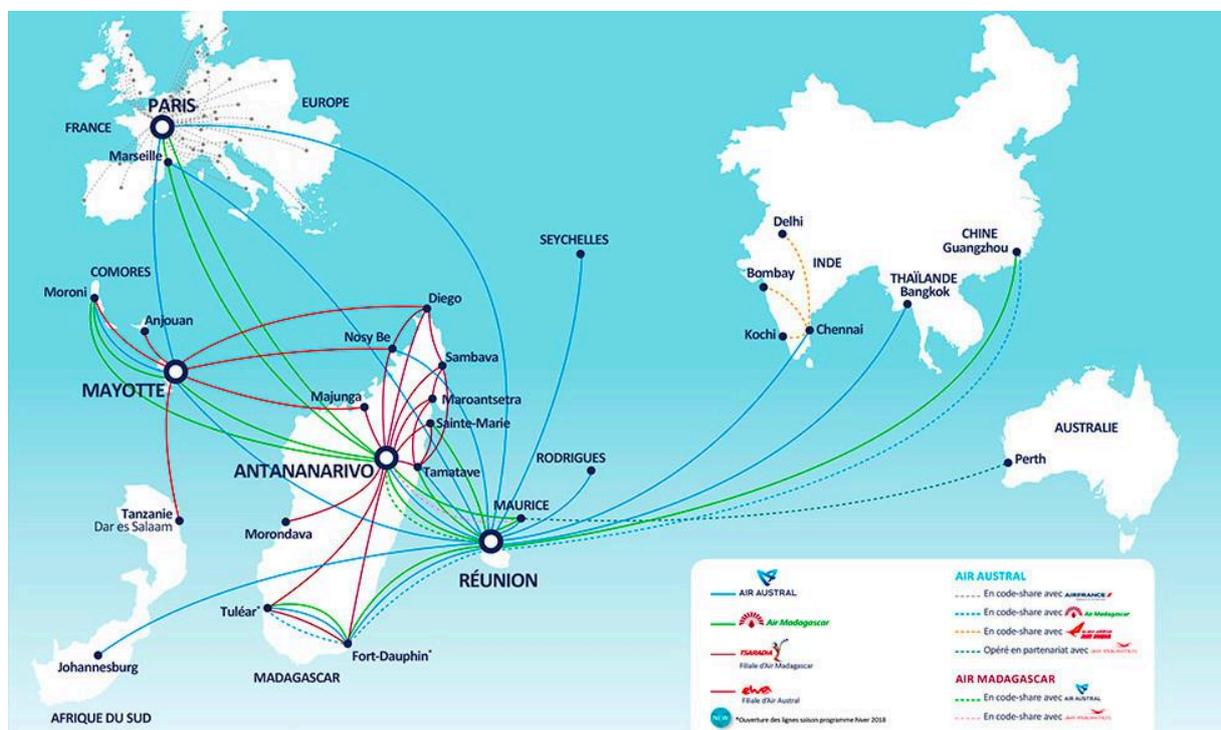


Figure 47. Carte illustrant les différentes lignes aériennes connectant les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien, à l'Afrique, l'Asie et l'Europe.

Il existe 2 flux principaux :

- un flux Ouest liant la Réunion à l'Inde *via* Maurice (mais aussi par des vols directs vers Chennai) et notamment entretenue par les réunionnais indous (321), et à la Chine pour les réunionnais d'origine chinoise (vols directs vers Guangzhou).
- Un flux Est liant La Réunion à l'Afrique australe, Madagascar et les Comores/Mayotte liés à la fois aux mobilités familiales et aux évacuations sanitaires vers le CHU de La Réunion.

Selon les derniers chiffres de l'aviation civile de 2018, l'aéroport Roland Garros de Saint-Denis était le 1^{er} aéroport d'Outre-Mer et le 11^{ème} de France avec 2 475 244 passagers en transit/an. Concernant les échanges de passagers entre l'Outre-Mer et l'étranger, le continent africain arrivait en 1^{ère} position avec 942 242 liaisons/an parmi lesquelles l'île Maurice (628 851 liaisons) et Madagascar (200 961 liaisons) et les Comores (49 899 liaisons) occupaient les 3 premières positions (322).

Dans le domaine de la santé, La Réunion est dotée d'un Centre Hospitalier Universitaire (CHU) bi-site, le site CHU Félix Guyon (Saint-Denis) et le Groupe Hospitalier Sud Réunion (l'hôpital de Saint-Pierre, l'hôpital de Saint-Louis, l'hôpital de Saint-Joseph, l'hôpital du Tampon, l'hôpital de Cilaos et le Centre de santé mentale du CHU). Il est devenu le 30^{ème} CHU de France par sa création en février 2012. Cet établissement compte un total de 1822 lits dont 1358 lits de médecine, chirurgie, obstétrique, 188 lits de santé mentale et 106 lits de soins de suite et réadaptation (SSR). Il emploie plus de 7400 professionnels, dont environ 1000 personnels médicaux. Son activité correspond à 134 200 passages aux urgences par an et 314 000 consultations et soins externes par an. Le CHU propose un plateau technique relevé avec des services tels que la réanimation médicale et chirurgicale, la chirurgie cardiaque et vasculaire, la chirurgie infantile et néonatale, la neurochirurgie, l'hyperbarie, l'hématologie-oncologie, les maternités de niveau III, les grands brûlés, un laboratoire NSB3 et centre référent NRBC/arboviroses, un laboratoire HLA et la greffe rénale. Il est considéré comme l'hôpital universitaire de référence dans la zone et fait l'objet de nombreuses évacuations sanitaires (EVASAN) chaque année pour les ressortissants français et étrangers de la zone Océan Indien. Le nombre d'EVASAN a fortement progressé ces dernières années, passant à titre d'exemple de 125 en 2011 à 300 en 2016. Ces hospitalisations programmées ou en urgence concourent à l'importation de bactéries multi- et hautement-résistantes sur le territoire réunionnais.

3.1.3 Épidémiologie de la résistance chez les entérobactéries

En octobre 2017, au début de ce travail, l'épidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE ou de carbapénémase était peu connue ou issue de données d'échantillonnage parcellaires.

3.1.3.1 Entérobactéries productrices de BLSE et AmpC

Il n'existait en 2017 que 2 études documentant la prévalence des entérobactéries résistantes aux C3G à La Réunion (323). Une première étude menée par **Belmonte *et al.*** comparait la prévalence des entérobactéries résistantes aux C3G dans les prélèvements cliniques au CHU Félix Guyon entre les périodes 1997/98 et 2006/07. La prévalence des entérobactéries BLSE était passée de 2 à 5,8% sur cette période. Cette augmentation était notamment due à la progression des proportions d'EBLSE chez *E. cloacae* et *E. coli* qui représentait sur la période 2006-2007 respectivement 39% et 27% des isolats dans chacune de ces espèces (Figure 48, 324). Une seconde étude avait été menée en 2013 sur 100 souches d'EBLSE issues de prélèvements à visée diagnostique au CHU Félix Guyon et au GHSR.

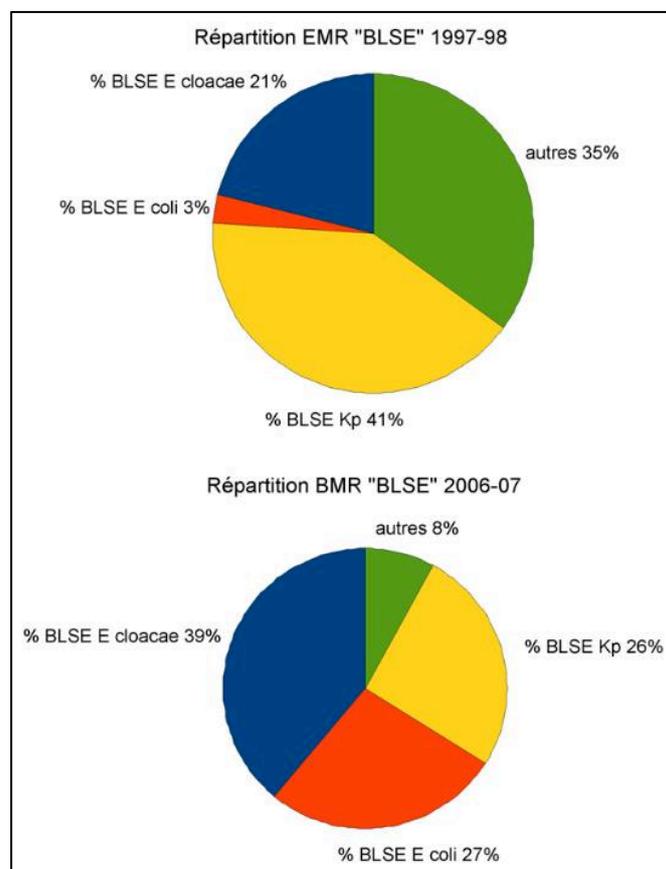


Figure 48. Répartition des entérobactéries productrices de BLSE par espèce au CHU Félix Guyon entre les périodes 1997/98 et 2006/07. D'après Belmonte *et al.* (324)

E. coli, *K. pneumoniae* et *E. cloacae* étaient les 3 espèces principales avec 37%, 38% et 24 % des souches, respectivement. La BLSE CTX-M-15 était largement majoritaire (75 %) dans les 2 hôpitaux (CHU Félix Guyon : 62 %, GHSR : 88 %). Une céphalosporinase plasmidique de type DHA ou CMY avait été retrouvée chez 10 % des souches (325). Il est à noter que les quelques données de la littérature semblaient décrire une prévalence importante des EBLSE dans les autres îles de l'Océan Indien comme Madagascar (18,5% à 57,1%) ou Maurice (21,3%), faisant craindre une importation de ces souches *via* les échanges de populations (323). Une seule étude menée chez des animaux de compagnie (chiens et chats) à La Réunion en 2013 avait abouti à une prévalence de 8,4% (326). Il n'existait aucune donnée publiée sur les EBLSE chez les animaux de rente et dans l'environnement à La Réunion, même si des campagnes de prélèvements avaient débuté en collaboration avec le CIRAD chez les animaux de rente.

3.1.3.2 Entérobactéries productrices de carbapénèmase

De même, en 2017, très peu de données étaient disponibles sur les EPC à La Réunion. Les deux premiers isolats d'EPC (de type NDM) observés à La Réunion ont été décrits en 2011 comme appartenant aux espèces *K. pneumoniae* et *S. enterica* (sérotypage Enteritidis), et détectés chez de patients précédemment hospitalisés à l'île Maurice et en Inde, respectivement (327). De plus, la 1^{ère} EPC produisant une carbapénèmase de type OXA-48-like était un isolat de *E. coli* porteur du gène *bla*_{OXA-232} retrouvé en 2012 chez un patient mauricien qui s'était rendu en Inde (188). Une première étude épidémiologique publiée par **Holman et al.** avait permis de mettre en évidence une forte progression des EPC à La Réunion entre 2011 et 2015 et une proportion importante des enzymes de type NDM-1, représentant plus de 80% des souches analysées (328). Un lien avec une autre île de l'Océan Indien était retrouvé dans 58,3% des cas, et l'île Maurice était la 1^{ère} destination rapportée.

3.2 Mayotte

3.2.1 Carte d'identité

Mayotte est située dans le Nord du canal du Mozambique, entre l'Afrique australe et la pointe Nord de Madagascar. Cette île fait historiquement partie de l'archipel des Comores, composé en tout de 4

îles principales : Grande Comore, Anjouan, Mohéli et donc Mayotte. Mayotte est en fait elle-même un archipel composé de 2 îles principales : Grande-Terre (*Mahoré* en mahorais) au Sud et Petite-Terre (*Pamanzi* en mahorais), au Nord (Figure 49). La superficie de Mayotte est de 376 km² pour une population évaluée à 256 000 habitants en 2018 (INSEE), Mayotte est ainsi le plus petit DOM français. Il s'agit aussi du territoire français le plus densément peuplé (682 hab./km²). Le chef-lieu officiel est Dzaoudzi situé à Petite-Terre, mais le chef-lieu effectif est Mamoudzou, ville la plus peuplée de l'île située au Nord-Est de Grande-Terre. L'île est d'origine volcanique, rendant ces terres propices à l'agriculture. Son point culminant est le Mont Choungui situé à 594m d'altitude. Mayotte est surtout connue pour sa barrière de corail de 160 km de long entourant l'île et délimitant un lagon de 1 100 km². De par sa forme vue du ciel, Mayotte est parfois surnommée « l'île hippocampe », ou encore « l'île aux parfums » car elle était autrefois une forte productrice de plantes odorantes comme l'ylang-ylang (Figure 49). Mayotte possède également une forte endémicité avec sa mangrove, ses baobabs et sa faune terrestre telle que le lémur brun (ou Maki de Mayotte), un lémurien frugivore, ou la roussette de Mayotte (*Pteropus seychellensis comorensis*), une chauve-souris géante également frugivore. Sa faune marine est également très riche avec des raies Manta ou Pastenague, des tortues marines, des dauphins et même une petite population de dugongs.

Mayotte a été peuplée de manière permanente bien avant La Réunion, vers le VIII et IX^{ème} siècle, par des peuples *swahilis* d'origine bantoue originaire d'Afrique orientale. Si les populations n'étaient sans doute pas musulmanes initialement, elles le sont devenues suite aux contacts précoces avec des marchands musulmans circulant dans le canal du Mozambique. L'histoire voudrait que les marchands arabes ne fassent qu'escale à La Réunion du fait de la crainte que leur inspirait le volcan fréquemment en éruption et qu'ils aient remonté le canal du Mozambique jusqu'à l'archipel des Comores pour s'y installer. Mayotte passe ainsi sous contrôle musulman au XIII^{ème}/XV^{ème} siècle et deviendra un sultanat en 1470. Mayotte n'est vendue à La France par le dernier sultan de Mayotte qu'en 1841. En 1885, les Comores deviennent également françaises suite à la conférence de Berlin. En 1974, un référendum est organisé par la France prévoyant l'autodétermination des Comores, c'est à dire des 4 îles de l'archipel dans leur globalité. Cependant, suite au large vote des Mahorais en faveur d'un maintien avec la France (63,8%), la France n'accède pas aux volontés des dirigeants comoriens de céder l'archipel dans sa globalité et maintient son administration sur Mayotte en considérant le résultat du référendum « île par île ». Cette situation est confortée par un 2^{ème} référendum en 1976 (99,4% pour le maintien en France) et Mayotte est, depuis, française en étant revendiquée par l'Union des Comores et non reconnue par l'ONU. La France a dû plusieurs fois user de son droit de *veto* aux Nations Unies pour

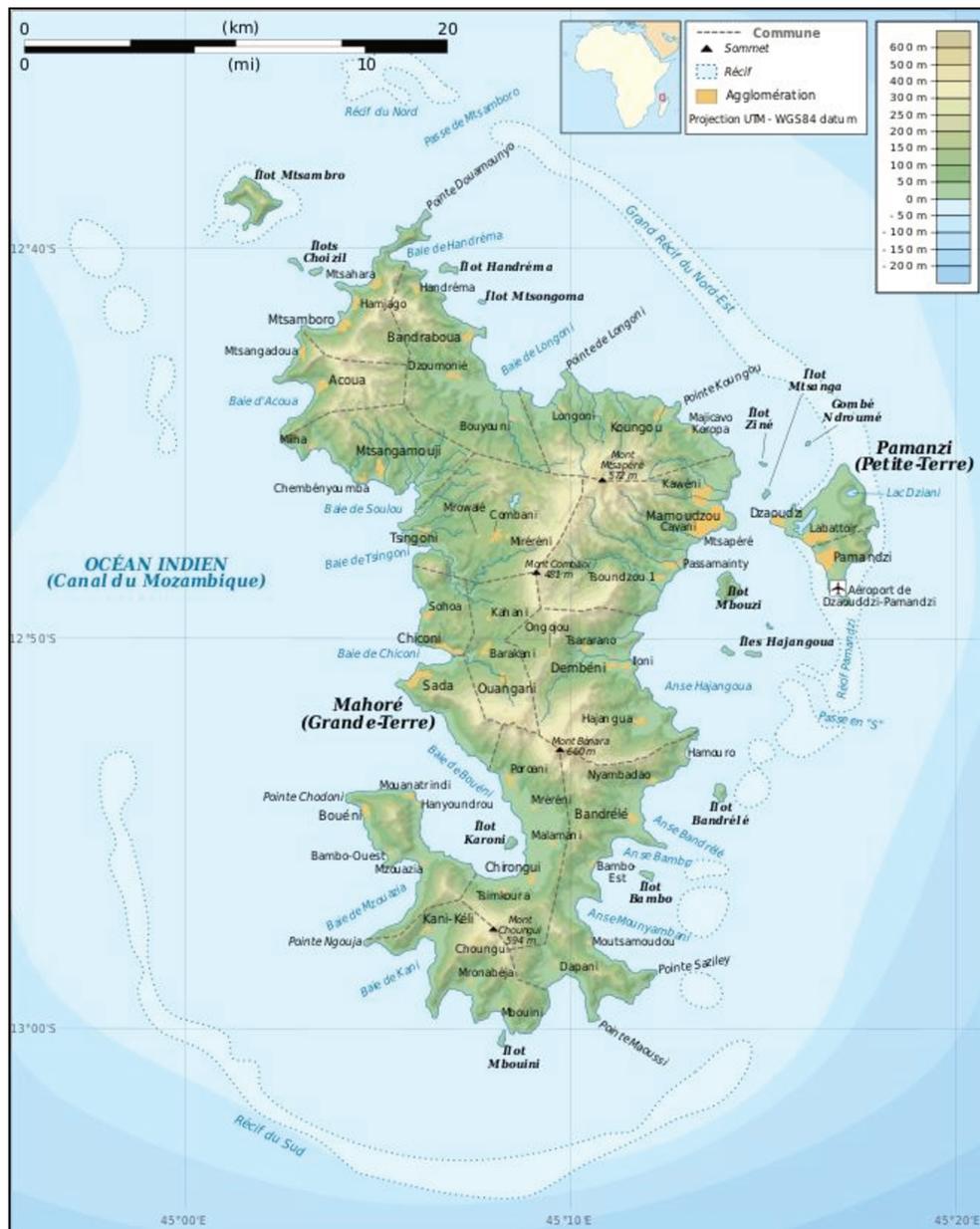


Figure 49. Carte géographique de Mayotte et ses différentes communes.

s'opposer aux résolutions visant à engager des négociations pour une rétrocession de Mayotte. En 2011, Mayotte est devenu le 101^{ème} département français suite à un référendum encore une fois très majoritaire (95% de oui) et est aujourd'hui considéré au même titre que La Réunion, comme un territoire européen ultrapériphérique. Mayotte est aujourd'hui une île à 95% musulmane où l'on parle majoritairement le *shimaroré* et où le français est la langue officielle. L'essentiel de l'économie, peu développée, repose sur l'administration, le BTP, les commerces et le tourisme en progression constante.

3.2.2 Problématiques sanitaires et d'immigration

Le DOM de Mayotte est avant tout confronté à des difficultés socio-économiques. Selon le dernier rapport de l'INSEE publié en 2020, 77 % de la population vit sous le seuil de pauvreté nationale (établi à 959€ par mois et par foyer), comparé à 14 % pour la France métropolitaine. À Mayotte, 40 % des résidences principales sont des cases en tôle, et seulement 34 % des 15–64 ans ont un emploi. Le taux de pauvreté défini par ce même rapport est de 84 % (329). Ces problèmes sont très corrélés à des difficultés sanitaires, où l'approvisionnement en eau courante ne concerne que 70% des foyers, et où le nombre d'habitats insalubres est important (59 % n'ont pas de toilettes à l'intérieur de l'habitation et 52 % n'ont ni baignoire ni douche). Ces habitations sont plus ou moins illégales avec une extension des bidonvilles, si bien qu'il existe encore des pathologies liées au péril oro-fécal (comme la fièvre typhoïde), ou des cas de paludisme autochtones et de diphtérie cutanée. L'approvisionnement en eau est d'autant plus problématique que les infrastructures (retenue collinaire ou usine de dessalement d'eau de mer) sont vieillissantes et deviennent sous-dimensionnées suite à l'inflation démographique. On note une croissance très importante de la population liée à la natalité et l'immigration clandestine (+3,8% entre 2017 et 2018 à titre d'exemple).

Le seul hôpital de l'île est le Centre Hospitalier de Mayotte (CHM) d'une capacité de 411 lits et qui est chaque année la 1^{ère} maternité de France (9.770 naissances en 2019). Le CHM dispose d'un service de réanimation de 14 lits, d'un caisson hyperbare, 5 blocs opératoires, et d'un pôle médico-technique (laboratoire, pharmacie, imagerie). Le CHM emploie 2600 professionnels, dont plus de 390 personnels médicaux (220 médecins et 170 sages-femmes).

Un des problèmes majeurs de Mayotte sont les conditions socio-économiques et sanitaires dégradées aux Comores qui entraînent une forte immigration illégale liée à la recherche d'emplois ou de meilleures conditions de vie, mais également pour trouver des conditions de soins plus proches de celles de la métropole que celle d'un pays en voie de développement. Mayotte représente un point d'entrée sur le territoire européen pour la population comorienne. En 2010, le PIB par habitant à Mayotte était huit fois supérieur à celui des Comores. Il existe des transits illégaux de population *via* des bateaux de fortunes (appelés *kwassa kwassa*) lors de pathologies graves (traumatismes importants, grands brûlés, infections sévères, ...) ou de grossesses compliquées. On dénombre ainsi une très forte immigration illégale, source de tension et d'insécurité sur l'île de Mayotte, et freinant ainsi son développement. Si l'usage des antibiotiques est plus contrôlé sur le territoire français de Mayotte, il ne l'est pas du tout aux Comores où l'étendue de la résistance aux antibiotiques n'est pas

connue. Des études récentes menées à Zanzibar, un archipel proche et similaires en termes de population, a démontré de très fortes prévalences de résistance faisant craindre un phénomène similaire aux Comores (330). Ces échanges de populations peuvent ainsi participer à l'importation de bactéries multi- et hautement résistantes sur le territoire mahorais, et plus généralement dans les 2 DOM français de l'Océan Indien (331).

3.2.3 Épidémiologie de la résistance chez les entérobactéries

Si des pathologies comme la rougeole, la fièvre de la vallée du Rift, l'angiostrongylose, ou la leptospirose ont déjà été documentées à Mayotte, il n'existait en 2017 aucune étude sur la résistance aux antibiotiques dans la population humaine à Mayotte (PubMed, Google scholar, Web of science).

Une étude préliminaire que nous avons menée sur des animaux d'élevage dans différentes îles de l'Océan Indien en 2014 avait permis d'établir une prévalence des entérobactéries BLSE dans des élevages de volailles, bovins et caprins de 6,7% aux Comores et de 26,9% à Mayotte (332).

2^{ème} PARTIE : TRAVAIL SCIENTIFIQUE

1 Objectifs

Dans les années 1990 ont émergé les EBLSE de type CTX-M qui sont aujourd'hui largement prédominantes. Ces EBLSE ont provoqué une augmentation de l'utilisation des carbapénèmes, qui sont les bêta-lactamines de choix pour traiter les infections à EBLSE. Ce phénomène a pu concourir à l'émergence des EPC qui a débuté dans les années 2000, et plutôt dans les années 2010 à La Réunion. Ces EPC sont aujourd'hui disséminées mondialement et sont devenues endémiques dans certains pays du globe comme par exemple l'enzyme NDM en Inde (147). L'émergence et la dissémination des EBLSE et des EPC posent un réel problème de Santé publique au niveau mondial puisqu'elles limitent fortement les alternatives thérapeutiques en cas d'infections. Il est aujourd'hui démontré qu'il existe une surmortalité chez les patients atteints d'infections à BMR ou BHR (9). De plus, la diffusion de ces bêta-lactamases chez *E. coli* constitue un réel défi puisque cette espèce constitue à la fois la 1^{ère} espèce aérobie du tube digestif et la 1^{ère} bactérie responsable d'infections communautaires ou liées aux soins en France. Comme nous avons pu le décrire dans la 1^{ère} partie de ce manuscrit (paragraphe 3.1.3 et 3.2.3), l'épidémiologie des BMR et des BHR dans les 2 DOM de La Réunion et Mayotte étaient peu connues au début de ce travail en 2017. Des études complémentaires sont venues confirmer la forte prévalence des EBLSE dans la population communautaire réunionnaise (8,3%) et dans la population hospitalisée au CHU de la Réunion (17,9% de colonisation chez les patients hospitalisés en Réanimation entre 2015 et 2017) (333,334). De plus, la prévalence des EBLSE et EPC chez les patients entrant au CHU de La Réunion en provenance d'autres îles de l'Océan Indien semblait encore plus élevée (334). En outre, des études menées chez les animaux de rente à La Réunion ont également rapporté une prévalence importante des EBLSE dans ce compartiment, respectivement 70% ; 53,3% et 3,7% chez les volailles, les porcins et les bovins (335). Enfin, l'expérience récente de l'épidémie de la COVID-19 a conforté le lien fort entre ces 2 DOM, puisque le CHU de La Réunion, qui fait office d'hôpital de référence dans la zone, a servi de 2^{ème} rempart au titre de la solidarité régionale lors de la saturation du Centre Hospitalier de Mayotte (CHM). Il existe également des échanges importants de populations entre ces 2 territoires français de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien (322).

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'explorer la dynamique de diffusion des EBLSE dans les 3 compartiments humain, animal et environnemental à La Réunion en prenant pour modèle l'espèce *E. coli*. En effet, l'OMS et les sociétés savantes encouragent aujourd'hui à investiguer le phénomène de l'antibiorésistance dans une approche *One Health*, afin d'évaluer le rôle de chaque réservoir de EBLSE dans la transmission de ces BMR à l'Homme. De plus, La Réunion est un

environnement insulaire tropical avec des infrastructures analogues à celles des pays développés et une forte densité de population (341 hab./km²). Elle constitue un modèle géographiquement bien délimité propice à l'étude de ces échanges de EBLSE entre ces différentes niches écologiques ; et qui n'avait fait l'objet d'aucune publication à ce jour. Nous avons pour but de : (i) déterminer les principaux clones de *E. coli* circulants ainsi que le support génétique des résistances (gènes *bla*_{BLSE} et EGM portant ces gènes), et (ii) d'établir de corrélations entre les structures des populations bactériennes, le résistome et les compartiments d'origine afin de déduire d'éventuels transferts entre ces 3 compartiments.

Le travail en lien avec l'objectif principal a fait l'objet de l'article ci-après, que nous qualifierons dans la suite de ce manuscrit d'article « *princeps* » en lien avec l'étude ECOH-RUN :

Article princeps :

Miltgen G, Martak D, Valot B, Kamus L, Garrigos T, Verchère G, Gbaguidi-Haore H, Ben Cimon C, Ramiandrisoa M, Picot S, Lignereux A, Masson G, Jaffar-Bandjee MC, Belmonte O, Cardinale E, Hocquet D, Mavingui P, Bertrand X.

Phylogenomic analysis of ESBL-producing Escherichia coli on the Reunion Island reveals partitioning between human and livestock.

Article en cours de soumission dans la revue Lancet Planetary Health.

Un objectif secondaire de ce travail était d'établir l'épidémiologie des EPC à La Réunion, à la fois dans le secteur hospitalier et communautaire et de tenter de mieux comprendre la dynamique d'importation de ces souches à La Réunion ainsi que les échanges entre les différentes îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI). Si une étude préliminaire avait été réalisée en 2015 sur les EPC à La Réunion, celle-ci ne s'intéressait qu'aux structures hospitalières et n'avait pas évalué le lien épidémiologique entre les différents isolats d'EPC (328). Notre objectif était de référencer l'ensemble des souches d'EPC détectées sur l'île depuis 2010 en se basant sur un réseau robuste de laboratoires et correspondant à la fois à plus de 90% des séjours d'hospitalisation et à un important recrutement communautaire à La Réunion. De plus, nous voulions établir la part des souches pour lesquelles un lien avec l'étranger, et notamment une autre île de la zone, était documenté dans le dossier médical des patients. Enfin, nous nous étions donnés pour but d'explorer les éventuelles émergences épidémiques détectées.

Les travaux en lien avec cet objectif secondaire ont fait l'objet des deux publications ci-après, que nous qualifierons d'articles/études 2 et 3 :

Article 2 :

Miltgen G, Cholley P, Martak D, Thouverez M, Seraphin P, Leclaire A, Traversier N, Roquebert B, Jaffar-Bandjee MC, Lugagne N, Ben Cimon C, Ramiandrisoa M, Picot S, Lignereux A, Masson G, Allyn J, Allou N, Mavingui P, Belmonte O, Bertrand X, Hocquet D.

Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae circulating in the Reunion Island, a French territory in the Southwest Indian Ocean.

Antimicrob Resist Infect Control. 2020 Feb 19;9(1):36.

Article 3 :

Miltgen G, Bonnin RA, Avril C, Benoit-Cattin T, Martak D, Leclaire A, Traversier N, Roquebert B, Jaffar-Bandjee MC, Lugagne N, Filleul L, Subiros M, de Montera AM, Cholley P, Thouverez M, Dortet L, Bertrand X, Naas T, Hocquet D, Belmonte O.

Outbreak of IMI-1 carbapenemase-producing colistin-resistant Enterobacter cloacae on the French island of Mayotte (Indian Ocean).

Int J Antimicrob Agents. 2018 Sep;52(3):416-420.

2 Matériels et méthodes de l'ensemble des travaux

2.1 Définitions

L'origine géographique des patients a été déterminée selon le code postal ou le pays de résidence signalé dans leur dossier médical et cette information a été croisée avec l'histoire de la maladie de chaque patient pour déterminer si un voyage récent avait été réalisé à l'étranger ou à Mayotte. La France métropolitaine n'était pas considérée comme un voyage à l'étranger. Un lien avec l'étranger était défini comme une résidence, un voyage ou une hospitalisation dans un pays étranger ou Mayotte dans l'année précédant le 1^{er} jour d'hospitalisation à La Réunion. Cette définition incluait ainsi les patients ayant bénéficié d'une EVASAN vers le CHU de La Réunion. Cette définition était légèrement plus étendue que celle des patients cibles suspectés d'être porteurs de BHRé du HCSP de 2013 (68). Enfin, un patient était considéré comme exposé à un antibiotique s'il avait reçu au moins une dose d'antibiotique dans les 3 mois précédant la détection de l'EPC.

2.2 Design des études

2.2.1 Étude ECOH-RUN

Dans le cadre de l'étude ECOH-RUN (*Escherichia coli One Health* à La Réunion), nous avons tenté d'établir une collection de *E. coli* BLSE représentative de 3 compartiments : l'Homme, les animaux de rente et les eaux usées sur la période 2015-2018. Le recueil des échantillons a été réalisé de manière prospective durant cette période.

Pour le compartiment humain, nous nous sommes appuyés sur un réseau multicentrique de laboratoires composé de 2 groupements de laboratoires privés (qui sont les 2 principaux groupements sur les 3 présents à La Réunion) et 4 laboratoires hospitaliers (2 sites du CHU, CHOR et GHER). Le laboratoire du CHU Nord de Saint-Denis était le laboratoire coordonnateur de ce réseau et centralisait l'ensemble des isolats pour la vérification des critères d'inclusion et les analyses complémentaires. Ces 4 laboratoires hospitaliers représentent un total de 2500 lits et environ 250 000 admissions par an. Ce réseau de laboratoires est évalué à >90% des jours d'hospitalisations complètes à La Réunion et 100% des lits d'hospitalisation MCO. Les données démographiques et cliniques des patients ont été recherchées dans leurs dossiers médicaux.

Pour le compartiment animal, les campagnes de prélèvements chez les animaux de rente ont été coordonnées par le CIRAD Réunion sous l'égide du Dr E. CARDINALE et transmises au laboratoire coordonnateur pour détection des isolats de *E. coli* BLSE. Il est important de préciser que ces animaux sont consommés sur place à La Réunion (besoins de la population supérieurs à la production) et peuvent ainsi être considérés comme l'une des origines des viandes de la filière alimentaire à La Réunion (336).

Concernant les eaux usées, nous nous sommes intéressés à 2 biotopes différents à savoir un milieu urbain (commune de Saint-Denis) et un milieu rural (commune de Grand Ilet dans le cirque de Salazie) (Figures 50 et 51). Ces 2 environnements ont été sélectionnés pour leur représentativité en termes d'effluents d'origine humaine et animale sur l'île. Saint-Denis est en effet la plus grande agglomération de l'île et bénéficie d'un réseau d'eaux usées bien cloisonné et cartographié aboutissant à la station d'épuration (STEP) du Grand-Prado à l'Est de Saint-Denis. Cette STEP est très récente (2013) et munie d'une rampe à UV au niveau de ses effluents de sortie.

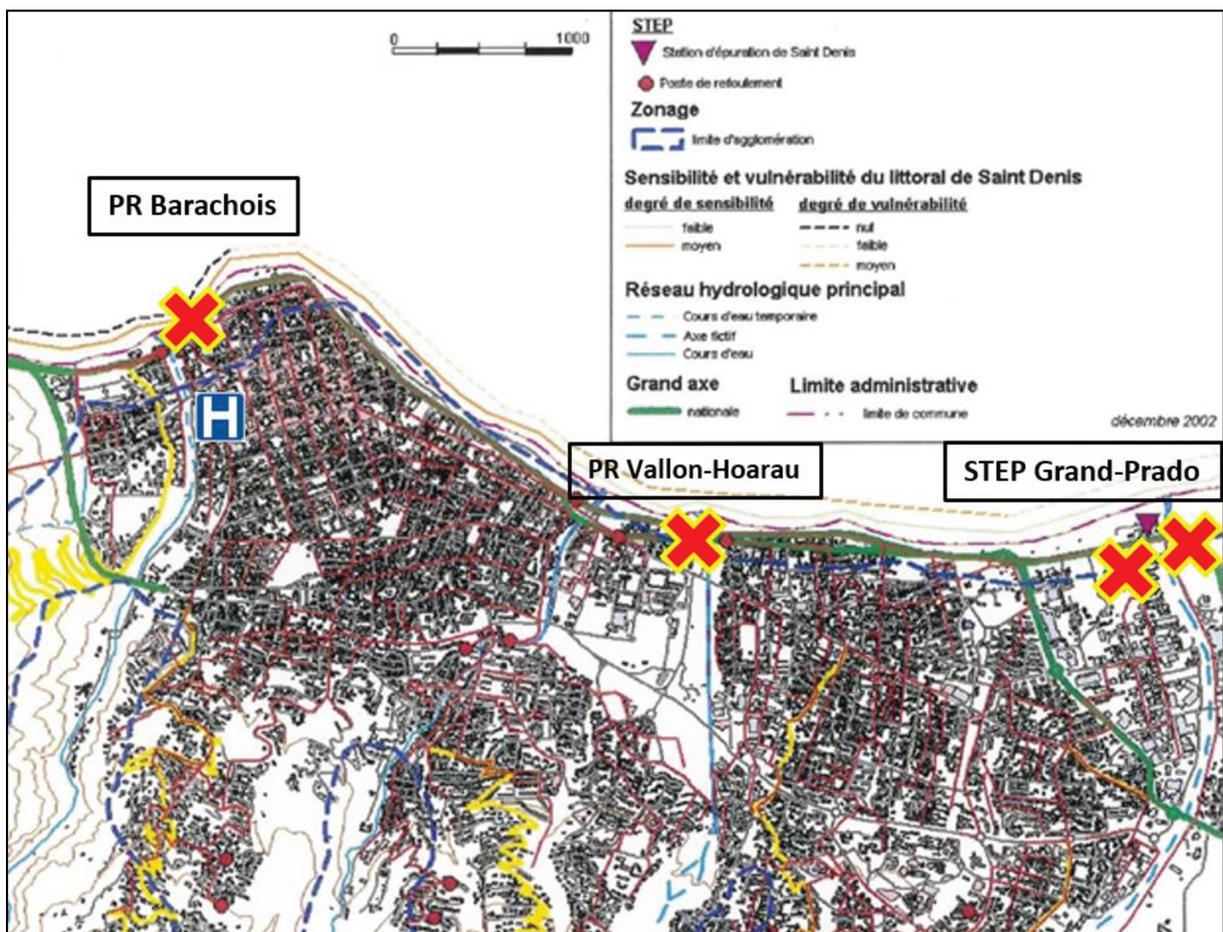


Figure 50. Schéma départemental d'assainissement de la ville de Saint-Denis avec localisation des 4 points de prélèvements de l'étude ECOH-RUN.

PR : point de refoulement ; STEP : station d'épuration ; le symbole H en bleu symbolise l'emplacement du site Nord du CHU de La Réunion.

Grand Ilet est situé dans le cirque de Salazie où l'élevage est le plus développé et concentré tout en disposant de l'unique station de traitement des effluents animaux de l'île (Figure 51).



Figure 51. Photographie illustrant la station de traitement des effluents d'élevage de Camp-Pierrot à Grand Ilet.

La station est composée de 3 bassins de traitements et d'une lagune en contre-bas. Les excréments issus des exploitations de volailles et de porcs du cirque sont déposés dans le 1^{er} bassin. Les produits solides obtenus par décantation et centrifugation sont transformés en composte après plusieurs cycles d'assèchement et de montée en température. Les résidus liquides de surface sont évacués pour filtration naturelle dans la lagune puis épandus sur une surface de 7 hectares autour de la station.

Enfin, afin d'avoir une population bactérienne la plus représentative des populations de *E. coli* « autochtones » circulant sur l'île, tout isolat suspecté d'être d'origine externe à l'île a été exclu à savoir les animaux d'importation, et tout patient issu d'une EVASAN ou ayant voyagé à l'étranger ou à Mayotte dans les 12 derniers mois précédant son prélèvement positif à *E. coli* BLSE.

2.2.2 Étude sur l'épidémiologie des EPC à La Réunion

Cette étude rétrospective a consisté à rechercher l'ensemble des isolats d'EPC détectés à la Réunion depuis 2010 en se basant sur le même réseau de 6 laboratoires. Les informations ont été extraites des SIL des laboratoires et recoupées avec les informations de signalement relevées par le CPIAS (anciennement ARLIN, et coordonné par la Fédération de Lutte contre les Infections Nosocomiales de la Réunion ou FELIN). Dans ce système de surveillance, tous les patients ayant voyagé dans l'année précédente ou provenant de l'étranger ou de Mayotte sont systématiquement dépistés par écouvillonnage rectal dans les 24h suivant leur admission dans un établissement de santé (hôpitaux publics et cliniques privées). Les patients sont placés en isolement précautions complémentaires contact jusqu'à l'obtention de leur résultat négatif pour une BMR ou une BHRé. Enfin, les données démographiques et cliniques des patients ont été recherchées dans leurs dossiers médicaux.

2.2.3 Étude sur l'épidémie d'*Enterobacter cloacae* IMI-1 à Mayotte

À partir du mois d'octobre 2015, plusieurs isolats de *E. cloacae* résistants à l'imipénème ont été détectés aux CHU de la Réunion chez des patients transférés du Centre Hospitalier de Mayotte. Ces *E. cloacae* avaient un profil de résistance aux antibiotiques non connu sur l'île à l'époque, c'est-à-dire qu'ils étaient résistants à l'imipénème, l'ertapénème et le méropénème tout en demeurant sensibles aux C3G, C4G et à l'association pipéracilline-tazobactam (Figure 52). Une carbapénémase de type IMI ou NmCA a ainsi été suspectée et confirmée après envoi des souches au CNR de Bicêtre (102). Les biologistes du CHM ont secondairement été sensibilisés à cet antibiotype atypique et d'autres souches ont ensuite été retrouvées à la fois rétrospectivement chez des patients du CHM et par la suite chez d'autres patients hospitalisés au CHM ou au CHU de La Réunion. Ces souches sont d'autant plus difficiles à détecter sur les dépistages rectaux que, quand celles-ci ne produisent que la carbapénémase IMI-1 sans association avec une céphalosporinase de haut niveau ou une BLSE, elles ne poussent pas sur gélose ChromID ESBL (sensibilité aux C3G) mais uniquement sur gélose ChromID CARBA SMART

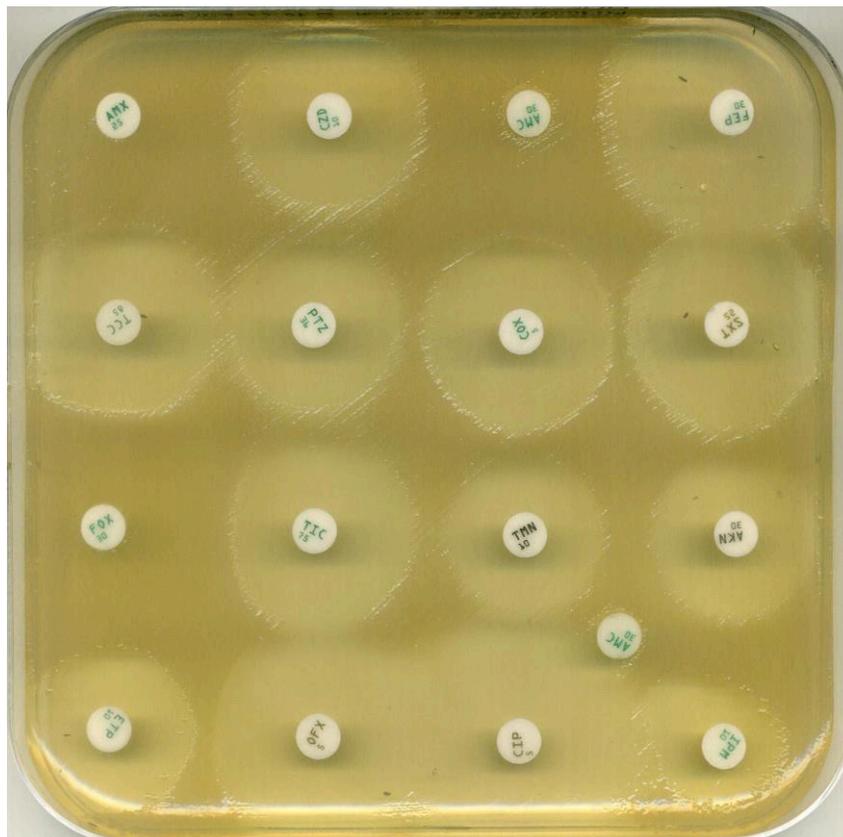


Figure 52. Antibiotype d'un isolat de *E. cloacae* producteur de la carbapénémase IMI-1 (sans mécanisme de type BLSE ou céphalosporinase de haut niveau associé).

On note la résistance « isolée » à l'imipénème et l'ertapénème, avec une légère synergie visible avec l'acide clavulanique orientant vers une carbapénémase de classe A.

(bioMérieux). En octobre 2015, le CHM ne dépistait les BMR qu'avec des géloses de type ChromID ESBL, les géloses ChromID CARBA SMART n'ont été utilisées qu'à compter de juin 2015. Ces souches de *E. cloacae* IMI-1 ont ainsi pu être sous-détectées avant cette période.

Cette étude a consisté à collecter l'ensemble des isolats de *E. cloacae* suspectés de produire une carbapénémase de type IMI entre octobre 2015 et janvier 2017 au CHM et au CHU de La Réunion afin d'investiguer cette potentielle épidémie. Cette étude avait pour objectif d'évaluer la clonalité entre les souches productrices d'IMI détectées et de déterminer le support génétique de cette résistance aux carbapénèmes. De plus, les informations démographiques et cliniques des patients colonisés ont été recueillies, à l'aide d'un questionnaire afin de déterminer l'origine et la dynamique de cette potentielle épidémie (Questionnaire en Annexe 3).

2.3 Méthodologie d'échantillonnage et sélection des isolats

2.3.1 Prélèvements d'origine humaine

Les souches d'EBLSE et d'EPC étaient issues de 2 types de prélèvements : soit des prélèvements à visée diagnostique, soit des dépistages de colonisation digestive réalisés par écouvillonnage rectal (ou sur selles) dans l'ensemble des 6 laboratoires du réseau de surveillance. Concernant les prélèvements de dépistage, ceux-ci étaient ensemencés sur des géloses sélectives de type ChromID-ESBL ou ChromID-CARBA SMART (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) pour respectivement rechercher les EBLSE ou les EPC. Les géloses étaient incubées à 35+/-2°C pendant 18-24h selon les recommandations du fournisseur.

2.3.2 Prélèvements d'origine animale

L'échantillonnage dans les différents secteurs d'élevage a été déterminé selon le nombre d'exploitations sur l'île et la prévalence de BLSE détectée lors d'une étude préliminaire pour obtenir une collection représentative des élevages de bétail, de petits ruminants, de porcs, de poulets et de lapins de La Réunion. La méthodologie d'échantillonnage était différente selon le type d'animal. Pour les bovins, les dépistages étaient réalisés par écouvillonnage rectal et suivi du même protocole que pour les prélèvements humains. Pour les autres secteurs d'élevage, les excréments ont été récoltés au sol à l'aide de pédichiffonnettes Sterisox® (Sodibox, Nevez, France). Le nombre d'échantillons par

exploitation dépendait de la surface totale au sol (1 pour 100 m²). Tous les secteurs d'une exploitation étaient prélevés (par exemple différents secteurs de porcins destinés à la charcuterie, à l'engraissement, truies gestantes ou maternité) dans la limite de 6 échantillons par ferme. Les prélèvements ainsi obtenus étaient maintenus à 4°C, acheminés au CHU Félix Guyon et analysés dans les 48h après réception. Les pédichiffonnettes Sterisox® étaient ensuite introduites dans un récipient stérile avec 100 ml d'eau physiologique enrichie en bouillon cerveau-cœur (BHI-T, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Le mélange était incubé pendant une nuit à température ambiante. Dix µL de la suspension enrichie étaient ensuite étalés sur gélose chromogène sélective ChromID-ESBL (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) et incubés à 35±2°C pendant 18-24h selon les recommandations du fournisseur.

2.3.3 Prélèvements d'origine environnementale

Les prélèvements d'eaux usées de l'étude ECOH-RUN ont été réalisés pendant l'année 2018 dans les secteurs urbain (Saint-Denis) et rural (Grand-Ilet). Dans le secteur urbain, les prélèvements ont été réalisés mensuellement au niveau de 3 sites : 2 points de refoulement d'eaux usées correspondant à des effluents d'origine hospitalière (Barachois) et communautaire (Vallon-Hoarau) (cf. Figure 50). Le 3^{ème} site de prélèvement du secteur urbain était la STEP du Grand-Prado où les effluents d'entrée et de sortie ont été prélevés. Concernant le secteur rural, 1 site de prélèvement mensuel a concerné la station de traitement des effluents animaux de Camp-Pierrot. Pour cela, 2 points de prélèvements avaient été définis à savoir les effluents de sortie du 3^{ème} bassin évacués vers la lagune et un regard correspondant aux eaux de ruissellement de la station (cf. Figure 51). Pour les eaux étiquetées « sales », les échantillons étaient traités par dilution : 100 µL d'une dilution au 1/10 et d'une dilution au 1/100 ont été étalés sur géloses sélectives ChromID-ESBL et ChromID-CARBA SMART (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Pour les eaux étiquetées « propres » de sortie de STEP ou de ruissellement, les prélèvements (250 mL) étaient traités par filtration sur des membranes de type Microfil V (Millipore, Molsheim, France) de 0,45 µm. Les membranes étaient ensuite déposées sur géloses ChromID BLSE et ChromID-CARBA SMART (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) puis incubées à 35 ± 2°C pendant 18 à 24h selon les recommandations du fournisseur. Les colonies roses à violet obtenues sur ces géloses ont ensuite été réisolées pour identification. Ces analyses ont également permis un dénombrement des *E. coli* BLSE (en UFC/100 mL) dans ces prélèvements. Les colonies colorées poussant sur gélose ChromID-CARBA SMART suspectées d'être des EPC ont également été identifiées en vue d'études ultérieures. Chaque prélèvement d'eaux a fait l'objet d'une double biothèque de 5mL à -80°C. Enfin,

chaque prélèvement d'effluent (250 mL) était en parallèle acheminé au laboratoire départemental d'analyses des eaux de Saint-Denis pour dénombrement des *E. coli* totaux (microplaques MUG/EC, Biokar diagnostics, Beauvais, France).

Concernant les prélèvements environnementaux dans le milieu hospitalier (étude 3), 150 mL d'eau (robinet, douche, toilettes si présent) étaient filtrés sur membranes de type Microfil V (0,45 µm) et placés sur milieu Drigalski (contenant de l'imipénème). Les siphons et surfaces des chambres ont été prélevés par écouvillonnage et secondairement étalés sur gélose ChromID-CARBA SMART.

2.4 Identification bactérienne et tests de sensibilité aux antibiotiques

Les bactéries ont été identifiées (identification initiale ou vérification des isolats envoyés par les laboratoires partenaires) par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Bruker daltonics, Brême, Allemagne). Elles ont ensuite été congelées à -80°C sur cryobilles (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) dans différentes collections en fonction du compartiment d'origine et de leur mécanisme de résistance (EBLSE ou EPC).

La présence d'une BLSE était confirmée phénotypiquement par un différentiel ≥ 5 mm par la méthode des disques combinés selon les recommandations du CA-SFM (3 couples de disques d'antibiotiques de Céfotaxime 30 µg, Ceftazidime 30 µg et Céfépime 30 µg, avec et sans acide clavulanique 10µg). L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par diffusion en milieu gélosé selon des panels standardisés (disques I2a ou Biorad) pour chacune des 3 études selon les recommandations du CA-SFM. Les CMI ont été déterminées par bandelettes E-test (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) à l'exception de la colistine. Les CMI à la colistine ont été déterminées par dilution en milieu liquide à l'aide des kits UMIC (Biocentric, Bandol, France) ou Sensititre FRAM1GN (Thermofisher scientific, TREK Diagnostic Systems, East Grinstead, Royaume-Uni) selon les mêmes recommandations.

2.5 Identification des gènes de résistance aux bêta-lactamines par méthodes « conventionnelles »

Pour les études 2 et 3, les isolats ont été réisolés sur gélose MHE ou géloses chromogènes CPSE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) à partir des cryobilles. Les ADNs bactériens ont été extraits par la méthode du « *boiling* » à l'aide d'un thermocycleur de type C1000 *Touch* (Bio-Rad, Hercules, États-

Unis) afin de détruire la paroi bactérienne (choc thermique à 90°C pendant 10 min puis passage à 4°C pendant 10 min). Après centrifugation, 100 µL de surnageant contenant l'ADN étaient récupérés pour réaliser des PCR ciblées sur les gènes *bla*_{BLSE} ou *bla*_{CARBA}. La liste des différentes amorces utilisées pour ces PCR est détaillée dans le Tableau 7. Les produits de PCR ont ensuite été vérifiés (par migration sur gel d'agarose), purifiés (précipitation à l'éthanol) et dosés (automate Nanodrop, Thermofisher scientific, Illkirch, France). Ils ont ensuite été séquencés par séquençage de type Sanger (automate RUO Applied Biosystems 3500, Thermofisher scientific, Illkirch, France). Les séquences générées par la méthode de Sanger ont été analysées et comparées aux séquences de référence téléchargées sur NCBI à l'aide du logiciel *Geneious* (Biomatters Ltd, Auckland, Nouvelle-Zélande).

Tableau 7. Liste détaillée des amorces utilisées pour les réactions de PCR pour la détection des gènes *bla*_{BLSE} et *bla*_{CARBA}.

Amorce	Séquence (5' - 3')	Cible(s)	Taille du produit (pb)	Référence
Identification des gènes <i>bla</i> _{CARBA}				
IMI-A	ATAGCCATCCTTGTTAGCTC	<i>bla</i> _{IMI}	818	Aubron <i>et al.</i> , 2005 (104)
IMI-B	TCTGCGATTACTTTATCCTC			
IMP-A	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	<i>bla</i> _{IMP}	232	Poirel <i>et al.</i> , 2011 (337)
IMP-B	GGTTTAAAYAAAACAACCACC			
NDM-A	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	<i>bla</i> _{NDM}	621	Poirel <i>et al.</i> , 2011
NDM-B	CGGAATGGCTCATCACGATC			
OXA-48A	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	438	Poirel <i>et al.</i> , 2011
OXA-48B	CATCAAGTTCAACCCAACCG			
Identification des gènes <i>bla</i> _{BLSE}				
CTX-M1A	CTCCAGAATAAGGAATC	<i>bla</i> _{CTX-M} groupe 1	907	Bonnet <i>et al.</i> , 2001 (338)
CTX-M1B	CCGTTTCCGCTATTACAA			
CTX-M2A	TGACTCAGAGCATTSGCCGCT	<i>bla</i> _{CTX-M} groupe 2	864	Bonnet <i>et al.</i> , 2001
CTX-M2B	CGYGGGTTACGATTTTCGYGC			
CTX-M9A	TGGTGACAAAGAGARTGCAACGG	<i>bla</i> _{CTX-M} groupe 9	873	Bonnet <i>et al.</i> , 2001
CTX-M9B	ACAGCCCYTYGGCGATGATTCT			
OS-5	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	<i>bla</i> _{SHV}	785	Cao <i>et al.</i> , 2002 (339)
OS-6	GATTTGCTGATTTGCTCGG			
TEM-A	ATAAAATTCTGAAGAC	<i>bla</i> _{TEM}	1076	Mabilat <i>et al.</i> , 1990 (340)
TEM-B	TTACCAATGCTTAATCA			

Pour la détection des gènes *bla*_{CARBA} dans l'étude 2, un screening initial avait été réalisé à La Réunion à l'aide de l'automate GenXpert (Xpert Carba-R, Cepheid, Sunnyvale, Etats-Unis) avant envoi des souches à Besançon (cryobilles à -20°C). Pour l'étude 3, plusieurs isolats d'intérêt de *E. cloacae* IMI-1 avaient secondairement été séquencés sur automate Illumina Miseq (*reads paired-end* de 150 pb) au CNR de la Résistance aux Antibiotiques de Bicêtre pour identification plus précise du résistome.

2.6 Typage bactérien par méthodes « conventionnelles »

Dans les études 2 et 3, nous avons réalisé un typage bactérien par *Multi-locus sequence typing* (MLST) et électrophorèse en champ pulsé (ECP ou PFGE en anglais).

2.6.1 *Multi locus sequence typing*

Pour le typage par MLST, les ADN bactériens ont été extraits et amplifiés selon un protocole de PCR analogue à celui de détection des gènes *bla*_{BLSE} et *bla*_{CARBA} (*cf. infra*). Les amorces utilisées pour l'amplification des 7 gènes de ménage pour *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* et *C. freundii* sont détaillées dans le Tableau 8. Les produits de PCR ont ensuite été vérifiés, purifiés, dosés et séquencés (Sanger) selon le même protocole que pour l'identification des gènes de résistance. Les séquence types (ST) ont été attribués selon la base de données Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) pour *E. coli* et selon la nomenclature de l'Institut Pasteur (<http://bigsd.b.pasteur.fr/>) ou la base de données PubMLST (<https://pubmlst.org/>) pour les autres espèces.

2.6.2 Électrophorèse en champ pulsé

Les isolats d'ECP ont été génotypés par électrophorèse en champ pulsé après digestion par l'enzyme *Xba*I (Roche diagnostics, Mannheim, Allemagne) selon la technique développée au laboratoire d'Hygiène hospitalière de Besançon par Talon *et al.* (341). Le protocole de l'ECP est détaillé en Annexe 4. Le logiciel *Bionumerics* (Applied Maths, Kortrijk, Belgique) a ensuite créé une matrice de similitude d'ADN basée sur le calcul du profil de Pearson pour la comparaison des isolats paires par paires. Le dendrogramme a été construit en utilisant l'algorithme hiérarchique UPGMA (*Unweighted*

Tableau 8. Liste détaillée des amorces utilisées pour le typage MLST des différentes entérobactéries.

Amorce	Séquence (5' - 3')	Cible(s)	Taille du produit (pb)	Référence
MLST <i>E. coli</i>				
adk-P1	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	<i>adk</i>	583	Wirth <i>et al.</i> , 2006 (342)
adk-P2	CCGTCAACTTTTCGCGTATTT			
fumC-P1	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	<i>fumC</i>	806	Wirth <i>et al.</i> , 2006
fumC-P2	GTACGCAGCGAAAAAGATTC			
gyrB-P1	TCGGCGACACGGATGACGGC	<i>gyrB</i>	911	Wirth <i>et al.</i> , 2006
gyrB-P2	ATCAGGCCTTCACGCGCATC			
icd-P1	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACACA	<i>icd</i>	878	Wirth <i>et al.</i> , 2006
icd-P2	GGACGCAGCAGGATCTGTT			
mdh-P1	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG	<i>mdh</i>	932	Wirth <i>et al.</i> , 2006
mdh-P2	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT			
purA-P1	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	<i>purA</i>	816	Wirth <i>et al.</i> , 2006
purA-P2	CATACGGTAAGCCACGCAGA			
recA-P1	CGCATTGCTTTACCTGACC	<i>recA</i>	780	Wirth <i>et al.</i> , 2006
recA-P2	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA			
MLST <i>K. pneumoniae</i>				
rpoB-F-Vic3	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	<i>rpoB</i>	501	Diancourt <i>et al.</i> , 2005 (343)
rpoB-R-Vic2	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC			
gapA-F-173	TGAAATATGACTCCAACCTCACGG	<i>gapA</i>	450	Diancourt <i>et al.</i> , 2005
gapA R-181	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT			
mdh-F-130	CCCAACTCGTTCAGGTTTCAG	<i>mdh</i>	477	Diancourt <i>et al.</i> , 2005
mdh-R-867	CCGTTTTTCCCAGCAGCAG			
pgi-F-1R	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	<i>pgi</i>	432	Diancourt <i>et al.</i> , 2005
pgi-R-1F	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT			
phoE-F-604.1	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	<i>phoE</i>	420	Diancourt <i>et al.</i> , 2005
phoE-R-604.2	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT			
InfB-1F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	<i>infB</i>	318	Diancourt <i>et al.</i> , 2005
InfB-1R	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC			

2ème PARTIE : TRAVAIL SCIENTIFIQUE

tonB-1F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT			
tonB-2R	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	<i>tonB</i>	414	Diancourt <i>et al.</i> , 2005
MLST <i>E. cloacae</i>				
dnaA-f2	AYAACCCGCTGTTCTBTATGGCGGCAC	<i>dnaA</i>	1151	Miyoshi-Akiyama <i>et al.</i> , 2013 (344)
dnaA-r	KGCCAGCGCCATCGCCATCTGACGCGG			
fusA-f2	TCGCGTTCGTTAACAAAATGGACCGTAT	<i>fusA</i>	906	Miyoshi-Akiyama <i>et al.</i> , 2013
fusA-r2	TCGCCAGACGGCCAGAGCCAGACCCAT			
gyrB-f	TCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAA	<i>gyrB</i>	1153	Miyoshi-Akiyama <i>et al.</i> , 2013
gyrB-r	GCAGAACCGCCCGCGGAGTCCCCTTCCA			
leuS-f2	GATCARCTSCCGGTKATCCTGCCGAAG	<i>leuS</i>	845	Miyoshi-Akiyama <i>et al.</i> , 2013
leuS-r	ATAGCCGCAATTGCGGTATTGAAGGTCT			
pyrG-f	AYCCBGAYGTBATTGCRCAYMAGGCGAT	<i>pyrG</i>	535	Miyoshi-Akiyama <i>et al.</i> , 2013
pyrG-r	GCRGRATYTCVCCCTSHTCGTCCCAGC			
rplB-f	GTAACCGACATCTCCGGGTCGTGCCA	<i>rplB</i>	746	Miyoshi-Akiyama <i>et al.</i> , 2013
rplB-r	ACCTTTGGTCTGAACGCCACGGAGTT			
rpoB-f	CCGAACCGTTCGCGAACATCGCGCTGG	<i>rpoB</i>	944	Miyoshi-Akiyama <i>et al.</i> , 2013
rpoB-r2	CCAGCAGATCCAGGCTCAGTCCATGTT			
MLST <i>C. freundii</i>				
aspC-f	GTTTCGTGCCGATGAACGTC	<i>aspC</i>	513	Lacher <i>et al.</i> , 2007 (345)
aspC-r	AAACCCTGGTAAGCGAAGTC			
clpX-f	CTGGCGGTGCGGTATACAA	<i>clpX</i>	567	Lacher <i>et al.</i> , 2007
clpX-r	GACAACCGGCAGACGACCAA			
fadD-f	GCTGCCGCTGTATCACATTT	<i>fadD</i>	483	Lacher <i>et al.</i> , 2007
fadD-r	GCGCAGGAATCCTTCTTCAT			
mdh-f	GTCGATCTGAGCCATATCCCTAC	<i>mdh</i>	549	Lacher <i>et al.</i> , 2007
mdh-r	TACTGACCGTCGCCTTCAAC			
arcA-f	GACAGATGGCGCGGAAATGC	<i>arcA</i>	435	Lacher <i>et al.</i> , 2007
arcA-r	TCCGGCGTAGATTCGAAATG			
dnaG-f	ACCGCCGATCACATACT	<i>dnaG</i>	444	Lacher <i>et al.</i> , 2007
dnaG-r	TGCACCAGCAACCCTATAAG			
lysP-f	GCTACGTCGTGAACTGAAGG	<i>lysP</i>	477	Lacher <i>et al.</i> , 2007
lysP-r	TGTCCCCTGGAAGGAGAAGC			

Pair Group Method with Arithmetic mean). Les pulsotypes ont été définis conformément aux recommandations internationales définies par Tenover *et al.* (346).

2.7 Whole genome sequencing et analyse bio-informatique

2.7.1 Séquençages

Deux types de séquençages ont été réalisés au cours des études. Un séquençage « *short reads* » Illumina par l'entreprise Microsynth en Suisse (étude ECOH-RUN) ou au CHU de Bicêtre (étude 3). Un séquençage « *long reads* » de type PacBio (*Pacific Biosciences*) à Microsynth pour l'étude ECOH-RUN.

Concernant le séquençage Illumina, la préparation des librairies a été effectuée dans les 2 cas avec le kit *Nextera XT DNA Library Preparation Kit* (Illumina, San Diego, Etats-Unis). Les isolats ont ensuite été séquencés intégralement sur une plateforme Illumina NextSeq (Microsynth) ou Illumina MiSeq 2000 (Bicêtre), générant dans les deux cas des *reads paired-end* de 150 pb.

Concernant le séquençage PacBio, la préparation des librairies a été effectuée à l'aide du kit *PacBio library 10k* (Pacific Biosciences, Menlo Park, Etats-Unis). Les isolats d'intérêt ont été ensuite séquencés intégralement sur une plateforme de type PacBio Sequel system (SMRT cell v.2.1 chemistry).

2.7.2 Résistome

Pour l'étude ECOH-RUN, les ADN bactériens ont été extraits à l'aide du kit *QIAamp DNA Minikit* (QIAGEN, Hilden, Allemagne). Les extraits obtenus ont été dosés puis envoyés à l'entreprise Microsynth pour séquençage « *short reads* » de type Illumina. Sur certaines souches d'intérêt, un séquençage « *long reads* » de type PacBio a été réalisé.

L'identification des gènes de résistance chromosomiques ou acquis a été effectuée à l'aide du logiciel *BLAT* (*BLAST-Like Alignment Tool* ; <https://genome.cshlp.org/content/12/4/656>) en utilisant la base de données ResFinder. Les gènes ont été filtrés avec un minimum de 90% d'identité et 80% de couverture (347,348). Pour l'étude 3, le génome a été annoté manuellement à l'aide du logiciel *Geneious* (Biomatters Ltd, Auckland, Nouvelle-Zélande) et de la plateforme BLAST pour les séquences de référence des gènes et des protéines (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.7.3 Phylogénie

Le *trimming* des *reads* a été réalisé avec *sickle* (<https://github.com/najoshi/sickle>) selon une longueur minimale de 50 pb, puis un sous-échantillonnage avec une couverture d'au moins 80X. L'assemblage *de novo* a été réalisé avec *Spades* (349). Les *contigs* d'assemblage ont été filtrés avec un minimum de 300 pb et une couverture 3X.

Le phylogroupage et le typage *fimH* ont été attribués avec *ClermonTyping* et *FimTyper*, respectivement (350,351). Les STs des isolats ont été déterminés par MLST *in silico* avec *pyMLST* (<https://github.com/bvalot/pyMLST>) en utilisant les schémas Enterobase et Achtman (https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst_mlst_seqdef&page=schemeInfo&scheme_id=4).

L'analyse *cgMLST* a été réalisée par le logiciel *pyMLST* en utilisant le schéma Enterobase. L'analyse phylogénétique a été réalisée avec *bioNJ* sur la base des distances *cgMLST* et visualisée à l'aide de l'outil iTOL (352). Les souches clonales ont été déterminées à partir de distance *cgMLST* maximale de 10 allèles (353). Un réseau de clonalité a été construit à l'aide du logiciel *igraph* pour déterminer les connexions entre les différents lieux d'échantillonnage.

La similarité des éléments génétiques mobiles entre les souches a été évaluée par une méthode dérivée de Ludden *et al.* (287). Brièvement, les *contigs* ont été assignés comme potentiellement plasmidiques ou chromosomiques en utilisant *mplasmides* avec un seuil de 0,6 et 0,7 ; respectivement (354). Les isolats contenant une bêta-lactamase non assignée comme chromosomique ont été sélectionnés, et les gènes ont été détectés en utilisant *prodigal* à partir de *contigs* déterminés comme plasmidiques. Ensuite, les gènes ont été regroupés avec *cd-hit* à 98 % d'identité. La présence/absence de gènes mobiles entre les souches a été utilisée pour construire un dendrogramme avec *bioNJ* en utilisant une distance binaire.

2.7.4 Plasmidome

L'analyse des plasmides dans l'étude ECOH-RUN a été réalisée à partir des données du séquençage PacBio de 6 isolats d'intérêt porteur des gènes *bla*_{CTX-M-1} et *bla*_{CTX-M-15}. Les données ont ensuite été directement assemblées avec *flye* (355). Les plasmides ont été extraits et nettoyés à l'aide de *pilon* (356). Les gènes de résistance ont été recherchés avec la base de données Resfinder de la même manière que pour l'assemblage Illumina. Les *reads* Illumina des isolats CTX-M-1/15 ont ensuite été mappés avec les assemblages plasmidiques complets réalisés

2.8 Analyses statistiques

Dans l'étude ECOH-RUN, un test de Chi² a été réalisé pour comparer les pourcentages de résistance aux antibiotiques entre les différents compartiments. De plus, un test des rangs signés de Wilcoxon (données appariées) ou un test U de Mann-Whitney ont été utilisés pour comparer les rejets de *E. coli* BLSE dans les différents effluents. Dans l'étude 2, une régression de Poisson a été utilisée pour évaluer l'augmentation des cas d'EPC à La Réunion entre 2011 et 2016. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

2.9 Collaborations et financements

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du Dr P. MAVINGUI (Directeur de l'UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical de La Réunion) et la co-direction du Pr X. BERTRAND (UMR Chrono-Environnement de Besançon). Les travaux ont été principalement effectués dans le laboratoire de Microbiologie du CHU de La Réunion (Dr. M.C. JAFFAR-BANDJEE et Dr. O. BELMONTE). En collaboration avec le Pr D. HOCQUET, j'ai pu réaliser un stage de 6 semaines à Besançon en 2019 pour parfaire mes connaissances en bio-informatique et préparer les collections pour le séquençage. Les prélèvements à La Réunion ont pu être réalisés dans le compartiment animal grâce à notre collaboration de longue date établie avec le CIRAD (Dr E. CARDINALE). J'ai pu réaliser les prélèvements environnementaux grâce à des partenariats établis avec la CISE Réunion (M. O. PINCE), responsable de la collecte et du traitement des eaux usées à Saint-Denis et la station d'épuration du Grand-Prado (M. L. LAI KAN THON) gérée par le groupe Runéo (filiale du groupe Véolia). Enfin, le dénombrement des *E. coli* totaux dans les effluents urbains et ruraux a été réalisé au Laboratoire départemental d'analyses des eaux de Saint-Denis (M. D. LIOT, Mme S. ROBERT). L'analyse des données de surveillance du réseau de laboratoires privés et publics de l'île a été réalisée grâce à notre collaboration avec le CPIAS Réunion-Mayotte (Dr C. AVRIL) et la FELIN (Dr N. LUGAGNE-DELPON). Les souches humaines de *E. coli* BLSE ont pu être collectées pour l'étude ECOH-RUN grâce à notre collaboration avec les autres laboratoires d'analyses médicale de l'île à savoir ceux du CHU Sud (Dr S. PICOT, Dr N. ZEMALI), du CHOR (Dr A. LIGNEREUX), du GHER (Dr G. MASSON) et des groupements Cerballiance (Dr M. RAMIANDRISOA) et Réunilab (Dr C. BEN CIMON).

2ème PARTIE : TRAVAIL SCIENTIFIQUE

La collecte et l'analyse des prélèvements et isolats recueillis ont pu être réalisés grâce à des financements de l'ARS de la Réunion et aux fonds propres du CIRAD. Les analyses de séquençage ont été financées par l'UMR PIMIT (fonds des tutelles Université de La Réunion, CNRS, INSERM et IRD) et le CRB-filière microbiologique du CHU de Besançon.

3 Résultats

3.1 Comparaison génomique des isolats de *E. coli* multi-résistants à La Réunion dans une approche *One Health* Homme-animal-environnement

Limiter la diffusion des EBLSE pour réduire le nombre d'infections liées à ces bactéries multi-résistantes est aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique. L'espèce *E. coli* est une cible d'intérêt dans la lutte contre l'antibiorésistance puisqu'elle constitue à la fois l'espèce aérobie prédominante du microbiote bactérien du système digestif humain et le premier germe responsable d'infections communautaires et associées aux soins en France. De plus, les souches de *E. coli* multi-résistantes sont les entérobactéries les plus abondamment retrouvées dans les potentiels réservoirs animaux et environnementaux. *E. coli* constitue ainsi l'espèce la plus adaptée pour étudier les potentielles transmissions inter-compartimentales des EBLSE dans une approche *One Health* Homme-animal-environnement.

Si de nombreuses études ont tenté de répondre à la question des réservoirs de transmission de EBLSE pour l'Homme (dont certaines dans la population générale et pas seulement dans des populations ciblées à risques), celles-ci ont abouti à des résultats hétérogènes. La question de la part relative de chaque réservoir reste aujourd'hui débattue. Au final, peu d'études ont associées à la fois forte puissance (avec des populations bactériennes équilibrées entre les 3 compartiments), fort pouvoir discriminant dans l'analyse (WGS) et aire géographique à la fois significative et délimitée. La Réunion est à la fois une zone fortement touchée par l'antibiorésistance (avec des prévalences de EBLSE supérieures à la métropole dans les compartiments humains et animaux) et un territoire insulaire bien délimité. Elle constitue ainsi un modèle d'étude idéal pour tenter de répondre à cette question.

L'objectif de cette étude était de préciser la contribution de chaque compartiment dans la transmission des isolats de *E. coli* BLSE à l'Homme sur le territoire réunionnais, en réalisant une comparaison génomique approfondie des diverses populations bactériennes identifiées.

Phylogenomic analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* on Reunion Island reveals partitioning between humans and livestock

Guillaume Miltgen¹⁻², Daniel Martak³⁻⁴, Benoit Valot⁴, Laure Kamus¹, Thomas Garrigos¹, Guillaume Verchère², Houssein Gbaguidi-Haore³, Céline Ben Cimon⁵, Mahery Ramiandrisoa⁶, Sandrine Picot⁷, Anne Lignereux⁸, Geoffrey Masson⁹, Marie-Christine Jaffar-Bandjee¹, Olivier Belmonte¹, Eric Cardinale¹⁰⁻¹¹, Didier Hocquet³⁻⁴, Patrick Mavingui² and Xavier Bertrand³⁻⁴.

¹Laboratoire de Bactériologie, CHU Félix Guyon, Saint-Denis, La Réunion, France.

²UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, Université de La Réunion, Sainte-Clotilde, La Réunion, France.

³Service d'Hygiène Hospitalière, CHU Besançon, France.

⁴UMR-CNRS 6249 Chrono-Environnement, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

⁵Laboratoires Réunilab, Sainte-Clotilde, La Réunion, France.

⁶Laboratoires Cerballiance, Le Port, La Réunion, France.

⁷Laboratoire de Bactériologie, Groupe Hospitalier Sud Réunion, Saint-Pierre, La Réunion, France.

⁸Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier Ouest Réunion, Saint-Paul, La Réunion, France.

⁹Laboratoire de Biologie, Groupe Hospitalier Est Réunion, Saint-Benoit, La Réunion, France.

¹⁰Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) Océan Indien (Réunion-Mayotte), Sainte-Clotilde, La Réunion, France.

¹¹UMR Animal, Santé, Territoires, Risques et Écosystèmes, INRAe 1309, Université de Montpellier, Montpellier, France.

*** Corresponding author:**

Dr Guillaume Miltgen

E-mail address: guillaume.miltgen@chu-reunion.fr; phone number: +262 2 62 90 62 66

Postal address: CHU de La Réunion, site Félix Guyon, allée des Topazes, 97400 Saint-Denis, La Réunion, France

2ème PARTIE : TRAVAIL SCIENTIFIQUE

Pr Xavier Bertrand

E-mail address: xbertrand@chu-besancon.fr ; phone number: +33 3 70 63 21 36

Postal address: Laboratoire d'Hygiène Hospitalière, CHU Jean Minjoz, 3 Boulevard Alexandre Fleming,
25000 Besançon, France

Dr Patrick Mavingui

E-mail address: patrick.mavingui@cnrs.fr ; phone number: +262 2 62 21 25 70

Postal address: Plateforme Technologique CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, La
Réunion, France

Summary

Background

Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-*Ec*) is a major cause of infections worldwide. An understanding of the reservoirs and modes of transmission of these pathogens is essential, to tackle their increasing frequency. We investigated the contributions of various compartments (humans, animals, environment), to human colonisation or infection with ESBL-*Ec* over a three-year period, on an island.

Methods

The study was performed on Reunion Island, a French overseas territory in the **Southwest** Indian Ocean. **We collected** ESBL-*Ec* isolates prospectively from humans, wastewater and livestock between April 2015 and December 2018. Human specimens were recovered from a regional surveillance system representative of the island's health facilities. These isolates were compared with those from livestock and urban/rural wastewater, by whole-genome sequencing.

Findings

We collected 410 ESBL-*Ec* isolates: 161 from humans, 161 from wastewater and 88 from animals. Phylogenomic analysis demonstrated high diversity (100 STs), with different STs predominating among isolates from humans (ST131, ST38, ST10) and animals (ST57, ST156). The large majority (90%) of the STs, including ST131, were principally associated with a single compartment. The CTX-M-15, CTX-M-27 and CTX-M-14 enzymes were most common in humans/human wastewater, whereas CTX-M-1 predominated in animals. Isolates of human and animal origin had different plasmids carrying *bla*_{CTX-M} genes, with the exception of a conserved IncI1-I *bla*_{CTX-M-1} plasmid.

Interpretation

These molecular data suggest that, despite their high level of contamination, animals are not a major source of the ESBL-*Ec* found in humans living on this densely populated high-income island. Public health policies should therefore focus primarily on human-to-human transmission, to prevent humans infections with ESBL-*Ec*.

Funding Reunion Regional Health Agency (ARS Réunion), Indian Ocean Commission (COI), French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD), UMR PIMIT, through its national institutions (Reunion University, CNRS, INSERM, IRD) and the Biological Resource Centre of Besançon.

Research in context

Evidence before this study

Infections caused by antimicrobial-resistant *E. coli* make the largest contribution to the burden of antimicrobial resistance (AMR) in Europe, in terms of both the number of cases and the number of attributable deaths, due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* (ESBL-*Ec*) in particular. ESBL-*Ec* is also frequently isolated from livestock, retail meat and the environment. ESBL-*Ec* acquisition in humans is multimodal and may result from (i) the misuse of antibiotics in humans and animals, exerting a selection pressure on bacterial populations favouring the exchange of mobile genetic elements carrying resistance genes and (ii) human factors, such as international mobility, population density, trade or environmental contamination. Humans may be exposed to ESBL-*Ec* through contact with animals, food, the environment, or another human. These potential sources of acquisition have been the object of many studies, but a PubMed search revealed that only a very small number of these studies combined the following criteria: a large bacterial population, at least three compartments studied and sufficiently discriminating subtyping methods. Moreover, these studies have generated conflicting results, and the quantitative contribution of each compartment to the acquisition of ESBL-producing *Enterobacteriales* therefore remains a matter of heated debate.

Added value of this study

This is the first study to estimate the population structure of ESBL-*Ec* in three compartments (human, animal and anthropised environment) in a circumscribed island model of a high-income country. Comparative genomics data confirmed that the ESBL-*Ec* strains of human origin matched those present in wastewater environments, which can, therefore, be considered a proxy for the human gut flora of the community. Our data indicate that, despite their high levels of contamination, animals are not a major source of ESBL-*Ec* in humans, and that the community-acquired carriage of ESBL-*Ec* is essentially attributable to human-to-human transmission.

Implications of all the available evidence

In France, the EcoAntibio 1 plan led to a 37% decrease in veterinary prescriptions of antibiotics between 2012 and 2016, resulting in a decrease in the prevalence of 3GC-non-susceptible *E. coli* in all types of animals. However, these measures will not be sufficient to limit antimicrobial resistance in the strains colonising or infecting humans. In high-income countries, public health policies must focus on preventing the human-to-human transmission of ESBL-*Ec*. The two pillars of this fight against the spread of antibiotic resistance therefore remain (i) the strengthening of individual and collective hygiene measures, in both the community and hospitals and (ii) decreasing antibiotic consumption, particularly in the community sector, which accounts for most of the human consumption of antibiotics in these countries. Finally, further studies based on national surveillance networks are required to confirm and monitor this small contribution of livestock and the food chain to human infection, through new modelling approaches based on WGS.

Introduction

Infections caused by multidrug-resistant bacteria (MDRB) are a major cause of morbidity and mortality worldwide (1). In this context, the World Health Organisation has identified seven specific pathogens in its strategy for fighting antibiotic resistance, including, first and foremost, *Escherichia coli* resistant to third-generation cephalosporins (3GC) and fluoroquinolones. The main mechanism of 3GC resistance in this species is the production of extended spectrum beta-lactamase (ESBL). *E. coli* is a leading cause of infection in hospitals and in the community (2). Learned societies have highlighted the need to address this problem holistically, and not anthropocentrically. If we are to tackle the trend towards an increase in MDRB infections in humans, we will need to use *One Health* approaches to develop an understanding of the global reservoirs and transmission patterns leading to the acquisition of ESBL-producing *Enterobacteriales* (ESBL-E) in humans (3). Several potential sources of extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* (ESBL-Ec) for human infection or colonisation have been identified, including food-producing animals, in which the prevalence of ESBL-Ec can be very high (4). ESBL-Ec can also be transmitted *via* the food chain (5). Moreover, environments contaminated with human and animal feces can also act as a source of colonisation, particularly in developing countries, which tend to have lower health standards than high-income countries (6–9). Studies based on this model addressing this question have yielded conflicting results, leaving the specific roles of these reservoirs unclear (10,11). The evaluation of exchanges of resistance vectors (genes or bacteria) between humans, animals and the environment is challenging and subject to several difficulties: (i) it involves the evaluation of a nearly closed ecosystem weakly influenced by imports from the exterior, (ii) a population representative of the ecosystem must be selected and (iii) appropriate highly discriminating phylogenetic methods based on both core and accessory genomes, including mobile genetic elements (MGE), must be used.

In this study, we aimed to clarify the contribution of livestock to human colonisation or infection with ESBL-Ec, using a delimited high-income area — the French overseas territory of Reunion Island — as a

model. We report here the phylogenomic investigation, by whole-genome sequencing (WGS), of ESBL-*Ec* isolated from humans, livestock and wastewater on Reunion Island.

Methods

Study design

Reunion Island is a French overseas territory located close to Madagascar, with a population of 850,000 inhabitants and a surface area of 2500 km² (density: 340 inhabitants/km²). Together with Mayotte, it forms the French overseas territories of the Southwest Indian Ocean Area (SIOA). Antimicrobial resistance is a major problem on this island, located at the crossroads of Southern Africa and the Indian subcontinent (12). Reunion Island has the same level of healthcare as mainland France, with the University Hospital of Reunion Island (URHI) as the referral hospital in SIOA, and the same health infrastructure (including access to drinking water, a sewerage system, modern wastewater treatment plants, etc.).

We prospectively collected ESBL-*Ec* isolates from humans, human and animal wastewater (considered a proxy for polluted human or animal environments) and livestock, between April 2015 and December 2018. All isolates suspected to have originated off the island (travel, medical evacuation, or imported animals) were excluded from the study.

Human specimens

The study was based on the regional antimicrobial resistance surveillance system of Reunion Island, which collects ESBL-*Ec* from six healthcare facilities: two private laboratory groups and four public hospitals (Figure 1). These four public hospitals consist of a university hospital located on two sites (one in the north of the island and the other in the south) and another two hospitals located in the west and east of the island, with a total of 2,500 beds and 250,000 hospital admissions per year. This network is estimated to account for >90% of complete-hospitalisation days on Reunion Island and 100% of medical, surgical, and obstetric (MSO) hospitalisations. The bacterial isolates were collected between January and December 2018. Isolates from patients who had a history of off-island travel

within the last six months, medical evacuation or a home address (postcode) located off the island were excluded. We then randomly selected three ESBL-*Ec* isolates per centre and per month for further analysis. Anonymised data were recorded for each isolate: gender, age, origin of patient (community or healthcare facility), specimen source, infection/colonisation and postcode.

Wastewater

Wastewater samples were collected from three sites in the north and one site in the centre of the island (Figure 1). The northern sites corresponded to two sewage effluent discharge points (one from a hospital and the other from the community) and one wastewater treatment plant (WWTP) in the major town of the island (separate inflow and outflow sampling). The site in the centre of the island is the only animal waste treatment plant (AWTP) on the island (runoff water and outflow into the lagoon). Each collecting point was sampled (2x500 mL) during the first week of each month, between January and December 2018. ESBL-*Ec* isolates were identified by (i) the serial dilution method for sewage and untreated inflow and (ii) the filtration method (membranes with 0.45 µm pores) for treated outflow, as previously described (13).

Animal specimens

The sampling procedure was adapted from previous studies on the prevalence of ESBL-producing *Enterobacterales*, to ensure that a collection of samples representative of all the cattle, pig, poultry, rabbit, and small ruminant (sheep and goat) farms of the island (14) was obtained. Samples were collected with Sterisox® boot swabs (Sodibox, Nevez, France) or rectal swabs (for cattle). For the boot swabs, the number of samples depended on area considered, with one Sterisox® swab per 100 m² of building. All samples were maintained at 4 °C until analysis, which took place within 48 h of sample reception. In total, 114 farms were sampled, and 566 animal samples (124 swabs from cattle; 177 pig, 176 poultry, 39 rabbit and 50 small-ruminant boot swabs) were obtained between April 2015 and December 2018. Sterisox® boot swabs were introduced into a sterile recipient with 100 mL of saline

enriched with brain-heart infusion broth (BHI-T, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The mixture was incubated overnight at room temperature, as previously described (15). We then plated 10 µL of the enriched suspension on selective chromogenic agar plates (ChromID-ESBL agar, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), in accordance with the manufacturer's recommendations (15). ESBL and global positivity rates were calculated as the fraction of farms with at least one ESBL-*Ec* positive sample, for each livestock sector and for all farms, respectively.

Collection of ESBL-producing *E. coli*

The characterisation of presumptive ESBL-*Ec* isolates took place at a single site, at the northern site of the UHRI. Each isolate was identified by MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and its ESBL production was assessed by the combined disc method, in accordance with the 2019 EUCAST recommendations. For the collection of bacteria from animals, only one ESBL-producing isolate for each different resistance profile from each farm was retained for further analysis. For the collection of bacteria from the environment, only ESBL-producing isolates with different resistance profiles from each sampling point (taken monthly) were retained for further analysis.

Whole-genome sequencing and data analysis

Bacterial DNA was extracted with the QIAamp DNA Minikit (QIAgen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Whole-genome sequencing was performed on an Illumina NextSeq high-output system generating 2x150 paired-end reads with a median coverage of 88X. Reads were trimmed with sickle (v1.33) to a minimum length of 50, and were then subsampled to a coverage of at least 80X. Assembly was performed with Spades (v3.13), and the assembled contigs were filtered to ensure a minimum read length of 300 bp and 3X coverage.

STs were determined *in silico* with pyMLST, using the Enterobase and Achtman schemes. Phylogroup and *fimH* typing were assigned with ClermonTyping and FimTyper, respectively. We searched for

resistance genes with BLAT software and the ResFinder database, filtering on a minimum of 90% identity and 80% coverage.

We performed *cgMLST* analysis with *pyMLST* software and the Enterobase v2 scheme. Phylogenetic analysis was performed with *bioNJ*, using *cgMLST* distances, and the results were visualised with *ItoI*. Isolates were clustered if their *cgMLST* differed by fewer than 10 alleles. A network was built with the *igraph* package (v1.2.5), to determine the connections between different sampling sites.

The proximity of mobile genetic elements between strains was evaluated by a method derived from that described by Ludden *et al.* (18). Briefly, *mlplasmids* (v.1.0) was used to classify contigs as potentially plasmid-borne or on the chromosome. Genes were detected with *prodigal* on contigs that were considered to be plasmid-borne and contained a *bla_{ESBL}*. These genes were then clustered with *cd-hit* (v4.7) at a threshold of 98% identity, to obtain a non-redundant list of mobile genes associated with *bla_{ESBL}*. We then search all the genomes for these mobile elements, and their presence/absence was used to build a dendrogram based on a binary distance, with *bioNJ*. Long-read sequencing was performed on the PacBio Sequel system (SMRT cell v.2.1 chemistry). The raw data generated were assembled with *flye* (v2.8.1). Plasmids were extracted and polished with *pilon* (v1.23). We searched for resistance genes with the Resfinder database, using the same method as described for the Illumina assembly. BLAST was used to align complete plasmid sequences with the assembled genomes containing *bla_{CTX-M-1}* or *bla_{CTX-M-15}*.

Role of the funding source

The funders of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

Collection

In total, we collected 410 ESBL-*Ec* isolates: 161 from humans, 161 from wastewater and 88 from animals. The mean age of the human patients was 61.1 years (SD 26.2 years) and the sex ratio was 0.96 (Table S1). Most of the isolates (80.7%) were of community origin or were detected in patients during the first 48 hours of hospitalisation. Most of the isolates were obtained from the urinary tract (59.0%) or intestine (26.1%), whereas bacteraemia and surgical site infections accounted for 6.8% and 5.0% of isolates, respectively. Infections accounted for 67.1% of cases. This bacterial collection included 15% of all the human ESBL-*Ec* isolates obtained on the island during the study period. For wastewater (Table S2), 70 isolates were obtained from community effluent ($n=29$; 18.0%) or hospital effluent ($n=41$; 25.4%). For WWTPs, 85 isolates were recovered from inflow ($n=56$; 34.8%) and outflow ($n=29$; 18.0%). For the AWTP, six isolates were retrieved from runoff water ($n=3$; 1.9%) or outflow destined for the lagoon ($n=3$, 1.9%).

We collected 88 ESBL-*Ec* from animals (Table S3): 50 from poultry, 33 from pigs, 2 from cattle, and 3 from small ruminants. No ESBL-*Ec* strains were detected in rabbits. The rate of ESBL positivity by type of farm was: 70% for poultry farms, 50% for pig farms, 18.5% for small ruminant farms and 8.3% for cattle farms. The global positivity rate per farm was 36.8%.

Comparative phylogenomics

Whole-genome sequencing was used to type and cluster the isolates. Among the 410 ESBL-*Ec*, we identified 100 different STs, 42 of which were common to at least two isolates (Figure S1). The top three STs were ST131 ($n=93$; 22.7%), ST38 ($n=39$; 9.5%) and ST10 ($n=24$; 5.9%). We then compared samples from two compartments: those of animal origin (livestock and animal wastewater) and those of human origin (clinical samples and human wastewater). Ten STs were common to these two compartments: ST10, ST38, ST48, ST58, ST88, ST117, ST155, ST162, ST361 and ST3489; however, ST10

was the only ST clustering at least five isolates in both compartments. For isolates of human origin, the top three STs were identical to those for the general population; ST131 was found exclusively in this compartment. Conversely, the predominant animal-related STs (ST57, ST156) were absent from the samples of human origin. Most STs (90%) were associated with only one compartment (Figure S1).

cgMLST analysis demonstrated a high degree of genetic diversity (Figure 2) and showed that the strains belonging to the STs common to human and animal sources, such as ST10, were not clonally related. Multiples cluster were observed (in red, Figure 2), but each corresponded to isolates handoff animal origin (*e.g.* ST57 or ST156) or of human origin (*e.g.* ST38, ST44 or ST131).

Phylogroups varied with the source, with B2/D predominating among human/human wastewater isolates (B2 was not identified in animal samples and D was identified in only one sample from poultry), whereas B1/A predominated among isolates of animal origin. Phylogroups B2 and D accounted for 40.4% and 9.9% of human isolates, and 60.2% and 14.8% of infection source isolates, respectively. The clonality network (Figure 3) revealed connections between private laboratories and public hospitals, and between these establishments and sewage/WWTPs (cluster B); whereas farms formed isolated networks or were connected to the AWTP (cluster A). Cluster A3 highlighted connections, *via* ST156 isolates, between pig and small ruminant farms, which were located in geographically remote sites in the centre, west and south of the island (symbols surrounded by a red circle; Figure 1).

Assessments of the occurrence of genetic determinants of resistance revealed that *bla*_{CTX-M-15} was the predominant *bla*_{ESBL} gene ($n=177$; 43.2%), followed by *bla*_{CTX-M-1} ($n=94$; 22.9%), *bla*_{CTX-M-27} ($n=69$; 16.8%) and *bla*_{CTX-M-14} ($n=28$; 6.8%) (Figure 4). The CTX-M-15, CTX-M-27 and CTX-M-14 enzymes were most common in humans/human wastewater, whereas CTX-M-1 predominated in ESBL-*Ec* of animal origin (Figure 4 and S2b). An analysis of ST131 isolates ($n=93$) revealed a separation into two clades: (i) a *fimH30* clade ($n=49$), comprising a C2-M-15 subclade ($n=31$) and a C1-M27 subclade ($n=16$) (Figure 2); and (ii) a *fimH41* clade ($n=37$) mostly associated with *bla*_{CTX-M-27} ($n=27$; 73%), corresponding to ancestral clade A (Figure 2). CTX-M-1 was mostly associated with the animal-related ST57, ST155, ST156 and

ST3489. The CTX-M-1 enzyme was found in only 10 (6.2%) of 161 human isolates and CTX-M-15 in only eight (9.1%) of 88 animal isolates. Screening for non-ESBL resistance genes revealed that nine isolates coproduced an acquired cephalosporinase (*bla*_{CMY}, *n*=8; *bla*_{DHA}, *n*=1) and five coproduced a carbapenemase (*bla*_{NDM-1} in 2 isolates, *bla*_{NDM-5} in 1 isolate, *bla*_{OXA-181} in 1 isolate, and both *bla*_{NDM-5} and *bla*_{OXA-232} in 1 isolate) (Fig. S2a). The carbapenemase-encoding *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-48-type} genes were detected only in isolates from human wastewater.

We investigated whether *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-15}, the two major ESBL resistance genes, were carried by the same or different MGEs, by clustering isolates containing the gene concerned on the basis of the presence/absence of mobile genes associated with the beta-lactamase. For *bla*_{CTX-M-1}, the analysis identified multiple clusters (with >98% identity), some of which contained isolates of both human and animal origins and from different STs (Figures 5 and S3). For *bla*_{CTX-M-15}, there was considerable variability between isolates, with no clustering between human and animal isolates (Figures 5 and S4). We then cross-checked this information with MGE data. Two triplets of human-animal-wastewater isolates positive for *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-15} were selected for long-read sequencing. The *bla*_{CTX-M-1}-positive human isolate contained an Inc11-I *bla*_{CTX-M-1} plasmid (109,992 bp) that was highly similar to the plasmids carrying the *bla*_{CTX-M-1} gene in the animal and wastewater isolates selected (Figure 5). This conserved Inc11-I *bla*_{CTX-M-1} plasmid was found in six human isolates and 38 animal isolates. By contrast, the *bla*_{CTX-M-15} gene in animal isolates was located on the chromosome and probably resulted from the integration of a *bla*_{CTX-M-15} IncI/Y plasmid. The region harbouring the *bla*_{CTX-M-15} gene in the human, animal and wastewater isolates was less conserved and had undergone multiple recombinations, demonstrated an absence of recent horizontal transfer (Figure 5).

Discussion

We compared 410 genomes of ESBL-*Ec* isolates from humans or human-polluted environments (*i.e.* human wastewater) with those of isolates from livestock or animal-polluted environments (*i.e.* animal wastewater) in a circumscribed island area. The main finding of this study was that the populations of these ESBL-*Ec* isolates from these two reservoirs were genetically different, generally harbouring different *bla*_{ESBL} genes carried by different genetic supports. This strongly suggests that livestock have very little effect on the acquisition of ESBL-*Ec* by humans on Reunion Island, despite all the food produced from the livestock kept on the island being consumed locally.

Phylogenomic and resistance gene analyses revealed the existence of very little connection between the human and animal compartments, which had different major STs and predominant ESBL-encoding genes. By contrast, human and human wastewater isolates were much more strongly connected, indicating that wastewater can be used as a proxy for human gut colonisation. As expected, phylogroups B2 and D were associated with most of the human infections (75.0%) (16). For the predominant ST131 clone, the high proportion of H41-M27 isolates within the ancestral clade A (already described in Thailand and Cambodia) suggests an influence of South-East Asia on the epidemiology of ESBL-*Ec* on Reunion Island (5,17). ST10 was the only top-three ST common to both compartments, but phylogenomic analysis nevertheless highlighted the presence of different subclones that appeared to be adapted to human or animal hosts (18,19). The clonality networks established between the different structures (farms or hospitals) revealed the partitioning between the human and animal compartments, each of which was connected to its own wastewater treatment circuit (Figure 3). This finding supports the hypothesis that human-to-human transmission accounts for most cases of infection or colonisation in humans. This clonality network connected previously described spatially remote care facilities and farms on the island (20). In animals, this clonal relationship between farms remained unclear and could be explained by the exchange of some animals (especially male breeding stock) between farms. The finding of separate compartments was confirmed by MGE analysis, as the animal compartment was not identified as a progenitor of MGEs for humans;

with the exception of the *bla*_{CTX-M-1} gene carried by IncI1 plasmids, which may represent a minor source of horizontal transfer between compartments (21). CTX-M-15 was the main ESBL found in humans (47.8%), whereas CTX-M-1 accounted for only 6.2% of human ESBL isolates. We can therefore estimate that less than 5% of human isolates carry antimicrobial resistance genes closely related to those found in livestock, consistent with previous findings (18).

The partitioning of ESBL-*Ec* between the human and animal compartments observed here goes against the findings of several previous studies (22,23). However, these previous studies often involved less thorough analyses or focused on sporadic transmission in specific exposed populations (farmers, in particular), and the results obtained were sometimes overturned by subsequent WGS analyses (24). By contrast, our results are consistent with two models that have recently emerged from major studies published on the subject: a *One Health* model in low-income countries, in which people are much more closely linked to their environment (5,8,25), and a *partitioned model* in high-income countries, in which the infrastructures in place probably significantly limit these interactions (18–20,26). These findings highlight the importance of the human-to-human oral-faecal route as the probable most frequent route of transmission for adapted ESBL-*Ec*, although transmission may also occur via other minority routes. This implies that improvements in community infrastructure (*e.g.* sanitation or housing) and farming practices (biosecurity and hygiene) would probably help to prevent the development of antimicrobial resistance (27). As recently pointed out by Mughini-Gras *et al.*, other models based not only on the prevalence of ESBL-producing *Enterobacterales* but also on the probability of exposure in humans, should be explored further (28).

The key strengths of our study are (i) the representativeness of the human ESBL-*Ec* isolate collection with respect to the population of strains in the community, (ii) the prospective sampling of these strains over a period of 3.5 years and (iii) the optimal geographic context of collection in a well-defined, densely populated island environment. The large collection of human isolates ($n=161$, 39.3% of all the isolates) originated mostly from the community (80.7%) and corresponded to both infections (two

thirds) and colonisations (one third). This collection was complemented by 155 urban wastewater isolates (sewage and WWTP), which can be considered a proxy for the gut flora of the population living in the community (13,19,29). The animal isolates were also highly representative, with recruitment covering all the livestock sectors present on the island. Samples were also taken from an AWTP, although few isolates were obtained from this source. A study on the island of Zanzibar (Tanzania) also highlighted the benefits of *One Health* studies of the interconnection between different compartments in a circumscribed territory (25). One potential limitation of this study is the lack of exploration of the food chain, but several studies have shown that the ESBL-*Ec* populations from livestock and the food chain are genetically similar (19,25,30,31). This pathway should nevertheless be considered as a potential source of direct transmission to humans.

ESBL-*Ec* was isolated from 36.8% of livestock farms, with particularly high rates of isolation for poultry (70.0%) and pig (50.0%) farms. These rates are higher than those for mainland France during the same period but consistent with data for other European countries, such as Germany, the Netherlands or the United Kingdom (18,32–35).

As a consequence, national and European public health policies aiming to reduce antibiotic use in livestock are likely to have only a limited and delayed impact on human infections over time (36). By contrast to the rapid decline in *mcr-1*-linked colistin resistance in China, limiting the prevalence of ESBL-*Ec* in livestock will have only a limited impact on the rate of *bla*_{ESBL} transmission for human-adapted *E. coli* clones (37). The priority should therefore be to limit the selection pressure imposed by antibiotic use in humans, to maximise the impact of measures.

This original study on the exchange of ESBL-*Ec* between compartments is the first to demonstrate a clear sectorisation of animal and human isolates on a densely populated, high-income island with a high prevalence of ESBL-*Ec* in livestock. Our findings suggest that livestock is not a major source of ESBL-*Ec* acquisition in humans, either through direct contact with animals or indirectly, *via* the food chain.

Contributors

GMi, MCJ, OB, EC, PM, DH and XB designed the study. GMi collected environmental samples and was responsible for isolate centralisation at the UHRI. GMi also wrote the manuscript. DM, HGH, LK, TG, GV participated in laboratory investigations and the storage and shipping of isolates for whole-genome sequencing. BV performed the bioinformatic analyses of whole-genome sequencing data under the supervision of DH. CBC, MR, SP, AL, GMa managed the human specimens collected from the various healthcare facilities of the regional antimicrobial resistance surveillance system. EC managed and co-ordinated the animal specimens collected. DH, PM and XB co-ordinated the study and revised the manuscript. All authors commented on the draft manuscript and contributed to the final version.

Declaration of interests

None declared.

Acknowledgements

This study is based on independent research co-ordinated by the University of Reunion Island (UMR PIMIT), the University Hospital of Reunion Island and the University of Bourgogne Franche-Comté (UMR Chrono-Environnement). This work was supported by the Reunion Regional Health Agency (ARS Réunion), the Indian Ocean Commission (COI), the French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD), the UMR PIMIT, through its national institutions (Reunion University, CNRS, INSERM, IRD), and the Biological Resource Centre of Besançon (University Hospital of Besançon). The research team would like to thank all the staff who participated in specimen collection at the hospitals, laboratory group and agencies. We warmly thank Olivier Pince, Kevin Ronceray, Serge Hoarau of the CISE Reunion and Laurent Lai-Kan-Thon, Jean-Louis Duchemann, Anthony Gardebien of Runéo for their help with environmental sampling. We would like to thank Morgan Laval, and Maël Jégo for help for animal sampling. We also thank Pablo Tortosa and Jérôme Allyn, who participated in the steering committee for this work.

References

1. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2019;**19**(1):56–66.
2. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008 Mar;**8**(3):159–66.
3. Walsh TR. A One-Health approach to antimicrobial resistance. *Nat Microbiol.* 2018;**3**(8):854–5.
4. Thanner S, Drissner D, Walsh F. Antimicrobial resistance in agriculture. *mBio.* 2016 Apr **19**;7(2):e02227-15.
5. Nadimpalli M, Vuthy Y, de Lauzanne A, Fabre L, Criscuolo A, Gouali M, *et al.* Meat and fish as sources of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, Cambodia. *Emerg Infect Dis.* 2019;**25**(1).
6. van Hoek AHAM, Dierikx C, Bosch T, Schouls L, van Duijkeren E, Visser M. Transmission of ESBL-producing *Escherichia coli* between broilers and humans on broiler farms. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Mar 1;**75**(3):543–9.
7. Leonard AFC, Zhang L, Balfour AJ, Garside R, Gaze WH. Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. *Environ Int.* 2015 Sep;**82**:92–100.
8. Purohit MR, Chandran S, Shah H, Diwan V, Tamhankar AJ, Stålsby Lundborg C. Antibiotic resistance in an Indian rural community: a ‘One-Health’ observational study on commensal coliform from Humans, animals, and water. *Int J Environ Res Public Health.* 2017 06;**14**(4).
9. Seni J, Moremi N, Matee M, van der Meer F, DeVinney R, Mshana SE, *et al.* Preliminary insights into the occurrence of similar clones of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in humans, animals and the environment in Tanzania: A systematic review and meta-analysis between 2005 and 2016. *Zoonoses Public Health.* 2018 Feb;**65**(1):1–10.
10. Lazarus B, Paterson DL, Mollinger JL, Rogers BA. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. *Clin Infect Dis.* 2015 Feb 1;**60**(3):439–52.
11. Madec J-Y, Haenni M, Nordmann P, Poirel L. Extended-spectrum β -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? *Clin Microbiol Infect.* 2017 Nov;**23**(11):826–33.
12. Miltgen G, Cholley P, Martak D, Thouverez M, Seraphin P, Leclaire A, *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* circulating in the Reunion Island, a French territory in the Southwest Indian Ocean. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020 19;**9**(1):36.
13. Bréchet C, Plantin J, Sauget M, Thouverez M, Talon D, Cholley P, *et al.* Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin Infect Dis.* 2014 Jun;**58**(12):1658–65.

14. Gay N, Belmonte O, Collard J-M, Halifa M, Issack MI, Mindjae S, *et al.* Review of Antibiotic Resistance in the Indian Ocean Commission: a human and animal health issue. *Front Public Health*. 2017;**5**:162.
15. Gay N, Lugagne N, Miltgen G, Belmonte O, Cardinale E. Reunion, a sentinel island for multidrug-resistant bacteria surveillance in South-western Indian ocean: a retrospective survey using hospitalised patients screening, 2015-2017. *BMC Public Health*. 2020 Oct 1;**20**(1):1488.
16. Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2001 Jan 1;**183**(1):78–88.
17. Runcharoen C, Raven KE, Reuter S, Kallonen T, Paksanont S, Thammachote J, *et al.* Whole genome sequencing of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from patients, farm waste and canals in Thailand. *Genome Med*. 2017 Sep 6;**9**(1):81.
18. Ludden C, Raven KE, Jamrozy D, Gouliouris T, Blane B, Coll F, *et al.* One Health genomic surveillance of *Escherichia coli* demonstrates distinct lineages and mobile genetic elements in isolates from humans versus livestock. *mBio*. 2019 22;**10**(1).
19. Day MJ, Hopkins KL, Wareham DW, Toleman MA, Elviss N, Randall L, *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and Scotland: an epidemiological surveillance and typing study. *Lancet Infect Dis*. 2019;**19**(12):1325–35.
20. Alzayn M, Findlay J, Schubert H, Mounsey O, Gould VC, Heesom KJ, *et al.* Characterization of AmpC-hyperproducing *Escherichia coli* from humans and dairy farms collected in parallel in the same geographical region. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Sep 1;**75**(9):2471–9.
21. Valcek A, Roer L, Overballe-Petersen S, Hansen F, Bortolaia V, Leekitcharoenphon P, *et al.* Inc11 ST3 and Inc11 ST7 plasmids from CTX-M-1-producing *Escherichia coli* obtained from patients with bloodstream infections are closely related to plasmids from *E. coli* of animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Aug 1;**74**(8):2171–5.
22. Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, *et al.* Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Jun;**17**(6):873–80.
23. Tansawai U, Walsh TR, Niumsup PR. Extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* among backyard poultry farms, farmers, and environments in Thailand. *Poult Sci*. 2019 Jun 1;**98**(6):2622–31.
24. de Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, *et al.* Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS Genet*. 2014 Dec 18;**10**(12):e1004776.
25. Büdel T, Kuenzli E, Campos-Madueno EI, Mohammed AH, Hassan NK, Zinsstag J, *et al.* On the island of Zanzibar people in the community are frequently colonized with the same MDR *Enterobacteriales* found in poultry and retailed chicken meat. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Sep 1;**75**(9):2432–41.
26. Börjesson S, Ny S, Egervärn M, Bergström J, Rosengren Å, Englund S, *et al.* Limited dissemination of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid-encoded AmpC-producing *Escherichia coli* from food and farm animals, Sweden. *Emerg Infect Dis*. 2016 Apr;**22**(4):634–40.

27. Collignon P, Beggs JJ, Walsh TR, Gandra S, Laxminarayan R. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *Lancet Planet Health*. 2018 Sep;**2**(9):e398–405.
28. Mughini-Gras L, Dorado-García A, van Duijkeren E, van den Bunt G, Dierikx CM, Bonten MJM, *et al*. Attributable sources of community-acquired carriage of *Escherichia coli* containing β -lactam antibiotic resistance genes: a population-based modelling study. *Lancet Planet Health*. 2019;**3**(8):e357–69.
29. Zarfel G, Galler H, Feierl G, Haas D, Kittinger C, Leitner E, *et al*. Comparison of extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection. *Environ Pollut*. 2013 Feb;**173**:192–9.
30. Dorado-García A, Smid JH, van Pelt W, Bonten MJM, Fluit AC, van den Bunt G, *et al*. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Feb 1;**73**(2):339–47.
31. Nguyen MN, Hoang HTT, Xavier BB, Lammens C, Le HT, Hoang NTB, *et al*. Prospective One Health genetic surveillance in Vietnam identifies distinct *bla*_{CTX-M}-harbouring *Escherichia coli* in food-chain and human-derived samples. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Jan 18;S1198-743X(21)00032-X
32. Hille K, Felski M, Ruddat I, Woydt J, Schmid A, Friese A, *et al*. Association of farm-related factors with characteristics profiles of extended-spectrum β -lactamase- / plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from German livestock farms. *Vet Microbiol*. 2018 Sep 1;**223**:93–9.
33. Dierikx C, van der Goot J, Fabri T, van Essen-Zandbergen A, Smith H, Mevius D. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Jan;**68**(1):60–7.
34. Blaak H, van Hoek AHAM, Hamidjaja RA, van der Plaats RQJ, Kerkhof-de Heer L, de Roda Husman AM, *et al*. Distribution, numbers, and diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the poultry farm environment. *PLoS One*. 2015;**10**(8):e0135402.
35. Bourély C, Chauvin C, Jouy É, Cazeau G, Jarrige N, Leblond A, *et al*. Comparative epidemiology of *E. coli* resistance to third-generation cephalosporins in diseased food-producing animals. *Vet Microbiol*. 2018 Sep;**223**:72–8.
36. Bourély C, Coeffic T, Caillon J, Thibaut S, Cazeau G, Jouy E, *et al*. Trends in antimicrobial resistance among *Escherichia coli* from defined infections in humans and animals. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Jun 1;**75**(6):1525–9.
37. Wang Y, Xu C, Zhang R, Chen Y, Shen Y, Hu F, *et al*. Changes in colistin resistance and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *Lancet Infect Dis*. 2020 Oct;**20**(10):1161–71.

Figure legends

Figure 1. Map of Reunion Island, showing the locations from which the ESBL-producing *E. coli*-positive samples were obtained

Top left: Map indicating the position of Reunion Island in the Southwest Indian Ocean. *Right:* Detailed map of Reunion Island showing the locations of the healthcare facilities (L: private laboratories, H: hospitals) at which the human ESBL-*Ec* isolates were obtained. The wastewater sampling sites are indicated by a teardrop shape; those in the north correspond to the sewage and wastewater treatment plant of Saint-Denis, the largest city on the island. The teardrop in the centre corresponds to the Camp Pierrot animal waste treatment plant in Grand Ilet. The animal symbols indicate the farms of the various livestock sectors. The symbols surrounded by a red circle represent farms with clonally related isolates, belonging to ST156, in common.

Figure 2. Phylogenetic tree illustrating the relationship between ESBL-producing *E. coli* isolates from humans, animals and wastewater

Neighbour-joining phylogenetic tree of 410 ESBL-*Ec* based on *cgMLST* data. Clonally related isolates are shown in red on the dendrogram. The innermost coloured ring indicates the ecological origin of the isolates, whereas the outermost ring indicates the phylogroup. The symbols located between these two rings (round, triangle) represent the beta-lactam resistance-encoding *bla*_{BLSE} genes. The main STs are represented by a specific colour on the dendrogram, as defined in the legend.

Figure 3. Clonality network representing the healthcare facilities, farms and wastewater sources at which clonally related ESBL-producing *E. coli* isolates were detected

After phylogenetic analysis, each clonally related isolate was assigned to its sampling site. Farms (F), laboratories (L), hospitals (H), wastewater from sewage (WW), wastewater treatment plant (WWTP) and the animal waste treatment plant (AWTP) are symbolised by circles, whereas clonal links are indicated by the lines connecting the symbols. The more clonal strains connecting two sites, the wider the line between the two sites.

Figure 4. Bubble graph showing the proportion of *bla*_{BLSE} resistance genes common to ESBL-producing *E. coli* from humans and animals

Each *bla*_{BLSE} resistance gene is positioned according to its prevalence in the human and animal compartments. The size of each bubble represents the number of isolates in which the gene was identified. Bubbles are coloured according to the type of ESBL enzyme: *blue* for CTX-M, *turquoise* for

SHV and *purple* for TEM enzymes. With the exception of the *bla*_{TEM} gene, bubbles are relatively close to the axes, with no bubble in a central position on the bisector.

CTX-M Oth: bubble representing the other CTX-M variants.

Figure 5. Dendrograms of mobile genetic elements identified for *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-15} genes

Strains containing *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-15} beta-lactam resistance genes were clustered according to the presence/absence of mobile genes associated with these resistance genes. The isolate name is indicated in the first column on the left, the ecological origin of the isolate in the second column, the ST in the third and then the co-resistance genes most frequently shared by the selected isolates. We chose two triplets of isolates of interest on the basis of the inclusion of strains with the same co-resistances but from different STs. The analysis of these six isolates of interest enabled us to reconstitute the plasmids carrying these genes, which are illustrated schematically at the right of the figure. The plasmids carrying the *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-15} genes are represented in linear form. The resistance genes are symbolised by triangles colour-coded as in the dendrogram, with beta-lactam resistance genes indicated by red triangles.

Supplementary materials

Figure S1. Distribution of the major sequence types (STs) of ESBL-producing *E. coli* according to ecological origin

Histogram representing STs common to at least two isolates. ST131, ST38 and ST10 were the three most frequent STs.

Figure S2a. and S2b. Distribution of the antibiotic resistance genes identified in ESBL-producing *E. coli* between humans, animals and wastewater

(a) Venn diagram displaying 78 antibiotic resistance genes identified in the 410 ESBL-producing *E. coli* isolates.

(b) Histogram representing the prevalence of each antibiotic resistance gene in humans, animals and wastewater.

Figure S3. Detailed dendrograms of mobile genetic elements identified for the *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-15} genes used for Figure 5

Table S1. Source of ESBL-producing *E. coli* isolates from humans

Detailed distribution of the 161 human isolates collected between January and December 2018. Community patients or outpatients are defined as those not initially hospitalised in a healthcare facility for whom infection/colonisation was detected within the first 48 hours of hospitalisation or who attended the facility solely for the purposes of a consultation. Inpatients are defined as patients already hospitalised for more than 48 hours in a public hospital or private clinic on the island.

Table S2. Source of ESBL-producing *E. coli* isolates from wastewater

Detailed distribution of the 161 wastewater isolates collected between January and December 2018.

Table S3. Source of ESBL-producing *E. coli* isolates from animals

Detailed distribution of the 88 animal isolates collected between April 2015 and December 2018.

Figure 1.

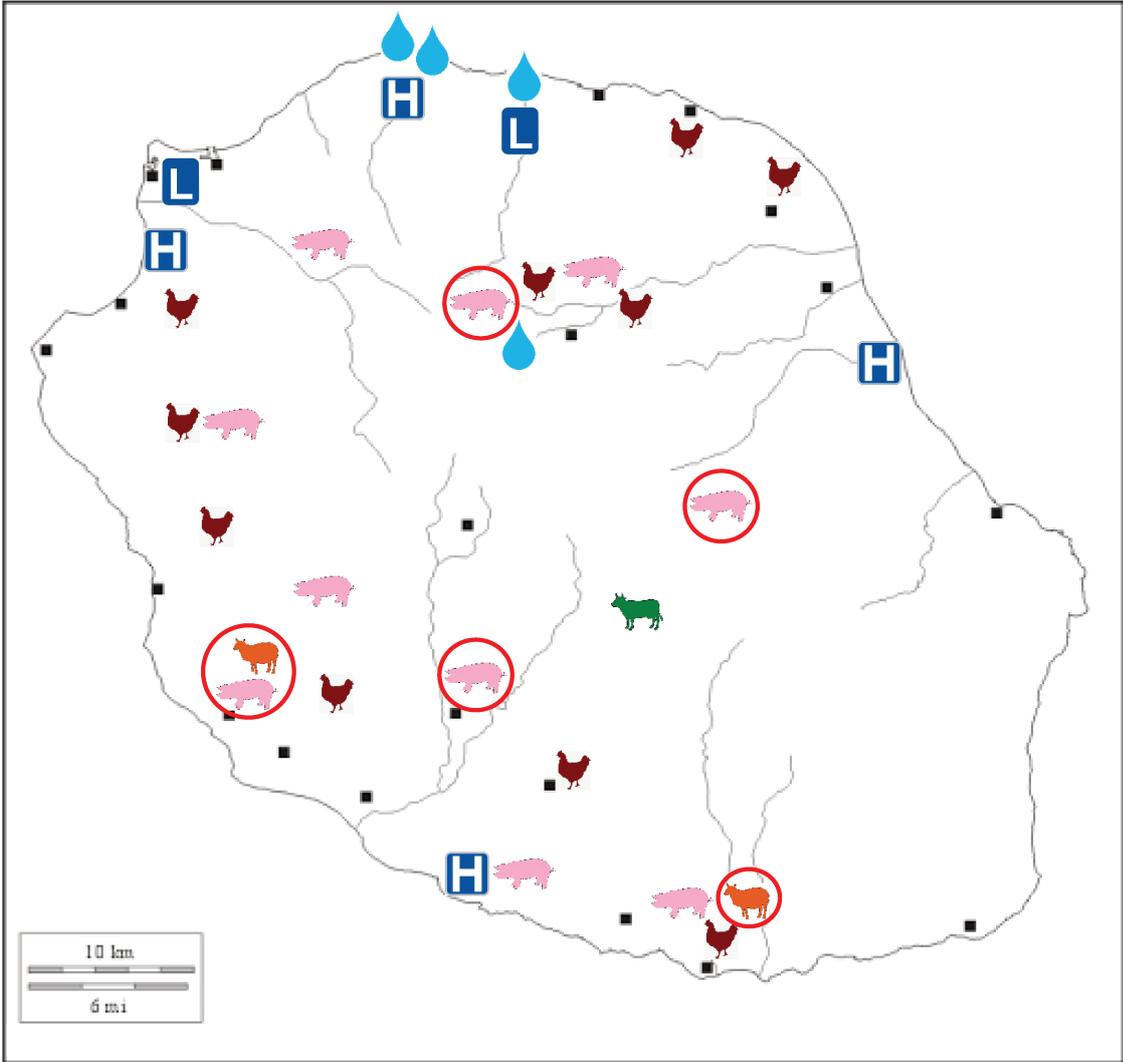


Figure 2.

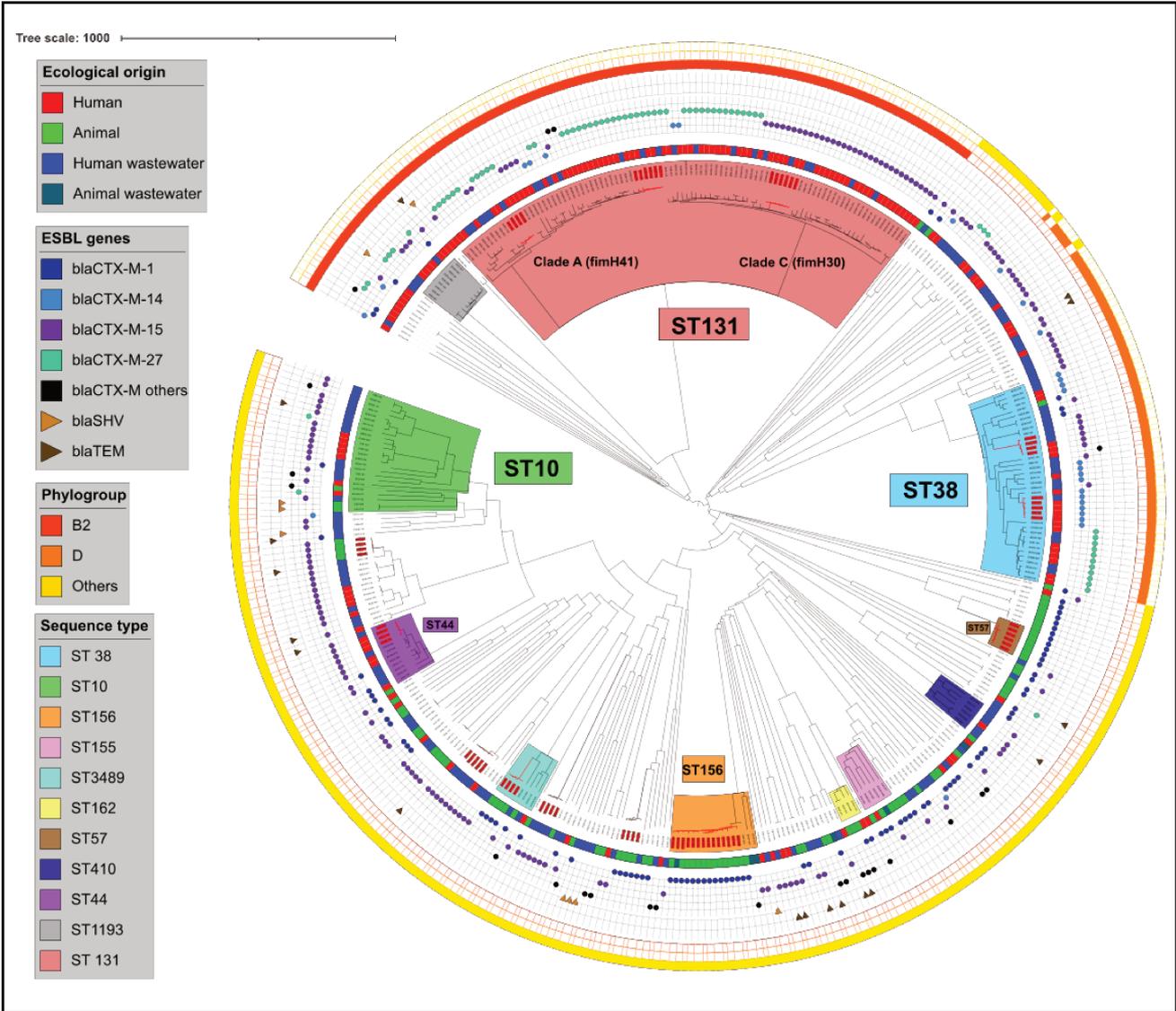


Figure 3.

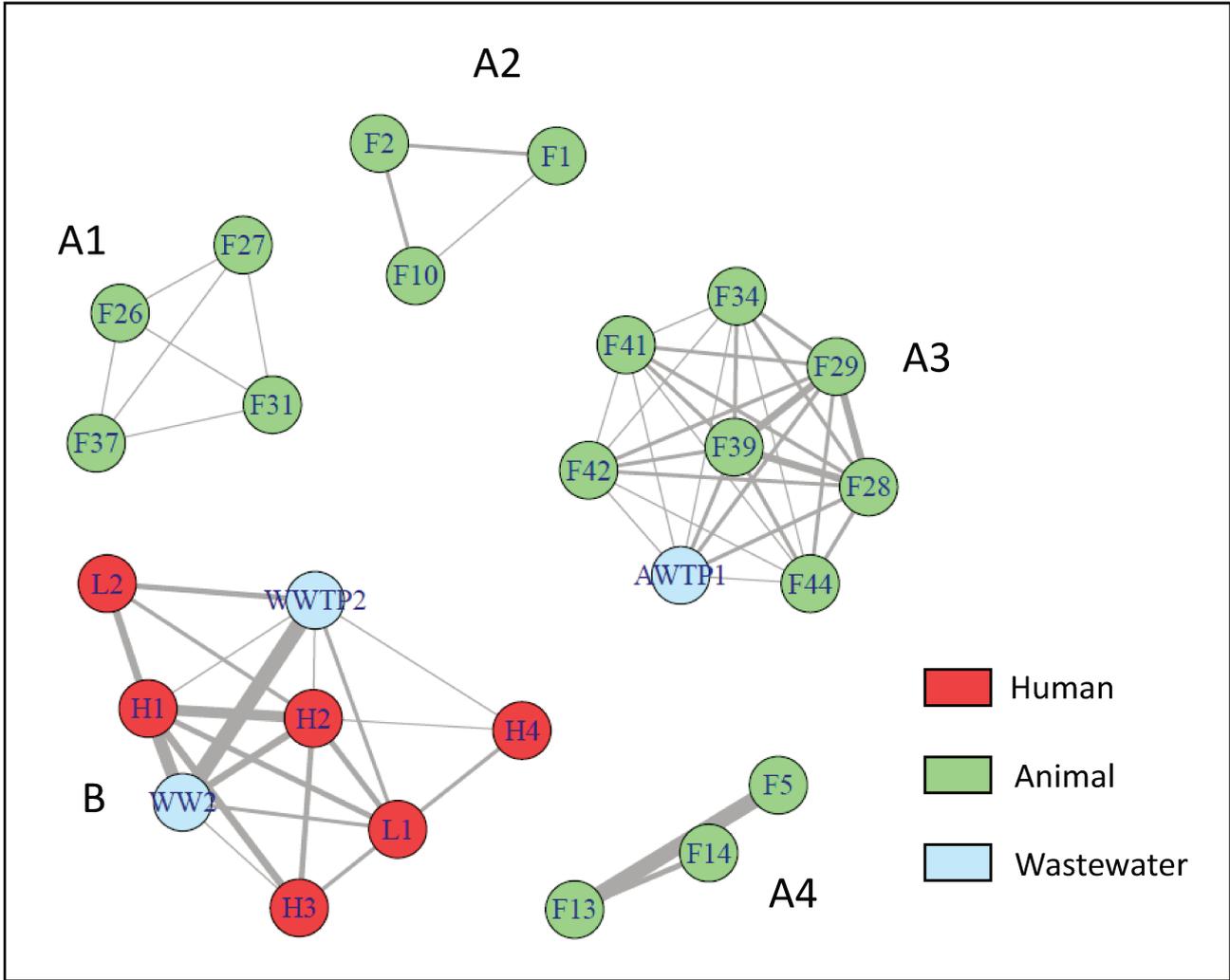


Figure 4.

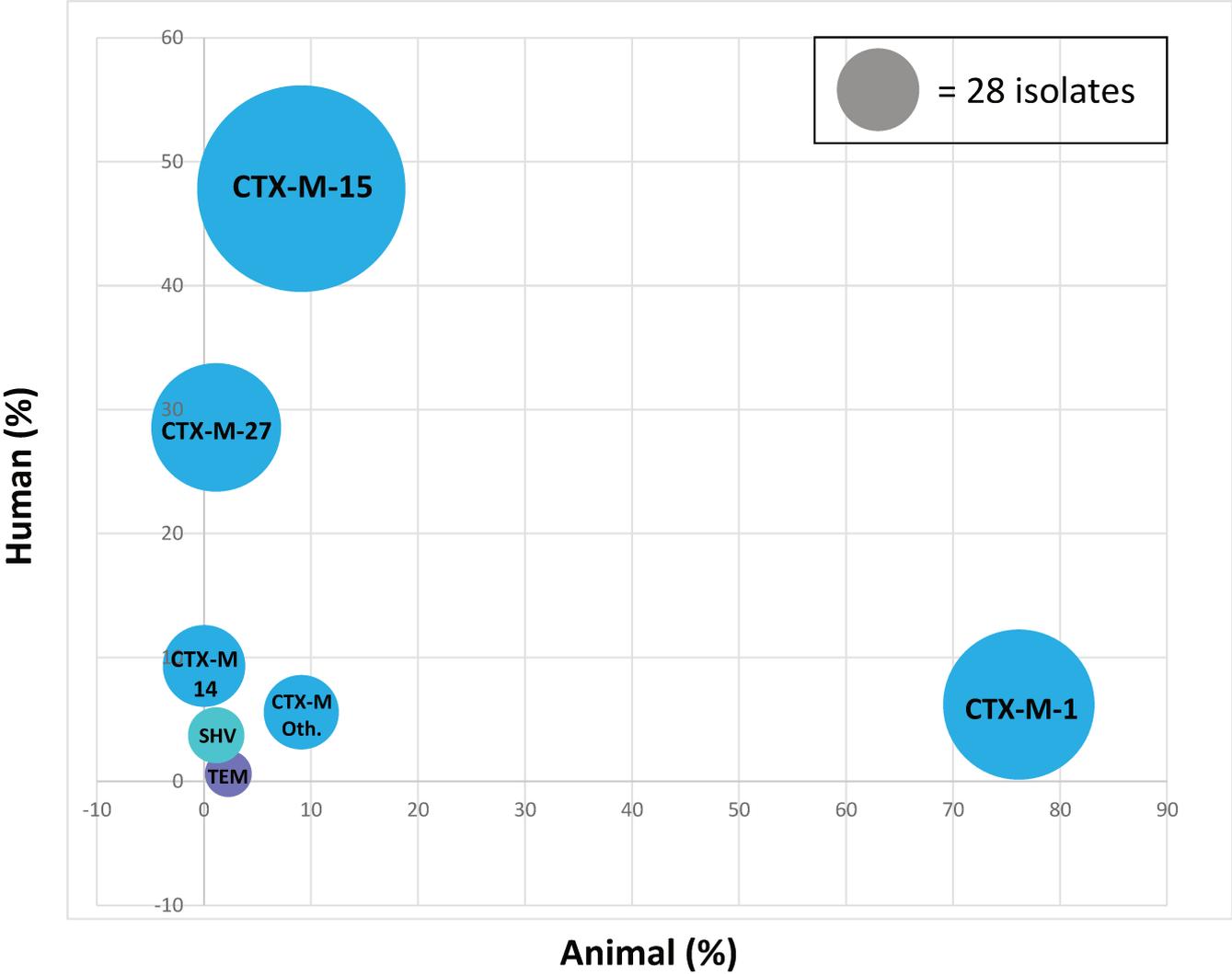


Figure 5.

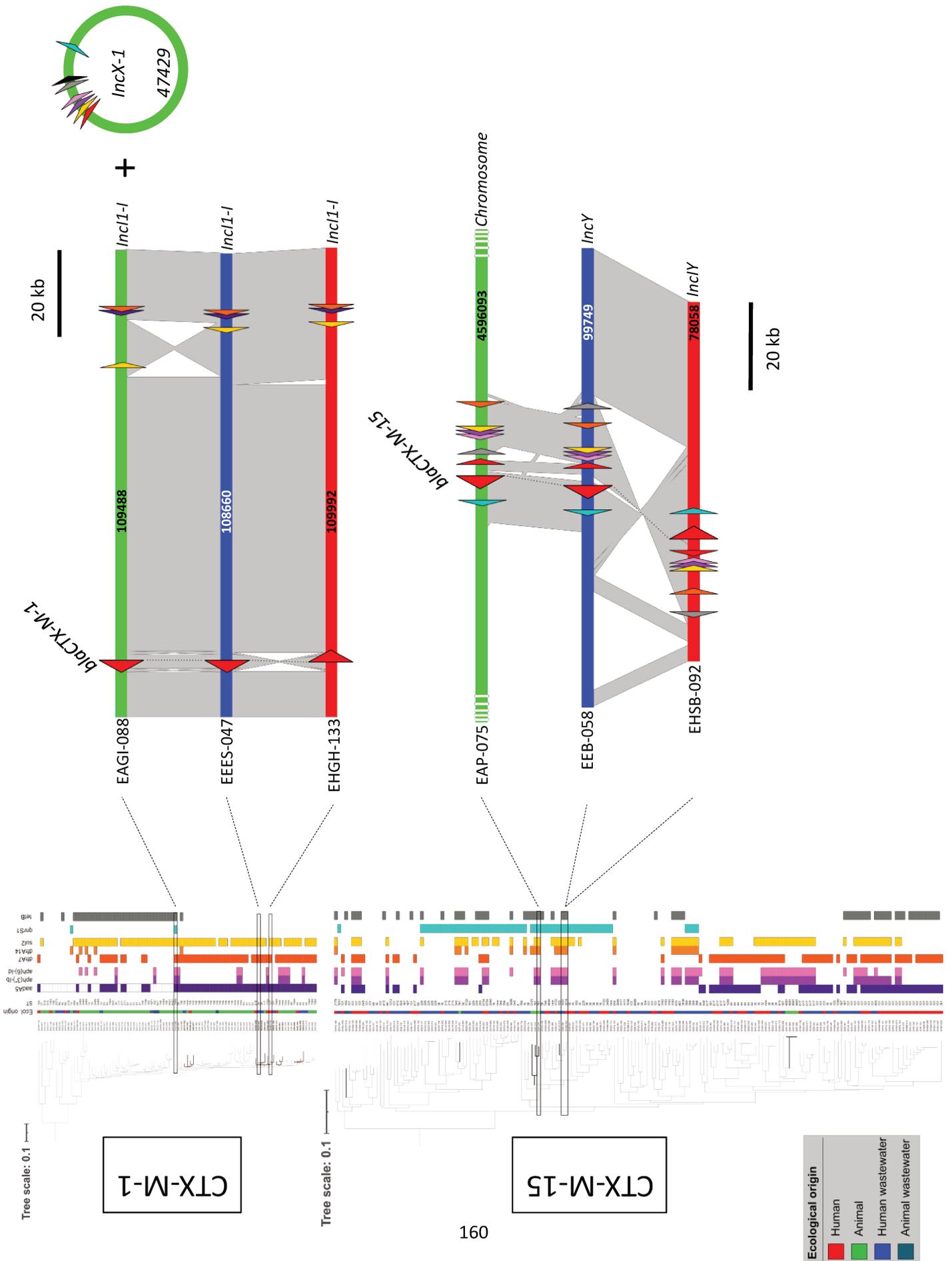


Figure S1.

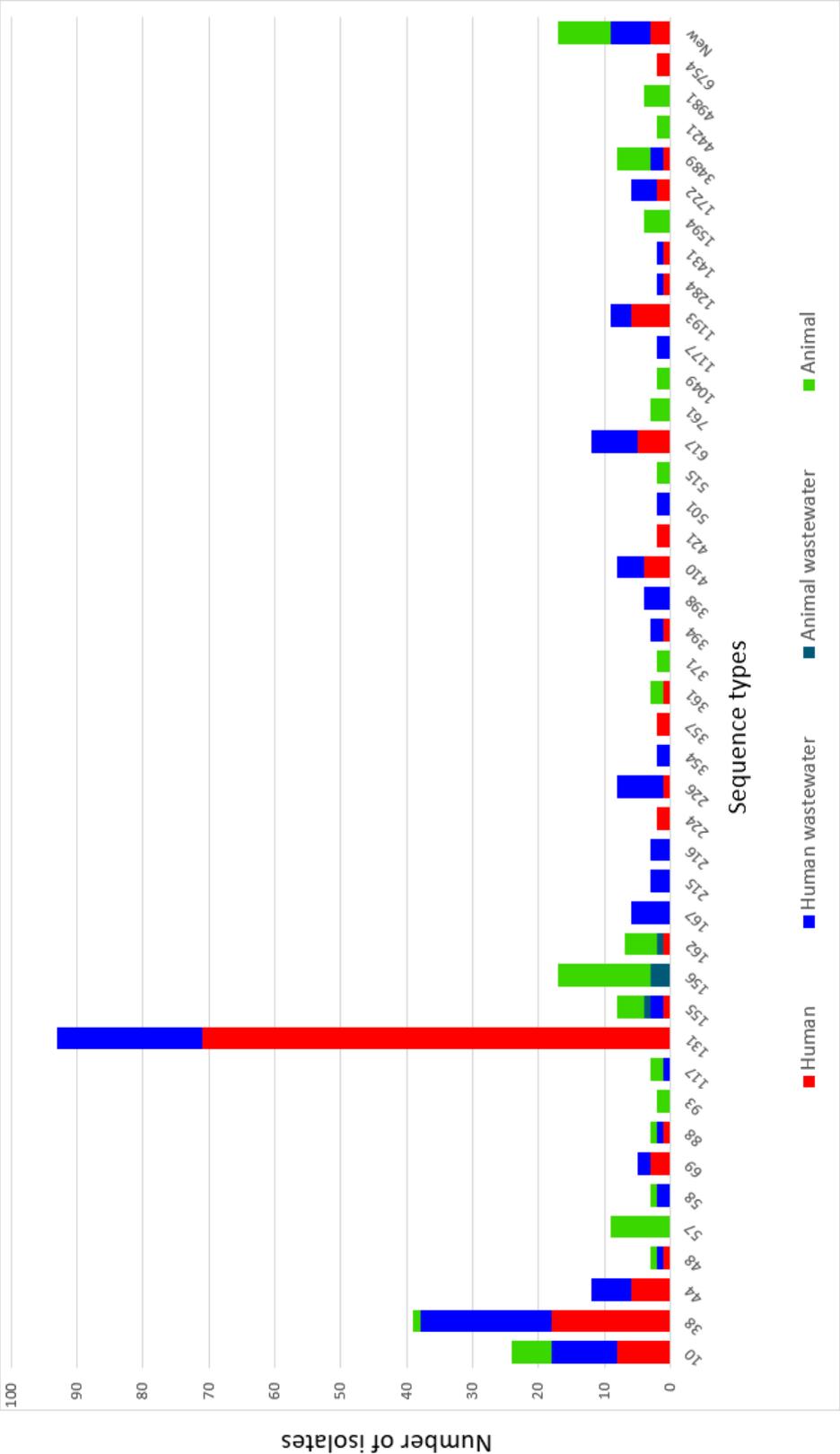


Figure S3.

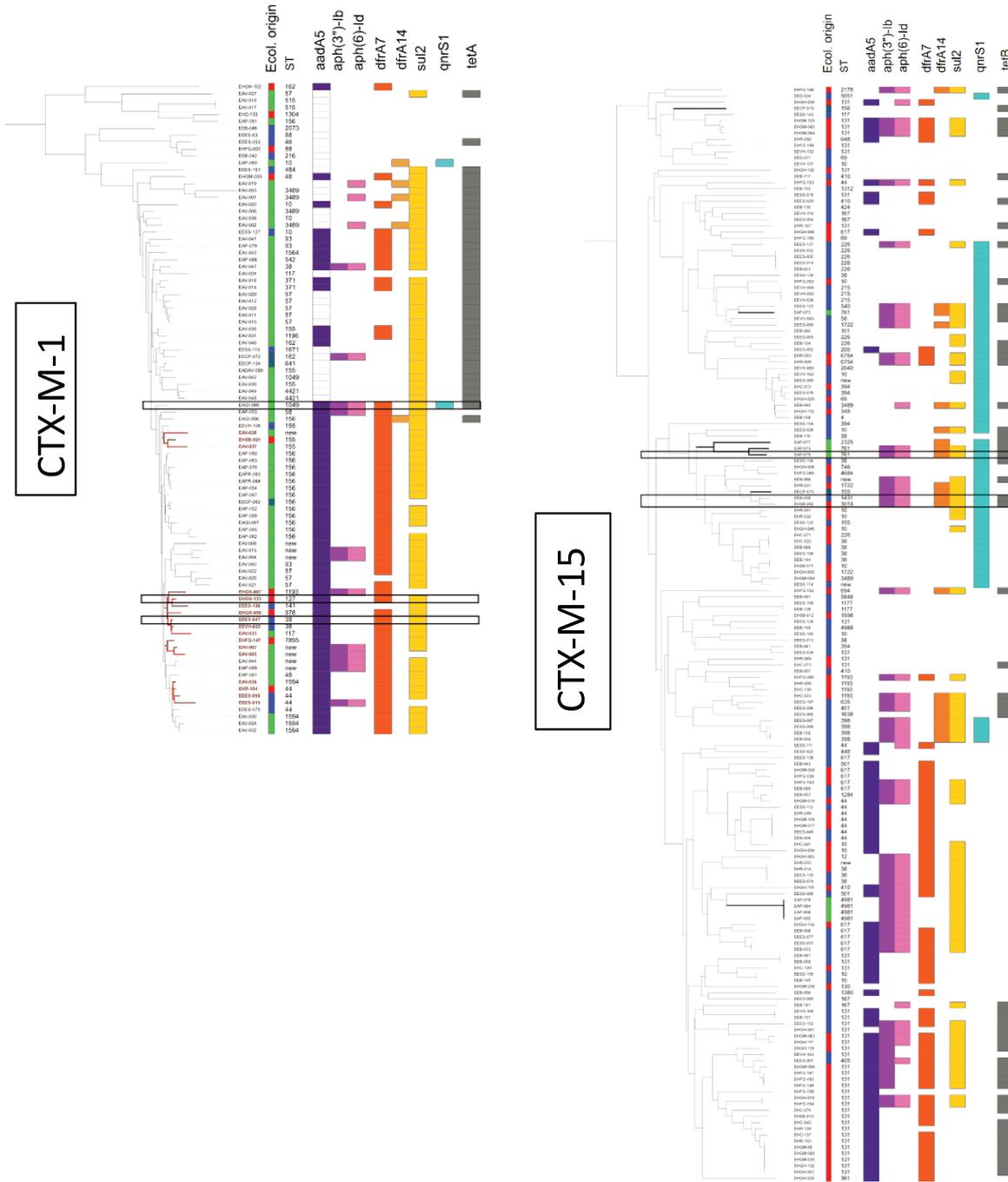


Table S1.

	Northern hospital	Southern hospital	Eastern hospital	Western hospital	Laboratory group 1	Laboratory group 2	All
Cases, n	37	32	7	33	34	30	173
Included cases, n	36	31	7	30	30	27	161
Age, mean (SD)	62.7 (26.3)	61.3 (25.8)	63.4 (25.1)	53.3 (28.8)	67 (28.9)	65 (26.4)	61.1 (26.2)
Sex, n (%)							
Women	16 (44.4%)	11 (35.5%)	4 (57.1%)	14 (46.7%)	18 (60.0%)	19 (70.4%)	82 (50.9%)
Men	20 (55.6%)	20 (64.5%)	3 (42.9%)	16 (53.3%)	12 (40.0%)	8 (29.6%)	79 (49.1%)
Origin of patient							
Community or outpatient	2 (5.6%)	0	0	3 (10.0%)	29 (96.7%)	18 (66.7%)	52 (32.3%)
Inpatient							
≤ 48h	25 (69.4%)	22 (71.0%)	4 (57.1%)	24 (80.0%)	0	3 (11.1%)	78 (48.4%)
> 48h	9 (25.0%)	9 (29.0%)	3 (42.9%)	3 (10.0%)	1 (3.3%)	6 (22.2%)	31 (19.3%)
Specimen source							
Urinary	15 (41.7%)	9 (29.0%)	3 (42.9%)	14 (46.7%)	30 (100%)	24 (88.9%)	95 (59%)
Rectal	13 (36.1%)	11 (35.5%)	4 (57.1%)	11 (36.7%)	0	3 (11.1%)	42 (26.1%)
Blood	2 (5.5%)	5 (16.1%)	0	4 (13.3%)	0	0	11 (6.8%)
Surgical site infection	5 (13.9%)	3 (9.7%)	0	0	0	0	8 (5.0%)
Other	1 (2.8%)	3 (9.7%)	0	1 (3.3%)	0	0	5 (3.1%)
Clinical presentation							
Infection	19 (52.8%)	20 (64.5%)	3 (42.9%)	16 (53.3%)	28 (93.3%)	22 (81.5%)	108 (67.1%)
Colonization	17 (47.2%)	11 (35.5%)	4 (57.1%)	14 (46.7%)	2 (6.7%)	5 (18.5%)	53 (32.9%)
Location (on the island)							
North	23 (63.9%)	1 (3.2%)	1 (14.3%)	0	10 (33.3%)	10 (37.0%)	45 (28.0%)
South	1 (2.8%)	24 (77.4%)	0	0	3 (10.0%)	5 (18.5%)	33 (20.5%)
East	6 (16.7%)	0	6 (85.7%)	0	5 (16.7%)	1 (3.7%)	18 (11.2%)
West	3 (8.3%)	4 (12.9%)	0	30 (100%)	12 (40.0%)	10 (37%)	59 (36.6%)
Centre	3 (8.3%)	2 (6.5%)	0	0	0	1 (3.7%)	6 (3.7%)

Table S2 (lefts) and S3 (rights).

	Jan-18	Feb-18	Mar-18	Apr-18	May-18	Jun-18	Jul-18	Aug-18	Sep-18	Oct-18	Nov-18	Dec-18	Total
Sewage													
Hospital effluent	4	2	3	4	3	4	4	3	4	3	3	4	41 (25.4%)
Community effluent sewage	2	3	2	2	2	2	3	2	3	2	3	3	29 (18.0%)
Wastewater treatment plant													
Inflow	5	8	5	4	2	5	2	6	5	4	5	5	56 (34.8%)
Outflow	2	6	3	1	0	2	1	2	2	3	4	3	29 (18.0%)
Animal waste treatment plant													
Runoff water	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3 (1.9%)
Outflow to the laguna	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	3 (1.9%)
Total	13	19	14	11	8	14	11	13	15	12	15	16	161 (100%)

	Cattle	Pig	Poultry	Rabbit	Small ruminant	Total
Farms, n	12	30	30	15	27	114
Samples, n	124	177	176	39	50	566
ESBL positive farms, n	1	15	21	0	5	42
ESBL positive samples, n	2	50	114	0	6	172
ESBL positivity rate (farms)	8.3%	50.0%	70.0%	0%	18.5%	36.8%
ESBL positivity rate (samples)	1.6%	28.2%	64.7%	0%	12.0%	30.4%
Included ESBL isolates, n	2 (2.3%)	33 (37.5%)	50 (56.8%)	0	3 (3.4%)	88 (100%)

Whole genome sequencing and data analysis (detailed protocol with references)

Bacterial DNA was extracted using QIAamp DNA Minikit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Whole-genome sequencing (WGS) was done at Microsynth (Swiss) with the Illumina NextSeq system using high-output of 2x150 paired-end reads with a median of 88X. Reads were trimmed using sickle (<https://github.com/najoshi/sickle>, v1.33) with a min length of 50, then subsampled at least 80X. Assembly was performed with Spades v3.13 (1) with kmer size of 22, 33, 55 and 77 and careful option. Assembly contigs were filtered with a minimum of 300 bp and 3X coverage.

STs were determined in silico with pyMLST (<https://github.com/bvalot/pyMLST>) using Enterobase schema and Achtman scheme (<https://pubmlst.org/>). Phylogroup and fimH typing were assigned with ClermonTyping (2) and FimTyper, respectively (3). Resistance genes were search with BLAT software (4) using ResFinder database (5) and filtered with a minimum of 90% identity and 80% coverage. cgMLST analysis was performed by pyMLST software using Enterobase V2 schema. Phylogenetic analysis was realized with bioNJ using cgMLST distances and visualized with Itol (6). Isolates were clustered when their cgMLST had less than 10 alleles of difference (7). A network was built using igraph package (v1.2.5) to determine connections between different sampling locations.

Mobile genetic element proximity between strains was evaluated by a method derived of Ludden et al. (8). Briefly, contigs were assigned as potentially bearing on plasmids or on the chromosome using mlplasmids v1.0 (9) with a threshold of 0.6 and 0.7, respectively. Genes were detected with prodigal on contigs assigned as plasmid-borne and containing a *bla*_{ESBL}. Then, these genes were clustered with cd-hit v4.7 (10) at 98% identity to obtained a non-redundant list of mobile genes associated to *bla*_{ESBL}. These mobile genes were search in all genomes and their presence/absence was used to build a dendrogram with bioNJ using a binary distance. Long read sequencing was performed on PacBio Sequel system (SMRT cell v.2.1 chemistry). Generated raw data were assembled with flye v2.8.1 (11). Plasmids

were extracted and polished using pilon v1.23 (12). Resistance genes were searched with Resfinder database similarly as done for Illumina assembly. Complete plasmid sequences were aligned against the assembled genomes containing bla_{CTX-M-1} or bla_{CTX-M-15} by BLAST.

1. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012 May;19(5):455–77.
2. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genomics.* 2018 Jul;4(7).
3. Roer L, Tchesnokova V, Allesøe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, *et al.* Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on fimH Alleles. *J Clin Microbiol.* 2017 Aug;55(8):2538–43.
4. Kent WJ. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* 2002 Apr;12(4):656–64.
5. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Dec 1;75(12):3491–500.
6. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul 2;47(W1):W256–9.
7. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Apr;24(4):350–4.
8. Ludden C, Raven KE, Jamrozy D, Gouliouris T, Blane B, Coll F, *et al.* One Health genomic surveillance of *Escherichia coli* demonstrates distinct lineages and mobile genetic elements in isolates from humans versus livestock. *mBio.* 2019 22;10(1).
9. Arredondo-Alonso S, Rogers MRC, Braat JC, Verschuuren TD, Top J, Corander J, *et al.* mlplasmids: a user-friendly tool to predict plasmid- and chromosome-derived sequences for single species. *Microb Genomics.* 2018 Nov;4(11).
10. Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinforma Oxf Engl.* 2006 Jul 1;22(13):1658–9.
11. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol.* 2019 May;37(5):540–6.
12. Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, *et al.* Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One.* 2014;9(11):e112963.

Données supplémentaires :

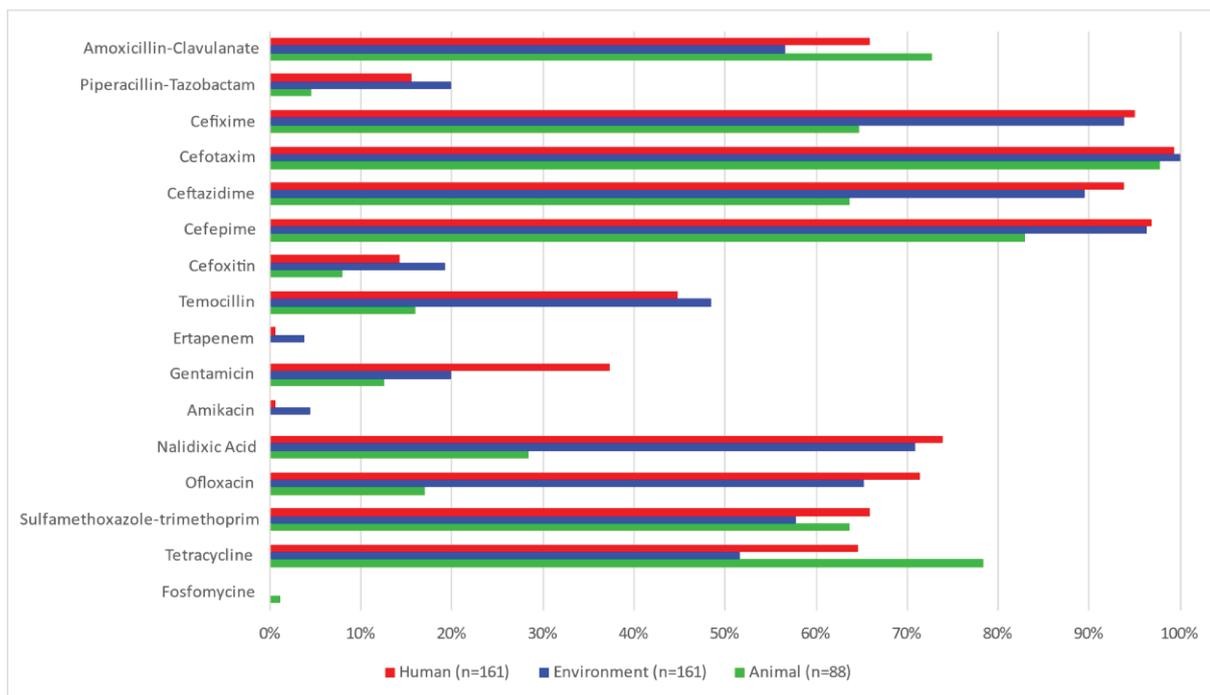


Figure 53a. Profils de résistance des 410 isolats de *E. coli* BLSE à 16 antibiotiques d'intérêt en fonction des 3 compartiments de prélèvements humains, environnementaux et animaux.

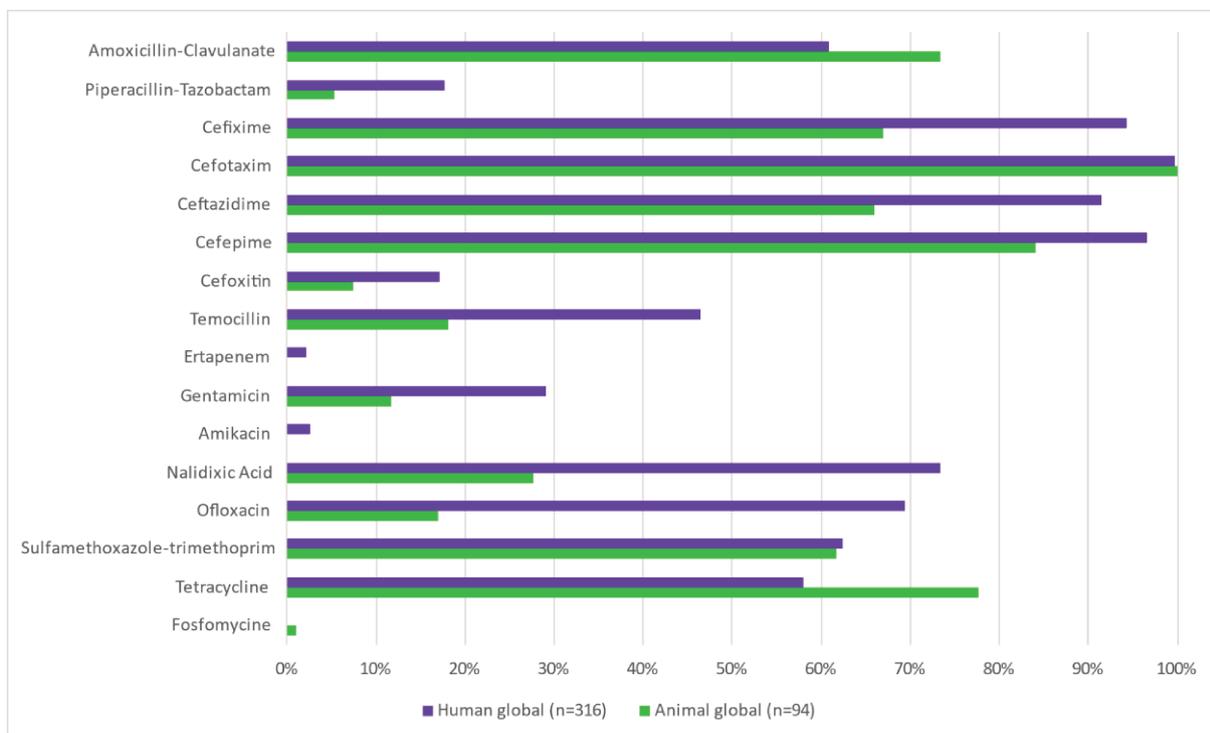


Figure 53b. Profils de résistance des 410 isolats de *E. coli* BLSE à 16 antibiotiques d'intérêt en fonction de 2 compartiments « simplifiés » pour les prélèvements considérés comme d'origine humaine ou animale.

On note des profils de résistance similaires entre les souches d'origine humaine et des eaux usées sur la Figure 53a. Sur la Figure 53b, on remarque que les souches animales sont globalement moins résistantes, notamment aux fluoroquinolones ($p < 0,001$), à la céfoxitine ($p = 0,021$), à la pipéracilline/tazobactam ($p = 0,003$), à la témocilline ($p < 0,001$) et plus résistantes à la tétracycline ($p = 0,001$).

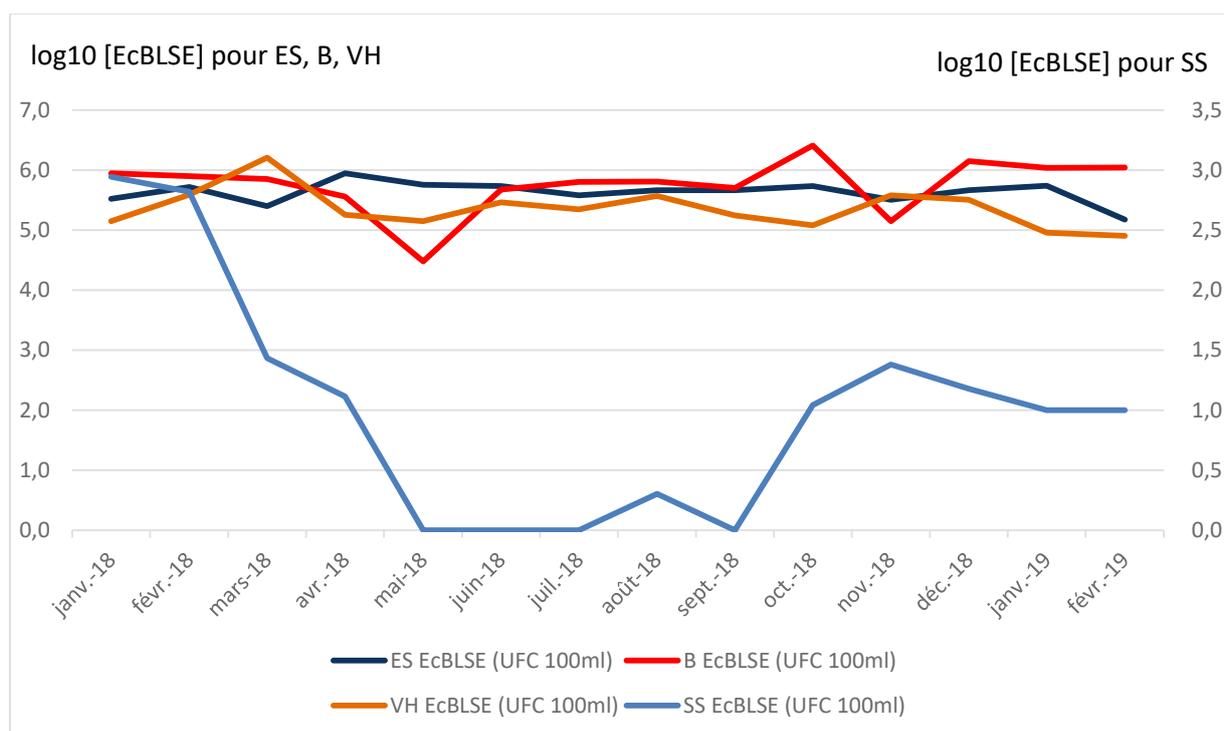


Figure 54. Évolution des concentrations de *E. coli* BLSE (exprimées en log₁₀ de UFC par 100 mL) détectées dans chacun des 4 points de prélèvements de la ville de Saint-Denis entre Janvier 2018 et Février 2019.

EcBLSE : *E. coli* BLSE ; B : Barchois ; VH : Vallon-Hoarau ; ES : entrée de STEP ; SS : sortie de STEP.

On note des concentrations en *E. coli* BLSE relativement stables au cours de l'année pour les points de prélèvements des égouts (Barchois et Vallon-Hoarau) et de l'entrée de la STEP de Saint-Denis (Figure 54). Par contre, il existe de plus grosses variations au niveau de la sortie de la STEP avec un fort relargage de *E. coli* BLSE quand la station est saturée en eaux au début de l'année (fortes précipitations et cyclone en 2018, alors qu'il y a eu moins de précipitations sur la même période en 2019). La station d'épuration avait sur la période Janvier 2018 – Février 2019 un rapport d'élimination moyen des *E. coli* totaux de $3 \cdot 10^5$ et des *E. coli* BLSE de $5 \cdot 10^4$.

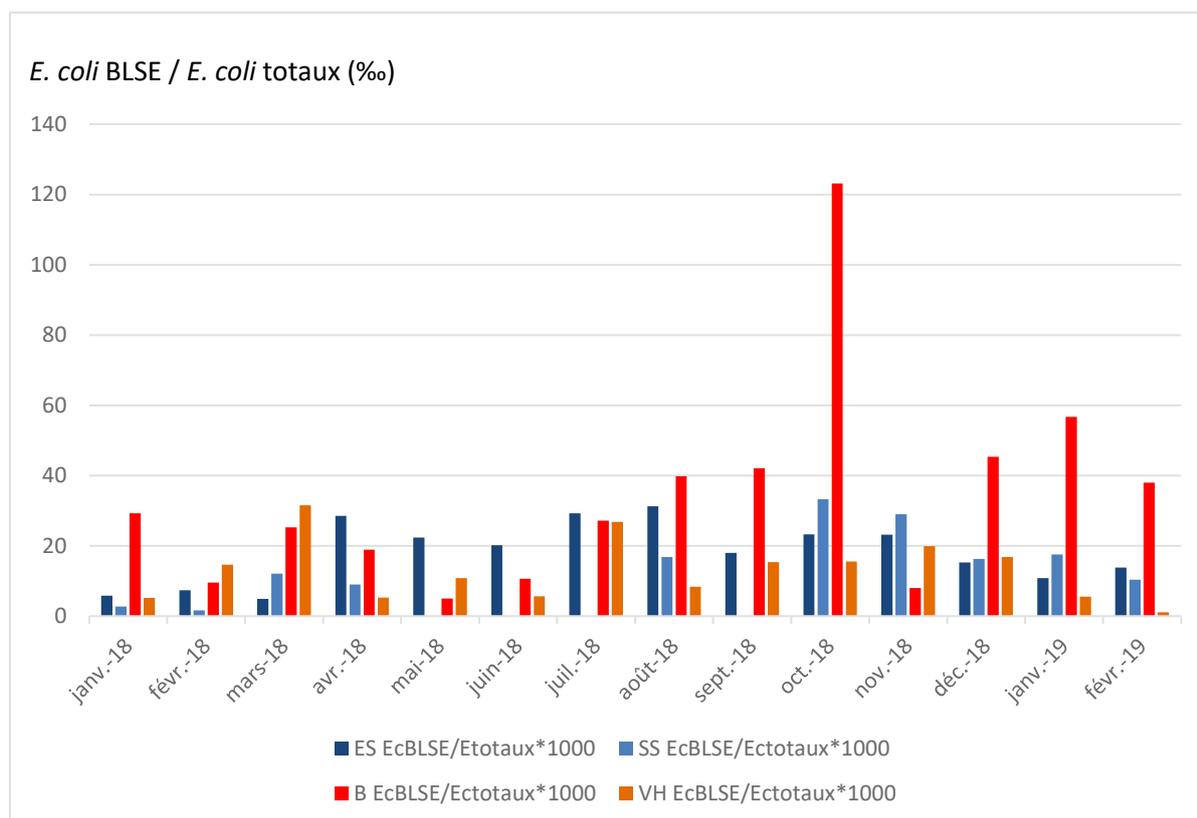


Figure 55. Rapport (exprimé en ‰) entre les concentrations de *E. coli* BLSE et les *E. coli* totaux détectées dans les 4 différents points de prélèvements de la ville de Saint-Denis sur la période Janvier 2018 - Février 2019. EcBLSE : *E. coli* BLSE ; Ectotaux : *E. coli* totaux ; B : Barachois ; VH : Vallon-Hoarau ; ES : entrée de STEP ; SS : sortie de STEP.

Nous avons comparé les points de refoulement du Barachois (effluents hospitaliers) et le point de refoulement de Vallon-Hoarau (effluents communautaires). Il y avait plus de *E. coli* BLSE dans les effluents hospitaliers que dans les effluents communautaires de manière statistiquement significative (test U de Mann-Whitney ; $p=0,015$) (Figure 55). Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre entrée et sortie de station d'épuration (test des rangs signés de Wilcoxon ; $p=0,11$).

Tableau 9. Synthèse des isolats d'EPC détectés dans les prélèvements d'eaux usées de Saint-Denis sur la période Janvier 2018 - Février 2019.

Espèces d'EPC	PR Barachois	PR Vallon Hoarau	Entrée STEP Grand Prado	Sortie STEP Grand Prado	Total
<i>E. coli</i>	3	1	2	3	9
<i>Klebsiella sp. / Raoultella sp.</i>	30	0	28	10	68
<i>Citrobacter sp.</i>	19	0	22	1	42
<i>Enterobacter sp.</i>	9	0	4	0	13
<i>Serratia marcescens</i>	1	0	0	0	1
Total	62	1	56	14	133

On note que 62 des 63 souches détectées dans les égouts de Saint-Denis (98,4%) proviennent d'effluents d'origine hospitalière (Tableau 9). De plus, 14 des 133 souches détectées au total (10,5%) ont été détectées en sortie de STEP, et donc relarguées directement dans l'océan.

La comparaison des 410 isolats de *E. coli* BLSE recueillis à La Réunion entre 2015 et 2018 nous a permis d'établir l'existence d'une sectorisation importante entre le compartiment humain vu dans sa globalité (*i.e.* les souches cliniques et les eaux usées d'origine urbaine), et le compartiment animal (souches animales et effluents ruraux). Ces deux populations bactériennes sont ainsi génétiquement différentes, tout comme les gènes de résistance *bla*_{BLSE} et les EGM portant ces gènes (plasmides). Ces résultats suggèrent fortement que le compartiment animal ainsi que l'alimentation qui en est issue ne sont pas des réservoirs importants de *E. coli* BLSE pour l'Homme et que la transmission de ces bactéries multi-résistantes est essentiellement inter-humaine à La Réunion. En effet, la totalité des viandes issues de ces animaux sont consommées sur l'île puisque la production locale est inférieure aux besoins de la population réunionnaise. Ce modèle peut être corrélé à celui de pays développés où les infrastructures sanitaires mises en place permettent cette faible interaction. Ces patterns sont similaires à ceux issus des études majeures publiées récemment sur ce sujet dans d'autres pays développés comme le Royaume-Uni, les Pays-Bas ou d'autres pays de niveau socio-économique plus faible comme la Thaïlande et le Vietnam (*cf.* 1^{ère} partie, paragraphes 2.2.3 et 2.2.4).

Les mesures de santé publique (Plan EcoAntibio 1), qui ont permis de diminuer drastiquement la consommation des antibiotiques chez les vétérinaires, sont importantes pour la filière de l'élevage. Cependant, celles-ci n'auront probablement qu'un effet limité et étalé dans le temps pour les infections à EBLSE humaines. À La Réunion, les mesures de prévention visant à limiter le nombre d'infections à EBLSE doivent ainsi prioritairement s'orienter vers (*i*) la diminution de consommation d'antibiotiques, notamment dans le secteur communautaire, chez l'Homme ; et (*ii*) la limitation des transmissions inter-humaines par des mesures d'hygiène individuelle (péril oro-fécal) et collective dans les ES et EMS pour réduire les transmissions croisées entre les patients.

Une des limites de notre étude est de ne pas avoir exploré la filière alimentaire. Cependant, la totalité de la production locale est consommée sur place. Il faut néanmoins noter que les viandes d'importation n'ont pas été explorées. De plus, la plupart des études ayant comparé les populations de *E. coli* BLSE chez les animaux de rente et dans la filière alimentaire ont abouti à des populations très similaires ; et les dernières études basées sur le WGS sur ce sujet ont également abouti à une faible contribution de ce secteur vis-à-vis des EBLSE chez l'Homme (289,304). La Réunion a encore une fois ses particularités dans ce domaine. En effet, ce DOM n'est pas du tout auto-suffisant en termes d'approvisionnement en denrées alimentaires et notamment en viandes, poissons et crustacés. Il existe des filières locales d'approvisionnement directement liées à l'Asie qu'il serait important d'investiguer avec nos collègues vétérinaires. Enfin, si nous avons exclu tous les patients et animaux d'origine externe, les très nombreux échanges de populations dans la zone ne permettent pas de considérer La Réunion comme un système complètement fermé. La part des souches de EBLSE

importées *via* ces voyageurs, bien que difficilement quantifiable, joue probablement un rôle de maintien dans ces populations bactériennes, comme en atteste certaines particularités épidémiologiques objectivées (clone *E. coli* ST131-H41-M27).

Concernant les données supplémentaires présentées sur les pourcentages de souches de *E. coli* BLSE non-sensibles à chaque antibiotique, les schémas de résistance étaient globalement très proches pour les isolats humains et ceux des eaux usées, alors que les isolats animaux étaient plus sensibles aux antibiotiques les plus utilisés en médecine humaine et plus résistants à la tétracycline, majoritairement utilisés chez l'animal (Figure 53). Cette partition phénotypique va également dans le sens de cette sectorisation Homme/eaux usées urbaines et animal/effluents ruraux. Tous les isolats restent largement sensibles à la fosfomycine (<2%), à l'ertapénème et à l'amikacine (<5%) qui constituent aujourd'hui de bonnes alternatives thérapeutiques en cas d'infection. Concernant les données supplémentaires sur les effluents urbains de Saint-Denis, on note l'influence du climat tropical sur les rejets de *E. coli* BLSE de la STEP avec une saturation due aux fortes précipitations (cyclones) pendant le début de l'année (été austral) et un fonctionnement optimal de la station en saison sèche (juin, juillet, août) correspondant à l'hiver austral. On notera également que les effluents hospitaliers étaient significativement plus chargés en *E. coli* BLSE que les effluents communautaires. Enfin, la détection de 133 souches d'EPC dans les eaux usées des égouts est à la fois inquiétante et informative. En effet, *a contrario* des *E. coli* BLSE, une seule souche d'EPC a été détectée dans les effluents d'origine communautaire (Vallon Hoarau). Ces résultats suggèrent des portages digestifs d'EPC non détectés dans la population hospitalière de Saint-Denis. On notera que des EPC sont également retrouvées en sortie de STEP et rejetées dans l'océan.

3.2 Épidémiologie des EPC à La Réunion sur la période 2010-2016 : un reflet des EPC circulant dans la zone du Sud-Ouest de l'Océan Indien ?

En 2017, l'épidémiologie microbienne des EPC à La Réunion était peu documentée et aucune revue basée sur une collection de ces isolats n'avait été réalisée. En effet, si le CPIAS/FELIN tentait de recenser l'ensemble des cas d'EPC d'un point de vue épidémiologique, aucune collection rassemblant ces isolats n'était réalisée par un laboratoire « référent » sur l'île. Les isolats étaient également envoyés de manière non exhaustive au CNR des EPC à Bicêtre. De plus, si le gène *bla_{NDM}* semblait prédominant, nous ne savions pas s'il existait un lien épidémiologique entre ces isolats et la part exacte des souches d'importation *via* soit les EVASAN, soit les déplacements de populations.

Nous avons ainsi entrepris de réaliser une étude rétrospective de l'ensemble des isolats d'EPC détectés sur l'île entre 2011 et 2016 en se basant sur le réseau de laboratoire de l'île et des bibliothèques réalisées dans ces différents établissements. Nous avons secondairement croisé ces informations avec les cas recensés par le CPIAS/FELIN. Nous avons également investigué l'histoire clinique de chaque cas détecté pour savoir si le patient avait récemment voyagé pour étiqueter chaque cas en tant que cas « importé » ou cas « autochtone ».

Les objectifs de cette étude étaient de (i) établir la réelle proportion des isolats d'EPC en lien avec l'étranger à La Réunion, c'est-à-dire les isolats des cas importés mais également les isolats issus de transmissions croisées entre cas importés et patients réunionnais n'ayant pas voyagés ; et (ii) déterminer les caractéristiques de la population des isolats d'EPC sans aucun lien retrouvé avec l'étranger (ni voyage à l'étranger, ni lien épidémiologique avec un cas importé). L'hypothèse formulée était que si la proportion des isolats d'EPC ayant un lien avec l'étranger était importante, et puisque La Réunion (et son CHU) est un carrefour migratoire dans la zone, alors cette île pouvait être considérée comme un « observatoire » de l'ensemble des EPC circulant dans la zone SOOI.

RESEARCH

Open Access



Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* circulating in the Reunion Island, a French territory in the Southwest Indian Ocean

Guillaume Miltgen^{1,2*}, Pascal Cholley^{3,4}, Daniel Martak^{3,4}, Michelle Thouverez³, Paul Seraphin¹, Alexandre Leclaire¹, Nicolas Traversier¹, Bénédicte Roquebert^{1,2}, Marie-Christine Jaffar-Bandjee^{1,2}, Nathalie Lugagne⁵, Céline Ben Cimon⁶, Mahery Ramiandrisoa⁷, Sandrine Picot⁸, Anne Lignereux⁹, Geoffrey Masson¹⁰, Jérôme Allyn¹¹, Nicolas Allou¹¹, Patrick Mavingui², Olivier Belmonte¹, Xavier Bertrand^{3,4} and Didier Hocquet^{3,4}

Abstract

Background: The spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) in the Southwest Indian Ocean area (SIOA) is poorly documented. Reunion Island is a French overseas territory located close to Madagascar and connected with Southern Africa, Indian sub-continent and Europe, with several weekly flights. Here we report the results of the CPE surveillance program in Reunion Island over a six-year period.

Methods: All CPE were collected between January 2011 and December 2016. Demographics and clinical data of the carrier patients were collected. We determined their susceptibility to antimicrobials, identified the carbapenemases and ESBL by PCR and sequencing, and explored their genetic relationship using pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing.

Results: A total of 61 CPEs isolated from 53 patients were retrieved in 6 public or private laboratories of the island. We found that 69.8% of CPE patients were linked to a foreign country of SIOA and that almost half of CPE cases (47.2%) reached the island through a medical evacuation. The annual number of CPE cases strongly increased over the studied period (one case in 2011 vs. 21 cases in 2016). A proportion of 17.5% of CPE isolates were non-susceptible to colistin. *bla*_{NDM} was the most frequent carbapenemase (79.4%), followed by *bla*_{IMI} (11.1%), and *bla*_{IMP-10} (4.8%). Autochthonous CPE cases (30.2%) harboured CPE isolates belonging to a polyclonal population.

Conclusions: Because the hospital of Reunion Island is the only reference healthcare setting of the SIOA, we can reasonably estimate that its CPE epidemiology reflects that of this area. Mauritius was the main provider of foreign CPE cases (35.5%). We also showed that autochthonous isolates of CPEs are mostly polyclonal, thus unrelated to cross-transmission. This demonstrates the local spread of carbapenemase-encoding genes (i.e. *bla*_{NDM}) in a polyclonal bacterial population and raises fears that Reunion Island could contribute to the influx of NDM-carbapenemase producers into the French mainland territory.

Keywords: Epidemiology, Carbapenemase, French overseas territory, Reunion Island, Indian Ocean, NDM

* Correspondence: guillaume.miltgen@chu-reunion.fr

¹Laboratoire de Bactériologie, CHU Félix Guyon, Allée des Topazes, 97400 Saint-Denis, La Réunion, France

²UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, Université de La Réunion, Sainte-Clotilde, La Réunion, France
Full list of author information is available at the end of the article



Background

The increasing spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) has been witnessed worldwide over the last decade [1–3]. Therapy of infections caused by these extensively drug-resistant bacteria (XDRB) is limited to few options and associated with an increased morbidity and mortality in comparison with those caused by carbapenem-susceptible strains [4–7]. The large population flows from Southern Africa and Indian sub-continent to the Indian Ocean islands can contribute to the dissemination of XDRB in Reunion Island, a French Overseas Territory located close to Madagascar [8, 9]. Hence, the first two CPE isolates detected in Reunion Island were described in 2011 as NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella enterica subsp. enterica* (serotype Enteritidis) retrieved from patients previously hospitalized in Mauritius and India, respectively [10]. Likewise, the first OXA-48-like-producing CPE was an OXA-232 produced by *Escherichia coli* found in 2012 in a Mauritian patient who travelled to India [11]. Spread and epidemiology of CPEs have been previously described in Southern Africa, Arabian peninsula and Indian sub-continent [12–18]. However, these CPEs data in the Southwest Indian Ocean area (consisting of Madagascar, Mayotte and Reunion islands, Mauritius, Comoros and Seychelles archipelagos) are poorly known. Albeit in 2015, 0.04% of *E. coli*, 0.19% of *K. pneumoniae*, and 0.48% of *Enterobacter cloacae* isolates were non-susceptible to imipenem in the diagnostic samples in the health care facilities of Reunion Island [19].

Reunion Island has a population of 850,000 inhabitants and has the same health care level as in mainland France. The University Hospital of Reunion Island (UHRI) is the reference hospital in the Southwest Indian Ocean area (SIOA) for the French overseas people but also for the region inhabitants who need specialized care. The Reunion Island, which connects Europe and the SIOA (with five daily flights), could provide the French mainland territory with NDM-carbapenemase producers [20, 21].

Here we report the results of a CPE surveillance program in Reunion Island. The aim of this study was to investigate the CPE spread in Reunion Island between 2011 and 2016 by characterizing the most prevalent resistance determinants and the clonal spread of these XDRB, especially for Reunionese people who have never travelled abroad.

Methods

Definitions

We defined a CPE case as a non-redundant patient infected or colonized with a CPE, i.e. a patient who was not previously known as a CPE carrier in one of the laboratories of the surveillance network. An episode of cross-transmission gathered spatiotemporally linked CPE cases (including those sharing the same healthcare

workers) who shared a CPE with the same pulsotype (see below). The grouped-cases by episode were defined as the number of cases for an episode of probable cross-transmission i.e. the index case and all the secondary cases. We selected carbapenemase-producers from EUCAST criteria [22]: non-susceptibility to ertapenem (Minimum Inhibitory Concentration, MIC > 0.5 mg/L) and/or to imipenem (MIC > 2 mg/L).

Study design

Since 2008, the regional antimicrobial resistance surveillance system of Reunion Island collects the microbiological tests performed in six laboratories: two private laboratory groups and four laboratories from public hospitals. These four public hospitals include one bi-site University Hospital (with Northern and Southern sites) and two (Western and Eastern) departmental hospitals with a total about 2500 beds and 250,000 hospital admissions per year. This surveillance system is coordinated by the Federation for Nosocomial Infection Control of Reunion Island (French acronym: FELIN Réunion). The representativeness of this network is estimated to be >90% of complete-hospitalization days in Reunion Island and 100% of MSO (Medicine Surgery Obstetrical) hospitalizations. In this surveillance system, patients coming from or with a link with a foreign country or Mayotte were systematically screened for multi drug-resistant (MDR) or XDR bacteria by rectal swab within 24 h of admission. In addition, intensive care units (ICUs) and burn units of the UHRI systematically screened patients at their entry and weekly thereafter. Strict contact precautions were maintained when a CPE was identified in the screening sample, and contact patients were identified. Hospitalized contact patients were screened by rectal swabbing for CPE carriage and subjected to contact precautions.

We performed a multicentre retrospective review of all consecutive isolates identified and reported as CPE producer by the Federation for Nosocomial Infection Control of Reunion Island surveillance system between January 2011 and December 2016.

Patient clinical data

Demographics and clinical data were collected from CPE cases: age, gender, date of admission, date of first positive culture, ward, CPE species, anatomical site of isolation, reason for hospitalization, and comorbidities. A patient was considered as exposed to antimicrobial if he had received an antimicrobial treatment within the 3 months before CPE isolation. The link with a foreign country was defined as a residence, stay or hospitalization abroad (including Mayotte Island) in the year before the hospitalization in Reunion Island. Mainland France was not considered as a foreign country. We retrospectively

followed the CPE patients for a maximum of 30 days after the date of the first positive CPE culture to determine all-cause and deaths attributable to CPE infection.

Bacterial isolates and antimicrobial susceptibility testing

Bacterial species were identified using MALDI-TOF mass spectrometry (Microflex, Bruker Daltonics, Breme, Germany) according to the manufacturer's recommendations. We evaluated for each isolate the susceptibility to six relevant antimicrobials, which represent the latest therapeutic alternatives. MICs ofertapenem, imipenem, meropenem, tigecycline and fosfomycin were determined using gradient strips (Etest, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). MICs of colistin were determined by broth microdilution method using UMIC colistin kit (Biocentric, Bandol, France). All MICs were interpreted following the 2019 EUCAST recommendations [22]. Isolates with intrinsic resistance to one of the six antimicrobials were excluded from the calculation of the non-susceptibility rate of the corresponding antimicrobial.

ESBL and carbapenemase identification

Genes encoding ESBLs were identified by PCR and sequencing as previously described [23]. We screened all samples with consensus primers targeting *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{TEM} genes. All isolates were evaluated for carbapenemase production by using CARBA-NP test (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France) and GeneXpert system (Cepheid, Sunnyvale, USA) that targets *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{OXA-48-like} genes [24, 25]. The presence of carbapenemase-encoding genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48-like} and *bla*_{IMI}) was further confirmed by PCR and sequencing for all isolates by the French Associated National Reference Centre for Antibiotic Resistance (FANRCAR, [26]). The *mcr* genes were PCR screened by the FANRCAR in colistin-resistant isolates.

Molecular genotyping

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis

E. coli, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* isolates were first genotyped by PFGE using *Xba*I (Roche Diagnostics, Meylan, France) as previously described [27]. The Bionumerics software (Applied Math, Kortrijk, Belgium) created a DNA similarity matrix based on calculating the Dice profile for pairwise comparison of strains. The dendrogram was built by using the UPGMA (*Unweighted Pair Group using Arithmetic Averages*) hierarchical algorithm. Pulsotypes were defined according to international recommendations [28]. We applied the threshold of 75% to define the same pulsotype. A PFGE pattern represented by one isolate was called 'single pulsotype', while a PFGE pattern shared by ≥2 isolates from several patients was

called 'major pulsotype'. The pulsotypes of all the isolates of the present collection have been determined in the same laboratory, between May and July 2017.

Multi-locus sequence typing (MLST) analysis

MLST of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* and *C. freundii* isolates was performed as described elsewhere [29–31]. Hitherto, no MLST scheme exists for *S. marcescens*. Nucleotide sequences were obtained by Sanger sequencing using Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser and Sequencing Analysis software 6. Sequence types (STs) were assigned using the MLST databases of the Warwick Medical School for *E. coli* (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) and of the Institut Pasteur for the other species (<http://bigsdbs.pasteur.fr/>). We defined as a cluster, the isolates sharing the same ST.

Statistical analysis

Poisson regression analysis was used to determine statistical significance of the time trend in CPE incidence. The chosen significance threshold was 0.05.

Results

Demographics and clinical characteristics of CPE cases

We identified 53 CPE cases in Reunion Island between 2011 and 2016 and observed a dramatic increase over the study period with only one case in 2011 vs. 21 cases in 2016 (Fig. 1). For instance, in the North site of the University Hospital, one CPE was retrieved out of 4147 rectal screenings in 2011 (0.02%) vs. 21 CPE retrieved out of 5063 rectal screenings in 2016 (0.41%). Time trend in CPE incidence was explored using Poisson regression analysis and the CPE incidence rate (total number of CPE cases detected each year) increased significantly on average by 62% per year over the 2011–2016 period (IRR = 1.62; $p < 0.001$). Analysis of clinical data showed that 22 CPE cases (41.5%) had not travelled abroad and that 31 (58.5%) of CPE cases had travelled abroad. Among them, 16 cases (51.6%) had an East origin (i.e. a link with Mauritius or Seychelles islands) and 15 cases (48.4%) a West origin (i.e. a link with Madagascar, Mayotte, or Comoros islands). Mauritius was the most frequent source with 11 CPE cases representing 35.5% of CPE cases who had travelled abroad (20.8% of all CPE cases), followed by Mayotte/Comoros (9 cases, 29%), and Madagascar (6 cases, 19.4%). Over the last 5 years, the proportion of CPE patients who had travelled abroad accounted for 50% in 2012; 33.3% in 2013; 60% in 2014; 56.3% in 2015 and 66.7% in 2016 (Fig. 1).

Table 1 summarizes demographics and clinical data of CPE patients. Male patients accounted for 69.8% of cases and median age was 52. CPE patients were mainly hospitalized in medical ward (50.9%) and ICU (35.9%).

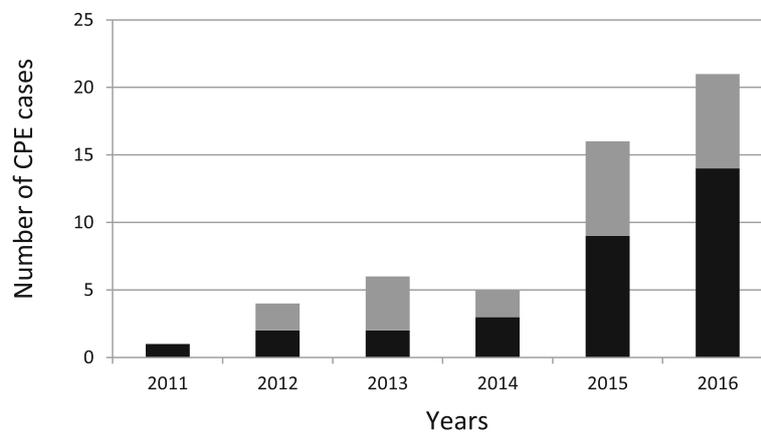


Fig. 1 Number of patients with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) detected between 2011 and 2016 in Reunion Island (France). The number of CPE cases linked and not with a foreign country is represented by the black and grey bars, respectively. The upward trends in the 'total' [$p < 0.001$], 'linked with a foreign country' [$p < 0.001$] and 'not linked with a foreign country' [$p = 0.006$] CPE incidence rates (case per patient-days) were significant

Medical evacuation accounted for almost half of all CPE cases (47.2%). The most frequent sites of isolation were the gut flora (73.1%), urine (13.4%), and blood (6%). Treatment data were available for 51 CPE-positive patients. Twelve patients (23.5%) were treated with carbapenems within the 3 months before the CPE detection. Most of the cases (84.9%; $n = 45$) were colonized with CPE and 15.1% ($n = 8$) were infected with CPE. Of the 15 deaths in the cohort, four were attributable to CPE (3 bacteraemias and 1 pulmonary infection). Of the 8 CPE infections, 3 (37.5%) resulted in the death of the infected patients. These 3 deaths were associated with bacteremia. Seven CPE cases (13.2%) resulted from four episodes of cross-transmission that occurred in two medical wards (ICU and burn units).

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE)

We identified 61 CPEs in 53 patients: 47 patients with one CPE, four patients with two CPEs and two patients with three CPEs. One CPE was detected in 2011 (1.6%), five in 2012 (8.2%), six in 2013 (9.8%), six in 2014 (9.8%), 18 in 2015 (29.5%), and 25 in 2016 (41%). The three main species involved were *K. pneumoniae* ($n = 26$; 42.6%), *E. coli* ($n = 13$; 21.3%), and *E. cloacae* ($n = 9$; 14.8%) (Table 2). Over the 6 years of the study, bla_{NDM} was the most frequent and represented 79.4% of the carbapenemases, followed by bla_{IMI} (11.1%), and bla_{IMP-10} (4.8%). The most common bla_{NDM} genes were bla_{NDM-1} ($n = 42$; 84%) and bla_{NDM-5} ($n = 5$; 10%). bla_{NDM-4} , bla_{NDM-6} and bla_{NDM-7} genes were detected in one isolate each. bla_{IMI-1} gene accounted for 85.7% of bla_{IMI} group (six out of seven isolates) and always in *E. cloacae*. One *Enterobacter asburiae* isolate harboured bla_{IMI-13} gene. The three isolates that harboured bla_{IMP-10} gene were of *S. marcescens*. Half of the CPE isolates (52.5%)

also harboured an ESBL-encoding gene with $bla_{CTX-M-15}$ being the most common. $bla_{CTX-M-15}$ was found in 80.8% of the *K. pneumoniae* CPE isolates, 46.2% of *E. coli* CPE isolates and 16.7% of *C. freundii* CPE isolates. bla_{SHV-12} was also detected in two *E. coli* isolates (data not shown).

Antimicrobial susceptibility testing

Table 3 reports the antimicrobial susceptibilities of the CPE isolates. Overall, 92, 75, and 71% of CPE isolates were not susceptible to ertapenem, meropenem, and imipenem, respectively. We reported 33, 23, and 18% of CPE isolates non-susceptible to tigecycline, fosfomycin, and colistin, respectively. NDM producers were more frequently non-susceptible to meropenem (84%) than to imipenem (66%). All isolates ($n = 7$) that harboured bla_{IMI} gene were resistant to colistin. The three isolates harbouring bla_{IMP-10} were all resistant to the six antimicrobials tested.

Molecular genotyping

PFGE analysis of the 26 *K. pneumoniae* isolates retrieved one cluster and three major pulsotypes: Cluster A including four ST2193 isolates, pulsotype B including two ST147 isolates, pulsotype C including four ST17 isolates, and pulsotype D including three ST1562 isolates. These 13 isolates harboured both bla_{NDM-1} and $bla_{CTX-M-15}$; the isolate KP16 (cluster A) co-expressed bla_{NDM-1} , $bla_{OXA-181}$, and $bla_{CTX-M-15}$ (Fig. 2). The patients who shared the pulsotypes B and D were hospitalized in the burn unit and those sharing the pulsotype C were hospitalized in the ICU of the Northern University Hospital. The four patients with the *K. pneumoniae* ST2193 (cluster A) came from Mauritius. All *E. coli* isolates displayed different pulsotypes (Fig. 2). Eight STs were identified,

Table 1 Demographic and clinical data of patients with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (2011–2016, Reunion Island, France). ^a Patients can report multiple isolate sites for each detected CPE. Six patients harboured the same CPE in two isolate sites

Demographics	Number (%) of cases
Gender (n = 53)	
Male	37 (69.8)
Female	16 (30.2)
Age (n = 53)	
0–18	9 (17)
19–64	28 (52.8)
≥ 65	16 (30.2)
median age	52
Comorbidities (n = 53)	
high blood pressure	12 (22.6)
cancer	10 (18.9)
diabetes mellitus	8 (15.1)
obesity	6 (11.3)
ischemic heart disease	5 (9.4)
chronic obstructive pulmonary disease	5 (9.4)
liver cirrhosis	2 (3.8)
Hospital ward (n = 53)	
medical	27 (50.9)
ICU	19 (35.9)
surgical	5 (9.4)
other	2 (3.8)
medical evacuation	25 (47.2)
Isolate site (n = 67) ^a	
rectal swab / stool	49 (73.1)
urine	9 (13.4)
blood	4 (6)
sputum	3 (4.5)
skin / soft tissue	2 (3)
Exposure to carbapenems (n = 51)	
imipenem	9 (17.6)
meropenem	3 (5.9)
no exposure	39 (76.5)
Infections / Colonizations (n = 53)	
infection	8 (15.1)
colonization	45 (84.9)
Cross-transmission (n = 53)	
yes	7 (13.2)
no	46 (86.8)

with seven isolates belonging to the clonal complex CC10 (ST167, $n = 5$; ST10, $n = 2$). These isolates harboured bla_{NDM-1} ($n = 1$), bla_{NDM-4} ($n = 1$), bla_{NDM-5} ($n =$

3), and bla_{NDM-6} ($n = 1$) and $bla_{OXA-181}$ ($n = 1$) genes. The nine carbapenemase-producing *E. cloacae* isolates clustered in two major pulsotypes. The pulsotype E (two ST106 isolates with bla_{NDM-1}) was shared by two patients from the burn unit of Northern University Hospital, while the pulsotype F (six ST820 isolates harbouring bla_{IMI-1}) came from patients previously hospitalized in Mayotte Island. The six bla_{NDM-1} *C. freundii* isolates had unique pulsotypes. In contrast, the three *S. marcescens* isolates belonged to the same pulsotype G, harboured bla_{IMP-10} , and came from three patients previously hospitalized in the same private clinic in Mauritius.

We found six episodes of cross-transmission. Two of them (*E. cloacae* ST820 – pulsotype F, and *S. marcescens* pulsotype G) gathered patients from the same origin (Mayotte/Comoros and Mauritius, respectively). The other four episodes of cross-transmission of CPE occurred in the Northern University Hospital. The *K. pneumoniae* ST147 (bla_{NDM-1} ; pulsotype B) was shared by two patients with no history of travel abroad. *K. pneumoniae* ST17 (bla_{NDM-1} ; pulsotype C) has been possibly transmitted in ICU from a patient who had travelled in Madagascar (KP1) to three patients who had stayed in Reunion Island (KP2, KP6, KP8). Likewise, *K. pneumoniae* ST1562 (bla_{NDM-1} ; pulsotype D) have been possibly transmitted in the burn unit from a Madagascar-linked patient (KP4) to two patients who had stayed in Reunion Island (KP5, KP26). However, the low percentage of similarity of these three isolates (~75%) made it difficult to draw firm conclusions and could suggest an indirect transmission. Similarly, *E. cloacae* ST106 (bla_{NDM-1} ; pulsotype E) has been transmitted in the burn unit from a Mayotte-related patient (Eclo2) to one patient with no history of travel abroad. Overall, we found that 16 out of the 53 CPE cases in Reunion Island were not - directly or indirectly - linked to a foreign country. Since we could have missed less obvious links between CPE carriers and foreign countries, we can consider that a maximum of 30.2% of CPE cases in the Reunion island were autochthonous. In contrast, 37 patients (69.8%) were linked to a foreign country, directly ($n = 31$; with a history of travel abroad) or indirectly ($n = 6$; through the contact with a CPE patient who had travelled abroad).

Discussion

The global emergence of CPEs is a growing concern and data from the Southern Indian Ocean area are scarce. Here we report the first epidemiological and genotyping analysis of CPEs in an island of this area over a six-year period.

Our study reports an increasing number of CPE cases from 2011 to 2016, in line with the results of surveillance conducted by Santé Publique France institute in

Table 2 Distribution of 61 CPE isolates harbouring 63 carbapenemase-encoding genes (2011–2016, Reunion Island, France). ^a Two isolates harboured two carbapenemase-encoding genes: one *K. pneumoniae* isolate harboured *bla*_{NDM-1} and *bla*_{OXA-181}, and one *E. coli* isolate harboured *bla*_{NDM-1} and *bla*_{VIM-2}

Species	Type of carbapenemase-encoding genes ^a											Total
	<i>bla</i> _{NDM}					<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{IMI}		<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM}		
	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{NDM-4}	<i>bla</i> _{NDM-5}	<i>bla</i> _{NDM-6}	<i>bla</i> _{NDM-7}	<i>bla</i> _{OXA-181}	<i>bla</i> _{IMI-1}	<i>bla</i> _{IMI-13}	<i>bla</i> _{IMP-10}	<i>bla</i> _{VIM-2}		
<i>K. pneumoniae</i>	24		1		1	1 ^a						27
<i>E. coli</i>	6	1	4	1		1					1 ^a	14
<i>E. cloacae</i>	3						6					9
<i>C. freundii</i>	6											6
<i>S. marcescens</i>									3			3
<i>E. asburiae</i>								1				1
<i>E. kobei</i>	1											1
<i>P. mirabilis</i>	1											1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1											1
Total	42	1	5	1	1	2	6	1	3	1		63

France [32]. Among the French regions, Reunion Island has the fourth highest CPE incidence with 3.8 episodes per 100,000 inhabitants over the period 2004–2015 [32]. The origin of CPE carriers differs between Reunion Island and mainland France. Hence, the proportion of CPE cases in mainland France who had travelled abroad was 47% over the period 2004–2015 and decreased over time. This proportion is higher in the Reunion Island, with 58.5% (31/53) of the CPE cases between 2011 and 2016 who had travelled abroad. This difference most probably results from the growing population flows between the Indian Ocean islands, and the increasing number of medical evacuations towards Reunion Island (125 in 2011 vs. 300 in 2016). Patients repatriated from Mauritius likely had the highest rate of CPE carriage.

While this country provides 5% of the medical evacuations, 35.5% (11/31) of CPE cases in Reunion Island with an external origin came from Mauritius (20.8% of all CPE cases).

CPE patients with no history of travel abroad represented 41.5% ($n = 22$) of the CPE cases. Genotyping analysis suggested three episodes of cross-transmissions in the UHRI of isolates recovered from patients who had travelled abroad. Overall, only 30.2% of all CPE cases ($n = 16$) had no direct or indirect (i.e. via a cross-transmission) link with a foreign country. This proportion of cases unrelated abroad is low compared to French national data over the same period (53%). This result is probably linked to the more recent introduction of CPEs on Reunion Island (2011 vs. 2004 in mainland

Table 3 Antimicrobial susceptibilities of the 61 CPE isolates (2011–2016, Reunion Island, France). ^a Two isolates harboured two carbapenemase-encoding genes: one *K. pneumoniae* isolate harboured *bla*_{NDM-1} and *bla*_{OXA-181}, and one *E. coli* isolate harboured *bla*_{NDM-1} and *bla*_{VIM-2}. ^b The clinical breakpoints for imipenem (0.125–4) were used to determine the susceptibility of the isolate of *P. mirabilis*. ^c Because of the intrinsic resistance of the *P. mirabilis* species to tigecycline, one isolate of *P. mirabilis* harbouring *bla*_{NDM-1} was excluded for the calculation of non-susceptibility rate of tigecycline. The PK/PD clinical breakpoints for tigecycline (EUCAST 2019; 0.5–0.5) were used to determine the susceptibility of other isolates than *E. coli*. ^d Because of the intrinsic resistance of the *S. marcescens* and *P. mirabilis* species to colistin, one isolate of *P. mirabilis* harbouring *bla*_{NDM-1} and 3 isolates of *S. marcescens* harbored *bla*_{IMP-10} were excluded for the calculation of non-susceptibility rate of colistin (N.D.: not determined)

Antimicrobials	Carbapenemase-encoding genes (% of non-susceptible isolates)					MIC Range (mg/L)		MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)
	<i>bla</i> _{NDM} ^a	<i>bla</i> _{IMI}	<i>bla</i> _{IMP-10}	<i>bla</i> _{OXA-181}	Total	Min.	Max.		
	($n = 50$)	($n = 7$)	($n = 3$)	($n = 1$)	($n = 61$)				
Ertapenem	96	71.4	100	0	91.8	0.25	32	8	32
Imipenem	66 ^b	100	100	0	70.5 ^b	0.5	32	6	32
Meropenem	84	14.3	100	0	75.4	1	32	6	32
Tigecycline	34.7 ^c	14.3	100	0	33.3 ^c	0.032	24	0.38	6
Colistin	6.1 ^d	100	ND ^d	0	17.5 ^d	0.06	64	0.25	32
Fosfomycin	22	0	100	0	23	0.125	1024	12	128

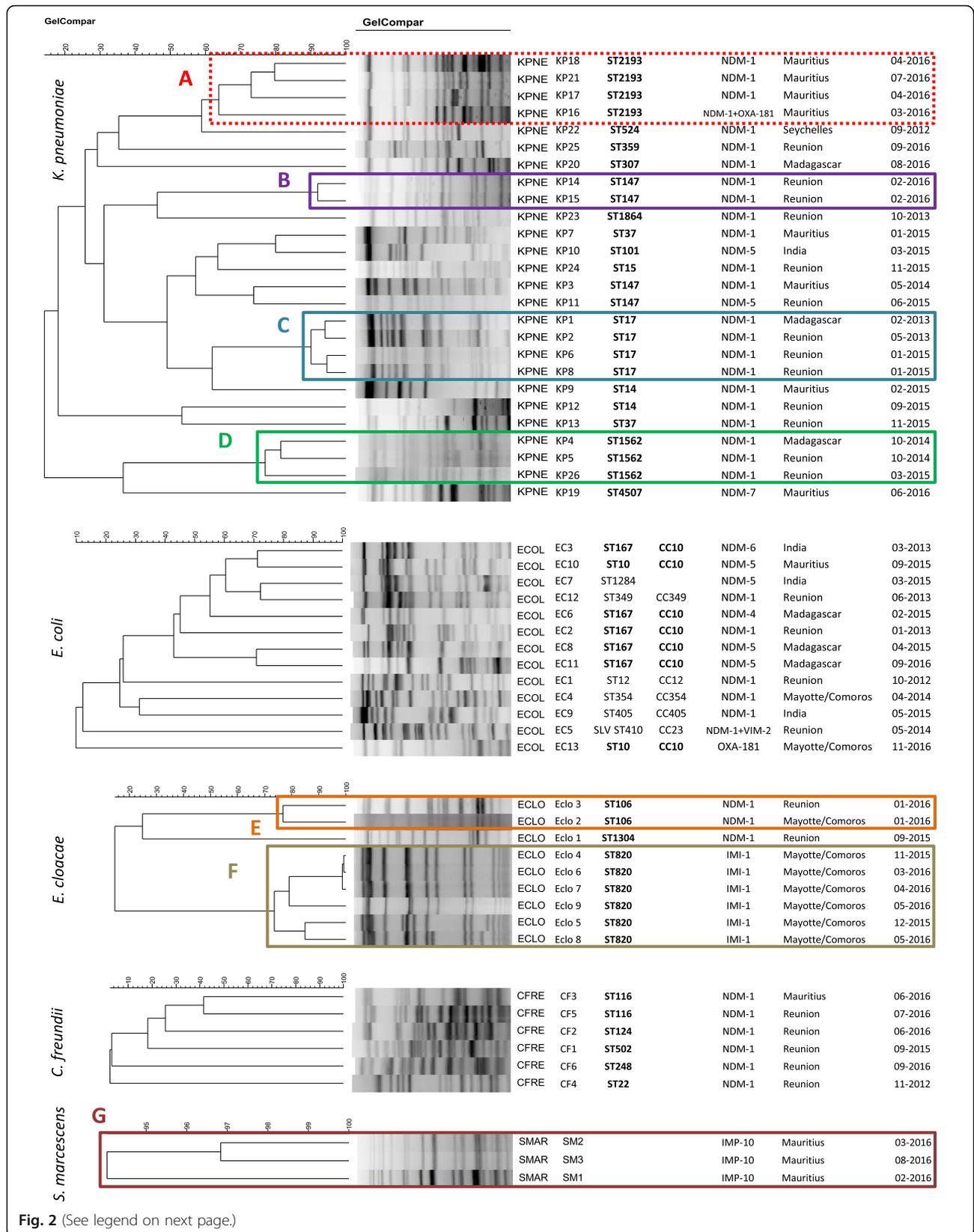


Fig. 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 2 Molecular genotyping (PFGE and MLST analysis) applied to 57 CPE isolates of *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, and *S. marcescens* (2011–2016, Reunion Island, France). There is not MLST scheme definition for *S. marcescens*. Data presented: PFGE pattern, bacterial species (KPNE, *K. pneumoniae*; ECOL, *E. coli*; ECLO, *E. cloacae*; CFRE, *C. freundii*; SMAR, *S. marcescens*), sequence type, clonal complex, carbapenemase(s) produced, foreign country visited by the patient within the year before CPE isolation, month and year of CPE isolation. The similarity scales are specific of each bacterial species. The optimization and band-tolerance values used for PFGE dendrogram were 1%

France) and also highlights the strong import pressure to which this French Overseas Territory is subjected.

The most prevalent resistance mechanism was *bla*_{NDM} (79.4%). This epidemiology is radically different from that in mainland France (dominated by *bla*_{OXA-48-like}) and reflects the connection between Reunion Island and Indian sub-continent mainly via Mauritius and Seychelles islands. Spread of *bla*_{NDM} in Southern Africa is more complex. NDM-1 carbapenemase was successively described in Kenya and South Africa in 2011, in Tanzania in 2014, and in Madagascar in 2015 [12, 13, 33, 34]. However, tracking *bla*_{NDM} dissemination is difficult because Indian population travel in all these countries directly or via the Indian Ocean islands. Reunion Island has already provided France with NDM producers over the last decade [32] but can become the predominant gateway with the spread of NDM producers in the SIOA. For example, Reunion Island was the second largest supplier of NDM producers in France in the period 2004–2015 (28 isolates for just 850,000 inhabitants), tied with the Provence-Alpes-Côte d'Azur region (28 isolates, 5.1 million inhabitants) and behind the Ile de France region (164 isolates, 12.2 million inhabitants) [32]. The second resistance mechanism was *bla*_{IMI} (11.1%). The proportion of IMI carbapenemase is ten times higher in Reunion than in mainland France [35]. This high prevalence is due to an on-going outbreak of IMI-1 *E. cloacae* in Mayotte Island [36]. The third most prevalent resistance mechanism was *bla*_{IMP-10} (4.8%), harboured by a *S. marcescens* isolates. This proportion is also higher than that reported in mainland France (0.2%) and is presumably due to a nosocomial transmission in a Mauritian clinic [35].

The global rate of resistance to colistin (17.5%) was higher than that reported in the 2016 French National survey (6.8% in CPE) [35]. This high rate was probably due to the chromosomally encoded hetero-resistance to colistin and depending on the PhoP/PhoQ two component regulatory system of the IMI-1 *E. cloacae* strains (cluster XI) which accounted for 9.8% of the isolates [37]. The rate of resistance to colistin in NDM producers (that included isolates of intrinsically resistant *Proteus* sp. or *Serratia* sp.) was similar to national data (8.0% vs. 8.4%). No isolate harboured *mcr* plasmid-mediated resistance genes. The emergence of IMP-10 *S. marcescens* is of concern because the three isolates recovered were non-susceptible to all antimicrobials commonly used to treat CPE infections (Table 3).

Genotypic data (PFGE and MLST) identified 25 CPEs isolated from patients with no history of travel abroad. PFGE analysis suggested that six of them (24%) acquired a CPE isolate from a patient who had travelled abroad (Fig. 2). However, the low percentage of similarity of some isolates (~75% for pulsotype D or F) does not allow to assert this transmission with certainty and constitutes a limitation of our study. The high diversity of the genetic background of the CPE isolated from patients with no direct or indirect link with a foreign country suggests multiple transfers of *bla*_{NDM} among local isolates of Reunion Island. On the other hand, *K. pneumoniae* ST147 and *E. coli* ST167 have already been shown to harbour *bla*_{NDM} and could participate in clonal dissemination of this carbapenemase family [38, 39].

Conclusions

About two-thirds of the patients and the isolates collected in Reunion Island were linked with a foreign country. Therefore, we can reasonably think that the present collection mirrors the epidemiology of CPE of the Indian Ocean area. Besides, most CPE isolates with no link with a foreign country are not clonally related, demonstrating the local spread of carbapenemase-encoding genes (i.e. *bla*_{NDM}) in a polyclonal bacterial population.

Abbreviations

CC: Clonal Complex; CPE: Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae*; CTX-M: Cefotaximase-Munich; ESBL: Extended Spectrum Beta Lactamase; EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; FANRCAR: French Associated National Reference Centre for Antibiotic Resistance; FELIN: Fédération de Lutte contre les Infections Nosocomiales; ICU: Intensive Care Unit; IMI: Imipenemase; IMP: Imipenemase; IRR: Incidence Rate Ratio; MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight; MDR: Multi Drug Resistant; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; ND: Not Determined; NDM: New Delhi Metallobetalactamase; OXA: Oxacillinase; PCR: Polymerase Chain Reaction; PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis; SHV: Sulfo Hydryl Variable; SIOA: Southwest Indian Ocean area; ST: Sequence Type; TEM: Temoneira; UHRI: University Hospital of Reunion Island; UPGMA: Unweighted Pair Group using Arithmetic Averages; XDRB: eXtensively Drug Resistant Bacteria

Acknowledgments

The authors thank the French Associated National Reference Centre for Antibiotic Resistance for carbapenemase PCR confirmation and sequencing. The authors thank Houssein Gbaguidi Haore for statistical analysis.

Authors' contributions

GM designed the study, contributed to acquisition, analysis and interpretation of data; drafted the manuscript and has given final approval of this version; PC, DM, MT, PS, AL contributed to analysis and interpretation of data, drafted the manuscript and have given final approval of this version;

NT, BR, MCJB, NL, CBC, MR, SP, AL, GM, JA, NA contributed to acquisition of data and have given final approval of this version; PM, OB, XB, contributed to analysis and interpretation of data, revised the manuscript critically for important intellectual content and have given final approval of this version; DH designed the study, contributed to acquisition, analysis and interpretation of data; drafted the manuscript and has given final approval of this version. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was partly supported by the Indian Ocean Regional Health Agency (ARS-OI).

Availability of data and materials

The datasets analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the ethical committee 'Comité de Protection des Personnes - Ouest III' under the number 2017-A02640–53.

Consent for publication

All parties consented to publications of results.

Competing interests

None declared.

Author details

¹Laboratoire de Bactériologie, CHU Félix Guyon, Allée des Topazes, 97400 Saint-Denis, La Réunion, France. ²UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, Université de La Réunion, Sainte-Clotilde, La Réunion, France. ³Laboratoire d'Hygiène Hospitalière, CHRU Jean Minjoz, Besançon, France. ⁴UMR Chrono-Environnement, CNRS 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France. ⁵Service d'hygiène hospitalière, CHU Félix Guyon, Saint-Denis, La Réunion, France. ⁶Laboratoires Réunilab, Sainte-Clotilde, La Réunion, France. ⁷Laboratoires Cerballiance, Le Port, La Réunion, France. ⁸Laboratoire de Bactériologie, Groupe Hospitalier Sud Réunion, Saint-Pierre, La Réunion, France. ⁹Laboratoire de biologie, Centre Hospitalier Gabriel Martin, Saint-Paul, La Réunion, France. ¹⁰Laboratoire de biologie, Groupe Hospitalier Est Réunion, Saint-Benoit, La Réunion, France. ¹¹Service de Réanimation polyvalente. Département d'Informatique clinique, CHU Félix Guyon, Saint-Denis, La Réunion, France.

Received: 16 August 2019 Accepted: 14 February 2020

Published online: 19 February 2020

References

- Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL. the European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(45).
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791–8.
- Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):413–31.
- Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1119–25.
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol.* 2011;6(6):653–66.
- Akova M, Daikos GL, Tzouveleki L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):439–48.
- Borer A, Saidel-Odes L, Riesenberk K, Eskira S, Peled N, Nativ R, et al. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30(10):972–6.
- Poirel L, Lascols C, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Mauritius. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):598–9.
- Holman AM, Allyn J, Miltgen G, Lugagne N, Traversier N, Picot S, et al. Surveillance of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the Indian Ocean region between January 2010 and December 2015. *Med Mal Infect.* 2017;47(5):333–9.
- Cabanes F, Lemant J, Picot S, Simac C, Cousty J, Jalin L, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella* Metallo-Beta-lactamase (NDM-1) producers on Reunion Island. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3812.
- Potron A, Rondinaud E, Poirel L, Belmonte O, Boyer S, Camiade S, et al. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41(4):325–9.
- Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):934–6.
- Mushi MF, Mshana SE, Imrizalioglu C, Bwanga F. Carbapenemase genes among multidrug resistant gram negative clinical isolates from a tertiary hospital in Mwanza. *Tanzania Biomed Res Int.* 2014;2014:303104.
- Perovic O, Britz E, Chetty V, Singh-Moodley A. Molecular detection of carbapenemase-producing genes in referral *Enterobacteriaceae* in South Africa: a short report. *South Afr Med J.* 2016;106(10):975–7.
- Zowawi HM, Balkhy HH, Walsh TR, Paterson DL. β -Lactamase production in key gram-negative pathogen isolates from the Arabian peninsula. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(3):361–80.
- Zowawi HM, Sartor AL, Balkhy HH, Walsh TR, Al Johani SM, AlJindan RY, et al. Molecular characterization of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the countries of the Gulf cooperation council: dominance of OXA-48 and NDM producers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(6):3085–90.
- Hall JM, Corea E, Sanjeevani HDA, Inglis TJJ. Molecular mechanisms of β -lactam resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Sri Lanka. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 8):1087–92.
- Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2006–2007. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1274–8.
- Avril C, Simac C. Réseau de surveillance régional des résistances aux antibiotiques, La Réunion. Bilan annuel 2015. ARLIN-FELIN Réunion-Mayotte. <http://www.felin.re/spip.php?rubrique67>
- Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. Trends in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill.* 2017;22(6).
- Gauthier L, Dortet L, Cotellon G, Creton E, Cuzon G, Ponties V, et al. Diversity of Carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolates in France in 2012–2013. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;27, 62(8).
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2019. Version 2, Mai 2019. http://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/05/CASFM2019_V2_0_MAI.pdf
- Bréchet C, Plantin J, Sauget M, Thouverez M, Talon D, Cholley P, et al. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin Infect Dis.* 2014;58(12):1658–65.
- Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6437–40.
- McMullen AR, Yarbrough ML, Wallace MA, Shupe A, Burnham C-AD. Evaluation of genotypic and phenotypic methods to detect Carbapenemase production in gram-negative bacilli. *Clin Chem.* 2017;63(3):723–30.
- Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(3):487–9.
- Cholley P, Thouverez M, Gbaguidi-Haore H, Sauget M, Slekovec C, Bertrand X, et al. Hospital cross-transmission of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Med Mal Infect.* 2013;43(8):331–6.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233–9.
- Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 2006;60(5):1136–51.
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8):4178–82.

31. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. Multilocus Sequence Typing (MLST) for Characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One*. 2013;8(6).
32. Épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) en France, de 2004 à 2015. Bilan épidémiologique national au 31 Décembre 2015. Santé Publique France. <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/Enterobacteries-productrices-de-carbapenemases-EPC/Episodes-impliquant-des-EPC-en-France-Situation-epidemiologique-du-31-decembre-2015>.
33. Lowman W, Sriruttan C, Nana T, Bosman N, Duse A, Venturas J, et al. NDM-1 has arrived: first report of a carbapenem resistance mechanism in South Africa. *S Afr Med J*. 2011;101(12):873–5.
34. Chereau F, Herindrainy P, Garin B, Huynh B-T, Randrianirina F, Padget M, et al. Colonization of extended-spectrum- β -lactamase- and NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* among pregnant women in the community in a low-income country: a potential reservoir for transmission of multiresistant *Enterobacteriaceae* to neonates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3652–5.
35. Plésiat P, Cattoir V, Bonnet R, Dortet L. Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques. Rapport d'activités. 2016; http://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_CNR_2016.pdf.
36. Miltgen G, Bonnin RA, Avril C, Benoit-Cattin T, Martak D, Leclaire A, et al. Outbreak of IMI-1 Carbapenemase-producing colistin-resistant *Enterobacter cloacae* on the French island of Mayotte (Indian Ocean). *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52(3):416–20.
37. Guérin F, Isnard C, Sinel C, Morand P, Dhalluin A, Cattoir V, et al. Cluster-dependent colistin hetero-resistance in *Enterobacter cloacae* complex. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Nov;71(11):3058–61.
38. Giske CG, Fröding I, Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Toleman M, Livermore D, et al. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of blaNDM-1 in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2735–8.
39. Zhang R, Liu L, Zhou H, Chan EW, Li J, Fang Y, et al. Nationwide surveillance of clinical Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) strains in China. *EBioMedicine*. 2017;19:98–106.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



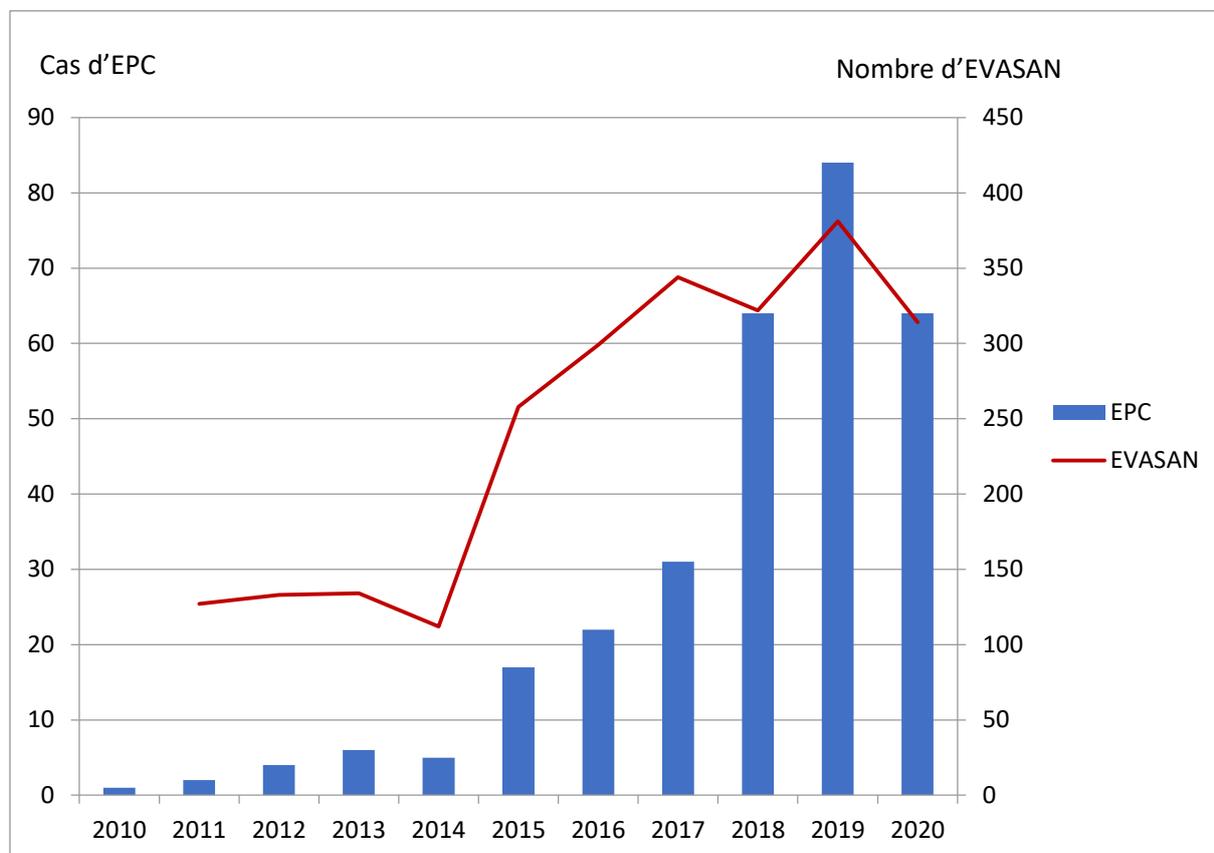
Données supplémentaires :

Figure 56. Évolution des cas d'EPC détectés sur l'île de la Réunion entre 2010 et 2020 et nombre d'EVASAN au CHU de La Réunion sur la même période.

Outre l'augmentation déjà décrite dans l'article entre 2011 et 2016, on note également une forte augmentation des cas en 2017-2018-2019 (Figure 56). Cette hausse est due d'une part à un nombre plus élevé de cas importés mais également liée à une augmentation significative des cas d'EPC au CHU Sud (2016, n=4 ; 2017, n=13 ; 2018, n=26 ; 2019, n=27 ; 2020, n=13) sur la période. Il existait une sur-représentation des *C. freundii* au CHU Sud sur cette période correspondant à une épidémie polyclonale en cours d'investigation. Enfin, si cette comparaison n'est pas tout à fait exacte puisqu'elle compare les EPC de l'ensemble de l'île, aux EVASAN du CHU de la Réunion, on note une corrélation relativement bonne entre nombre de cas d'EPC et nombre d'EVASAN.

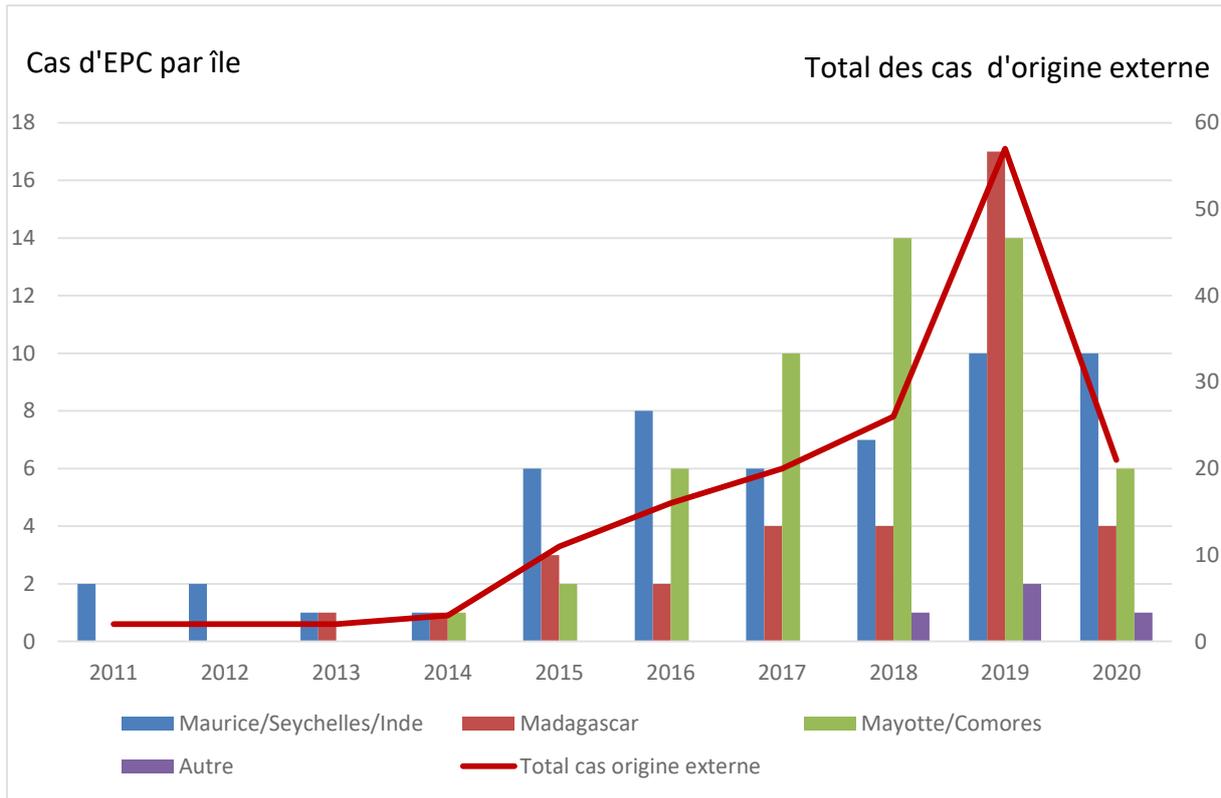


Figure 57a. Évolution des cas d'EPC d'origine externe détectés sur l'île de la Réunion entre 2011 et 2020 en fonction de l'origine géographique des patients (île ou groupements d'îles géographiquement proches).

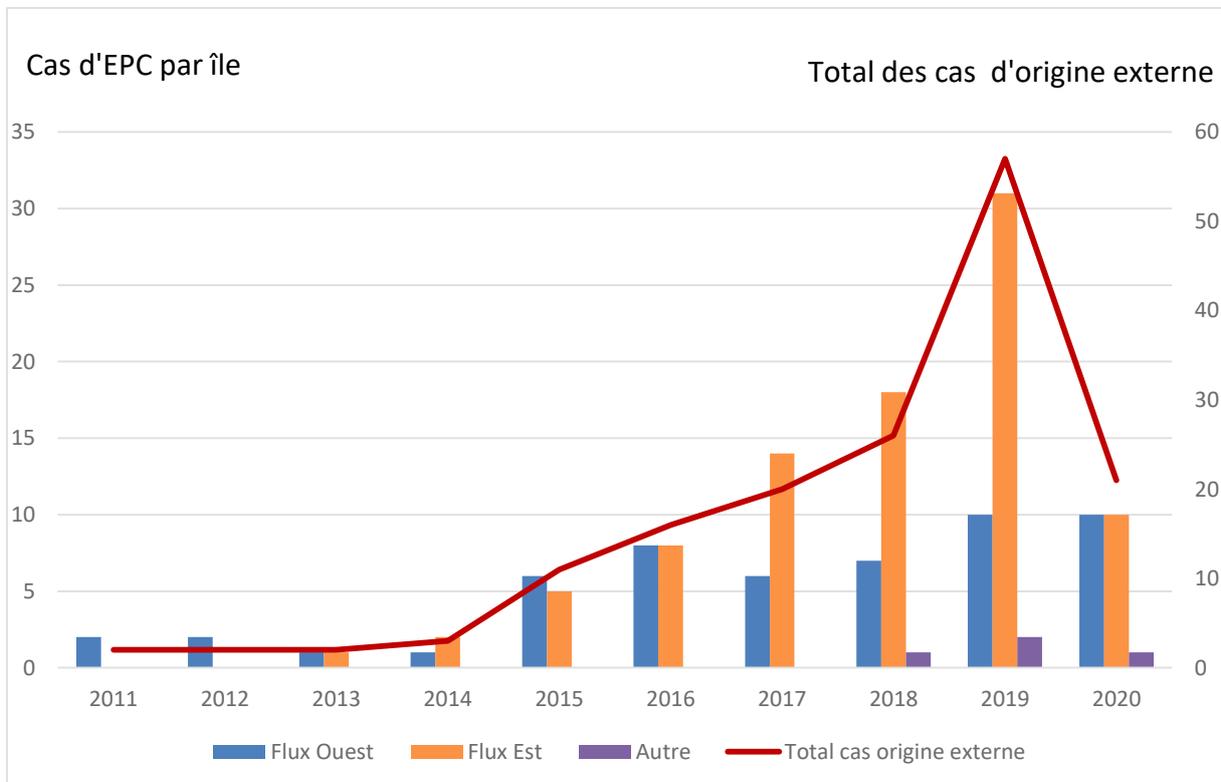


Figure 57b. Évolution des cas d'EPC d'origine externe détectés sur l'île de la Réunion entre 2011 et 2020 en fonction de l'origine géographique des patients (flux Ouest ou flux Est).

2ème PARTIE : TRAVAIL SCIENTIFIQUE

Pour chacun des 2 graphiques, la courbe rouge correspond à l'évolution de nombre total de cas d'EPC d'origine externe. Pour la Figure 57b, le flux Ouest correspond aux îles de Maurice, des Seychelles ou aux patients arrivant directement d'Inde. Le flux Est correspondant aux Comores (avec Mayotte) et Madagascar.

On note une augmentation des cas liés aux Comores/Mayotte sur la période 2016-2019 qui ont progressivement supplanté les cas originaires de Maurice/Seychelles/Inde (Figure 57a). Si le nombre de cas originaire de l'Ouest et de l'Est étaient analogues jusqu'en 2016, on note que les cas originaires de l'Est ont ensuite largement supplantés ceux originaires de l'Ouest (Figure 57b). Il faut toutefois noter que, dans la forte augmentation du nombre de cas originaires de l'Est en 2019, une part non négligeable est liée à l'augmentation des cas liés à Madagascar.

Cette étude a permis de déterminer que les cas d'EPC importés et les cas autochtones avaient une répartition d'environ 60% et 40%, respectivement. Cependant, la comparaison génotypique des souches a permis de démontrer que les souches réellement sans lien direct (voyage du patient) ou indirect (transmission à partir d'un cas importé), représentaient plutôt 30% des cas d'EPC recensés à La Réunion entre 2011 et 2016. On peut ainsi considérer que l'épidémiologie des EPC à La Réunion reflète celle des EPC dans la zone. De plus, l'île Maurice représentait le 1^{er} territoire pourvoyeur d'EPC, malgré le fait que seuls 5% des EVASAN provenaient de cette île. Nous avons pu établir que le gène *bla*_{NDM} était très majoritaire (env. 80%) dans cette population d'EPC, confirmant l'influence du sous-continent Indien sur notre épidémiologie locale. Cette influence doit néanmoins être tempérée par l'introduction concomitante des EPC NDM en Afrique australe (Afrique du Sud, Kenya, Tanzanie), qui pourrait également concourir à des cas d'importation. Cette analyse a également mis en exergue certaines particularités épidémiologiques comme des souches de *S. marcescens* IMP-10 (jamais décrite dans la littérature et quasi toto-résistantes) et surtout une population clonale de *E. cloacae* IMI-1. Enfin, la population des isolats sans aucun lien direct ou indirect avec l'étranger était génotypiquement différente (STs et pulsotypes), suggérant de multiples acquisitions indépendantes mais faisant craindre un début de dissémination communautaire à La Réunion. Il existait cependant un nombre conséquent d'isolats de *E. coli* CC10 (ST10-ST167) et de *K. pneumoniae* ST147 pouvant faire suspecter une participation de ces clones, respectivement décrits en Chine et en Inde, à l'importation de ces EPC à La Réunion.

La figure 56 illustre l'évolution plus récente des EPC à La Réunion. L'augmentation du nombre de cas d'EPC s'est poursuivie sur la période 2017-2020 et s'est même accrue. On notera que le nombre de cas d'EPC est relativement bien corrélé au nombre d'EVASAN au CHU de La Réunion, signant ainsi cette forte proportion de souches issues de cas importés. Sur la période 2017-2020, cette proportion de patients ayant un lien avec l'étranger se rapprochait de 70%. De plus, la situation était différente entre les 2 sites du CHU de la Réunion. Sur le site Nord, prenant en charge le plus d'EVASAN, la proportion de des cas importés et de l'ordre de 80%, avec très peu de transmissions croisées secondaires. Sur le site Sud, prenant en charge moins d'EVASAN, les cas importés ne représentaient qu'environ 1/3 des cas du site, avec une surreprésentation de l'espèce *C. freundii*. Cette situation fait craindre une épidémie au sein du CHU Sud, en lien avec des locaux vétustes avec un nombre limité de sanitaires par rapport au nombre de lits.

La Réunion est ainsi un DOM soumis à une forte pression d'importation en EPC, et les EVASAN sont un des canaux par lesquels ces souches parviennent sur ce territoire. S'il paraît plus difficile d'agir directement sur le portage communautaire de ces EPC, cette étude a permis d'affiner la stratégie de lutte contre l'importation et la transmission nosocomiale de ces souches au CHU de La Réunion. Après

une réunion de travail avec l'EOH du service d'hygiène hospitalière, il a été décidé un suivi particulier des EVASAN de l'île Maurice car les données disponibles suggèrent une très forte prévalence des EPC sur cette île (323). Pour chaque EVASAN de patient précédemment hospitalisé à Maurice, l'EOH vérifie que le patient a bien son dépistage le jour de son hospitalisation et sensibilise les équipes au maintien des précautions complémentaires contact (PCC) jusqu'à l'obtention d'un résultat négatif des dépistages de BMR et de BHR. À ce dispositif s'est rajouté en 2020 une recherche systématique tri-sites (gorge, aisselle, rectum) de *Candida auris* suite à des cas d'importation issus de Maurice. Cette étude a ainsi permis d'identifier des profils de patients à risque qui sont aujourd'hui spécifiquement suivis. Nous tentons chaque année de mettre à jour ces données afin de suivre l'évolution de cette épidémiologie. Ces 3 dernières années, nous avons ainsi noté une inversion de ce flux d'importation des EPC, avec un flux Ouest (et notamment originaires de l'archipel des Comores) supérieur au flux Est des îles plus liées à l'Inde (Seychelles, Maurice) avec notamment de nombreuses souches d'*E. coli* NDM-5 et OXA-181 ou cumulant ces 2 mécanismes.

3.3 Épidémie de *Enterobacter cloacae* producteurs de la carbapénèmase IMI-1 à Mayotte

Les carbapénèmases de type IMI ont été décrites pour la première fois aux Etats-Unis en 1984, avant la première utilisation de l'imipénème dans ce pays. Ces enzymes ont pour caractéristique d'hydrolyser fortement l'imipénème et les benzylpénicillines mais pas les C3G, rendant leur détection potentiellement difficile selon la méthodologie utilisée. Des souches de *E. cloacae* IMI-1 ont été détectées au CHU de La Réunion à partir d'octobre 2015 chez des patients précédemment hospitalisés au CHM. À partir de cette date, l'ensemble des souches de *E. cloacae* résistantes à l'imipénème au CHU de La Réunion ont été criblées pour la production d'une carbapénèmase de type IMI. De plus, une alerte relayée par le CPIAS a été transmise au CHM pour tenter d'identifier l'origine de ces isolats.

L'objectif de cette étude était de (i) évaluer la clonalité de ces isolats de *E. cloacae* IMI, (ii) déterminer le support génétique du gène *bla_{IMI-1}* et (iii) tenter de déterminer l'origine de cette épidémie à Mayotte en documentant les facteurs de risques d'exposition de ces patients par un questionnaire standardisé (Annexe 3).



Short Communication

Outbreak of IMI-1 carbapenemase-producing colistin-resistant *Enterobacter cloacae* on the French island of Mayotte (Indian Ocean)



Guillaume Miltgen^{a,b,*}, Rémy A. Bonnin^c, Catherine Avril^d, Thierry Benoit-Cattin^e, Daniel Martak^{f,g}, Alexandre Leclaire^a, Nicolas Traversier^a, Bénédicte Roquebert^{a,b}, Marie-Christine Jaffar-Bandjee^{a,b}, Nathalie Lugagne^h, Laurent Filleulⁱ, Marion Subirosⁱ, Anne-Marie de Montera^e, Pascal Cholley^{f,g}, Michelle Thouverez^g, Laurent Dortet^c, Xavier Bertrand^{f,g}, Thierry Naas^c, Didier Hocquet^{f,g}, Olivier Belmonte^a

^aLaboratoire de Bactériologie, CHU Félix Guyon, Saint-Denis, La Réunion, France

^bUMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, Université de La Réunion, Saint-Denis, La Réunion, France

^cEA7361: Structure, Dynamique, Fonction et Expression des β -lactamases à large spectre, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, LabEx Lermite, APHP, Hôpital Bicêtre, Centre National associé de la Résistance aux Antibiotiques, CHU Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

^dARLIN Réunion-Mayotte, Saint-Denis, La Réunion, France

^eCentre hospitalier de Mayotte, Mamoudzou, Mayotte, France

^fLaboratoire d'Hygiène Hospitalière, CHRU Jean Minjot, Besançon, France

^gUMR 6249, Laboratoire Chrono-Environnement, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

^hService d'hygiène hospitalière, CHU Félix Guyon, Saint-Denis, La Réunion, France

ⁱCIRE Océan Indien, Santé Publique France, Saint-Denis, La Réunion, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2018

Accepted 19 May 2018

Keywords:

*bla*_{IMI-1}
Carbapenemase
Outbreak
Enterobacter cloacae
Mayotte
French overseas island

ABSTRACT

The spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the Southwest Indian Ocean islands is poorly known. Here we describe an outbreak of colistin-resistant *Enterobacter cloacae* harbouring *bla*_{IMI-1} in the French overseas department of Mayotte. Between October 2015 and January 2017, all isolates of imipenem-non-susceptible *E. cloacae* at Mayotte Medical Center and University Hospital of Reunion Island were screened for carbapenemase production. Positive isolates were typed by pulsed-field gel electrophoresis and whole-genome sequencing (WGS)-based multilocus sequence typing (MLST), and all β -lactamase genes were identified by PCR and sequencing. Resistance profiles were determined by agar diffusion and Etest. Genetic support of the *bla*_{IMI-1} gene was determined by WGS. A total of 18 *E. cloacae* isolates harbouring *bla*_{IMI-1} were detected in 17 patients from Mayotte. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis showed 16 of the 18 strains to be clonally related and belonging to ST820. Based on clinical data, this outbreak most likely had a community origin. The *bla*_{IMI-1} gene in the 18 isolates was carried by a new variant of an integrative mobile element involving the Xer recombinases, called EcloIMEX-8. The *mcr-1-mcr-5* genes were absent from the collection. The isolates belonged to *E. cloacae* cluster XI, known to be colistin heteroresistant. Here we report the first outbreak of IMI-1-producing Enterobacteriaceae. IMI-1-producers may be underdetected in microbiology laboratories because of their unusual antimicrobial resistance profile (resistant to imipenem but with intermediate resistance to ertapenem and susceptible to extended-spectrum cephalosporins) and the absence of *bla*_{IMI-1} in the panel of genes targeted by molecular diagnostic kits.

© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

The emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) is currently a worldwide public-health issue [1]. Significant population flows from southern Africa and the Indian subcontinent to the Indian Ocean islands may contribute to the dissemination of these multidrug-resistant (MDR) bacteria in Mayotte and Reunion islands, two French overseas departments located in the

* Corresponding author. Present address: Laboratoire de Bactériologie, CHU Félix Guyon, Allée des Topazes, 97400 Saint-Denis, La Réunion, France. Tel.: +262 2 62 90 62 66.

E-mail address: guillaume.miltgen@chu-reunion.fr (G. Miltgen).

Southwest Indian Ocean, close to Madagascar, with a population of 250 000 and 850 000 inhabitants, respectively. The MDR screening programme carried out at Mayotte Medical Center (MMC) and Félix Guyon University Hospital (FGUH) of Reunion Island isolated *Enterobacter cloacae* producing the uncommon class A carbapenemase IMI-1 from several patients from Mayotte. Only sporadic cases of this chromosomally-encoded carbapenemase had been previously described in Europe, Asia and America [2–6]. IMI-1 was initially described in two clinical strains of *E. cloacae* isolated in California, USA, in 1984, and the first identification of the *bla*_{IMI-1} gene in France was reported in 2011 [3]. This class A β -lactamase has an enzymatic profile similar to that of the carbapenemase NmcA, which strongly hydrolyses imipenem and benzylpenicillin but poorly hydrolyses extended-spectrum cephalosporins [7]. The IMI-1 enzyme is inhibited by clavulanic acid and is induced by imipenem or ceftazidime [8]. The genetic support of chromosomally-encoded IMI carbapenemases was recently described as an integrative mobile element that exploits the Xer recombinases, named EcloMEX1–7 [9]. Here we evaluated the clonal spread of IMI-1-producing *E. cloacae* in Mayotte and characterised the phenotypic and genotypic features of its uncommon carbapenemase.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial isolates

Following detection of the first case of IMI-1, all isolates of *E. cloacae* non-susceptible to imipenem, i.e. with an inhibition zone diameter <22 mm in the disk diffusion assay based on European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recommendations, detected at MMC and/or FGUH between October 2015 and January 2017 were screened for carbapenemase production. *Enterobacter cloacae* isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) and were confirmed by *rpoB* sequencing [10]. The surfaces, U-bends and water of all rooms of MMC of the IMI-1-colonised patients were sampled.

2.2. Detection of IMI-1 carbapenemase

Isolates were screened for IMI-1 production using ChromID[®] CARBA SMART media (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France), Carba NP test (bioMérieux) and enzyme inhibition profiling performed using ROSCO tablets (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark), according to the manufacturer's recommendations. Presence of the *bla*_{IMI-1} gene was confirmed by PCR and sequencing [3]. Searches for other carbapenemase-encoding genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} and *bla*_{OXA-48}) were performed using the GeneXpert[®] system (Cepheid, Sunnyvale, CA). The environment of the rooms of IMI-1-colonised patients was sampled in June 2016 and October 2016: (i) 150 mL water samples (from the faucet, shower and toilet, if present) were filtered on 0.45- μ m filters, which were further deposited on Drigalski agar containing imipenem; and (ii) the swab samples of U-bends or surfaces were streaked on ChromID[®] CARBA SMART agar plates (bioMérieux) before incubation, according to the manufacturer's recommendations.

2.3. Antimicrobial susceptibility testing

The susceptibility of each isolate to ampicillin, ticarcillin, amoxicillin/clavulanic acid (AMC), piperacillin/tazobactam (TZP), ceftazidime, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, ertapenem, imipenem, meropenem, ofloxacin, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, tigecycline and fosfomycin was assessed by the disk diffusion method according to EUCAST 2015 recommendations. Minimum inhibitory

concentrations (MICs) of imipenem, meropenem and ertapenem were determined using Etest gradient strips (bioMérieux). Susceptibility to colistin was assessed by the broth microdilution method with the UMIC colistin kit (Biocentric, Bandol, France).

2.4. Whole-genome sequencing, strain typing and genotypic analysis

Enterobacter cloacae isolates were first genotyped by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) following digestion with the restriction enzyme *Xba*I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) as previously described [11]. BioNumerics software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) was used to create a DNA similitude matrix based on calculating the Pearson profile for pairwise isolate comparison. The dendrogram was built using the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) hierarchical algorithm. Pulsotypes were defined according to international recommendations [12]. Multilocus sequence typing (MLST) of *E. cloacae* isolates was performed as previously described [13]. Sequence types (STs) were assigned based on the PubMLST database (<https://pubmlst.org/ecloacae/>). Genomic DNA was extracted using an UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) from overnight cultures on lysogeny broth agar (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Quantification of genomic DNA was performed using a Qubit fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA) and the concentration was adjusted for library preparation. A Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, CA) was used for preparation of DNA libraries. The libraries were sequenced on an Illumina MiSeq 2000 sequencer (Illumina Inc.) with v.3 chemistry using 2 \times 150-bp paired-end reads. Assembled genomic DNA of the isolates was compared by single nucleotide polymorphism (SNP) analysis with the Basic Variant Detection tools from CLC Workbench 10.0.1 (QIAGEN Bioinformatics). Identification of acquired antimicrobial resistance genes was performed using the ResFinder 3.0 tool (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/resfinder/>) from the Center for Genomic Epidemiology (CGE). The genome was manually annotated using Geneious v.9 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) and the BLAST platform for gene and protein identification (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3. Results

A total of 18 IMI-1-producing *E. cloacae* isolates were retrieved from rectal swabs of 17 patients from Mayotte between October 2015 and January 2017 [1 patient had 2 different strains (E12a and E12b) with different antibiograms]. Most of the cases (8/11) at MMC were detected in the intensive care unit (ICU). At FGUH, the six cases were distributed across five units (Table 1). Overall, 0.6% and 0.9% of patients admitted in 2016 in the neonatal and adult ICU, respectively, carried IMI-1-producing *E. cloacae*. The sex ratio was 0.7 and the median age was 29 years (interquartile range 17–51 years). IMI-1-colonised patients came mostly from the Northeast region of Mayotte (Grande-Terre), near the town of Mamoudzou (seven cases) and the island of Petite-Terre (five cases) (Fig. 1). IMI-1-producing *E. cloacae* isolates were obtained and identified for 13 (76.5%) of the 17 patients at admission. Of the 17 IMI-1 carriers, 12 (70.6%) were co-colonised with another extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae, mostly *Escherichia coli* (10/12; 83.3%) and *Klebsiella pneumoniae* (2/12; 16.7%). All environmental samples (water, U-bends and surfaces; $n = 17$) tested negative for IMI-1-producing *E. cloacae*.

Sixteen isolates exhibited a similar and unusual antimicrobial resistance profile, being resistant to ampicillin, AMC, ticarcillin, ceftazidime, imipenem (MICs = 16–24 μ g/mL) and meropenem (MIC = 32 μ g/mL) and intermediate-resistant to ertapenem (MICs = 0.75–1 μ g/mL), but remaining susceptible to TZP, cefotaxime,

Table 1

Demographics and biological data of 17 patients colonised with IMI-1 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* retrieved from rectal swabs in Mayotte between October 2015 and January 2017.

Isolate ID	Date of isolation (MM/YYYY)	Hospital	Hospital unit	Sex/age (years)	Time between admission and detection (days)	Co-colonisation with ESBL-E	Type of ESBL-E
E1	10/2015	MMC	ICU	F/65	1	Yes	<i>Escherichia coli</i>
E2	11/2015	FGUH	Cardiology	M/57	1	Yes	<i>E. coli</i>
E3	11/2015	MMC	ICU	M/5	1	Yes	<i>E. coli</i>
E4	11/2015	FGUH	ICU	M/49	6	No	
E5	01/2016	MMC	ICU	F/51	1	Yes	<i>E. coli</i>
E6	02/2016	MMC	ICU	F/29	7	No	
E7	02/2016	MMC	ICU	F/17	1	No	
E8	03/2016	MMC	ICU	M/51	4	Yes	<i>E. coli</i>
E9	04/2016	FGUH	Visceral paediatric surgical	F/1	1	Yes	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
E10	05/2016	FGUH	Gynaecology and obstetrics	F/29	4	Yes	<i>E. coli</i>
E11	05/2016	FGUH	Cardiothoracic surgery	F/17	1	Yes	<i>E. coli</i>
E12a	06/2016	MMC	Neonatal	M/4	1	Yes	<i>E. coli</i>
E12b			ICU	months			
E13	09/2016	MMC	ICU	F/32	1	Yes	<i>K. pneumoniae</i>
E14	10/2016	MMC	Dialysis centre	M/72	0	Yes	<i>E. coli</i>
E15	11/2016	MMC	ICU	F/64	1	Yes	<i>E. coli</i>
E16	01/2017	MMC	Dialysis centre	F/18	0	No	
E17	01/2017	FGUH	Visceral paediatric surgical	M/2	1	No	

ESBL-E, extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae; MMC, Mayotte Medical Center; FGUH, Félix Guyon University Hospital; ICU, intensive care unit.

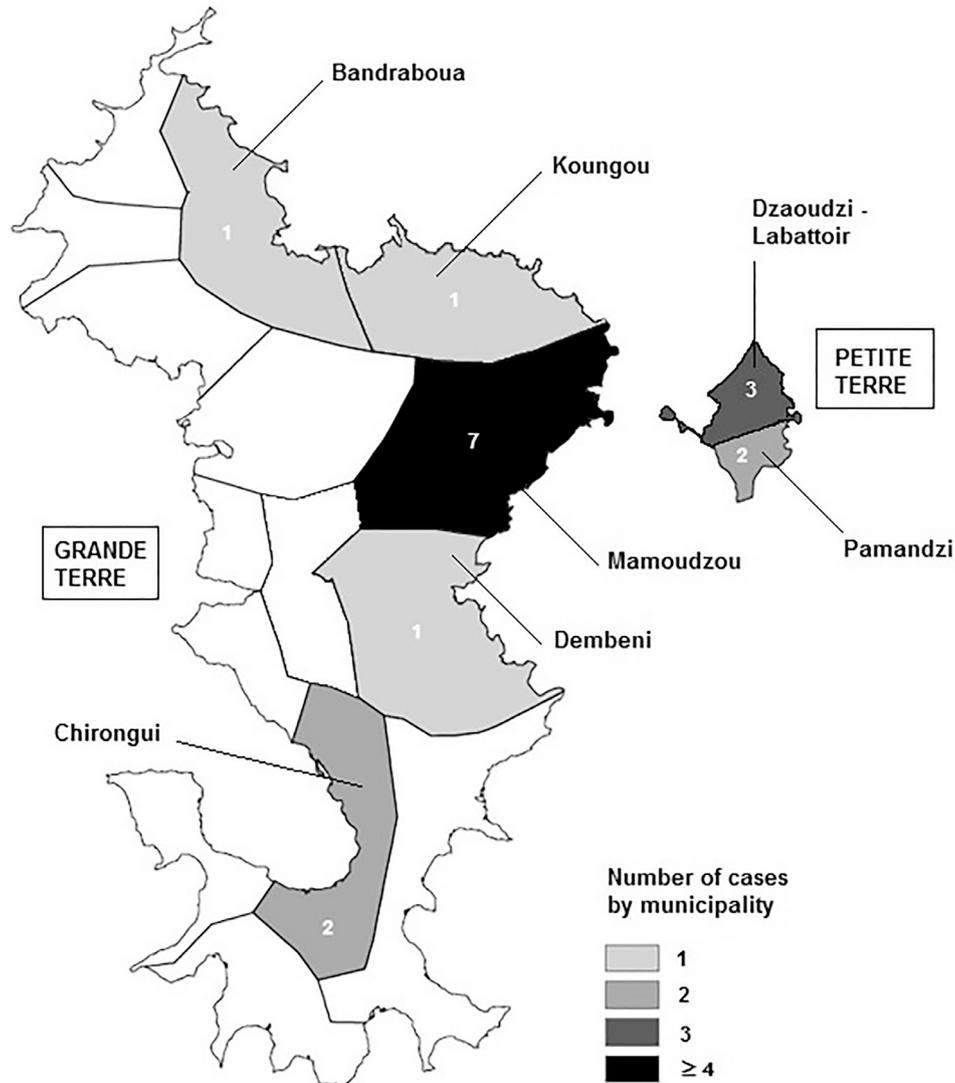


Fig. 1. Geographical distribution of patients colonised with IMI-1 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in Mayotte (Indian Ocean). The French overseas department of Mayotte consists of two islands: one large island, called Grande-Terre, and one small island, called Petite-Terre. The residential zip code could be obtained for the 17 colonised patients and the most affected municipality was Mamoudzou (7 cases), the administrative centre of the island.

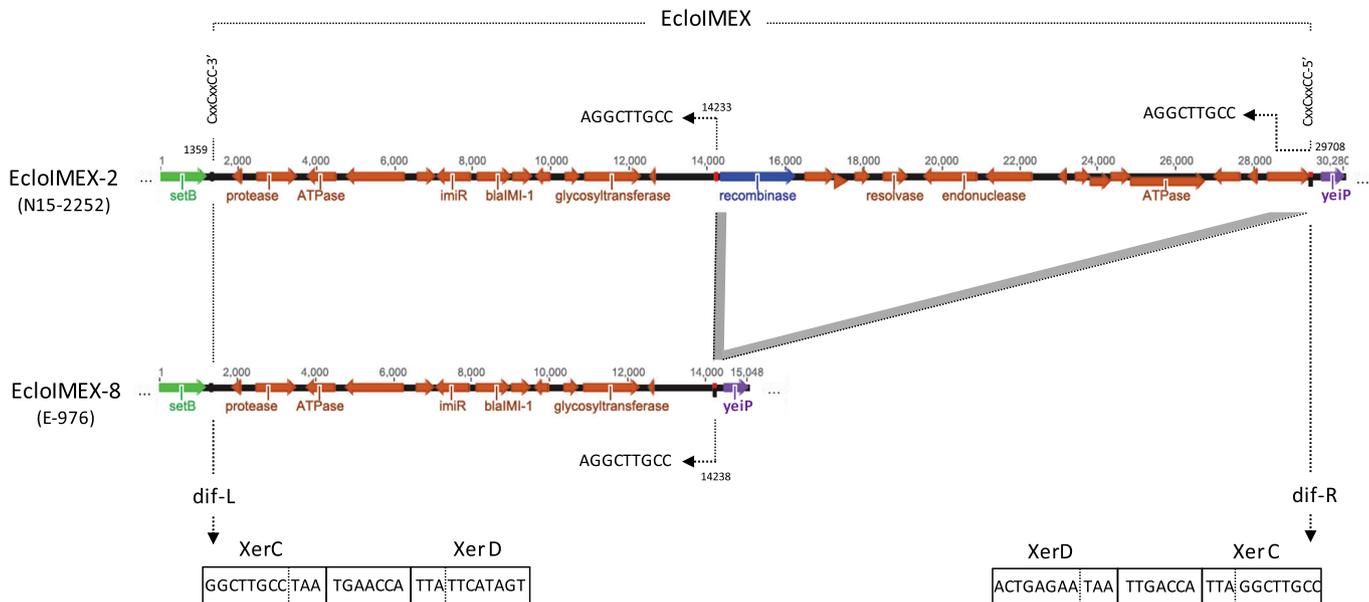


Fig. 2. Comparison of the genetic environment of the *bla*_{IMI-1} gene in the integrative mobile element that exploits the Xer recombinases (EcolIMEX-2 and EcolIMEX-8) in *Enterobacter cloacae* isolates. The *bla*_{IMI-1} gene had the same chromosomal location in a new integrative mobile element that exploits the Xer recombinases, called EcolIMEX-8 (*E. cloacae* E-976, GenBank accession no. MG547711), measuring 12 879 bp. Comparison with the corresponding region of the EcolIMEX-2 element, recently described for *E. cloacae* N15-2252 (GenBank accession no. KU870984.1), revealed high homology (98% nucleotide sequence identity) and the same chromosomal insertion site between the *setB* gene (encoding the sugar efflux transporter B) and the *yeiP* gene (encoding an elongation factor P-like protein) [9]. EcolIMEX-8 lacks a large sequence of 15 475 bp from its 3' terminal part, found in EcolIMEX-2.

ceftazidime, cefepime, fluoroquinolones, aminoglycosides, tigecycline and fosfomycin. Two isolates were resistant to third-generation cephalosporins: (i) one overproduced CMH-3 cephalosporinase (isolate E3); and (ii) one harboured the ESBL-encoding gene *bla*_{CTX-M-15} (isolate E12b). This ESBL gene was carried by an IncHI2-type plasmid that also carried several other antimicrobial resistance genes, i.e. two β -lactamase genes (*bla*_{OXA-1} and *bla*_{TEM-1b}), genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes [*aph*(3')-Ib, *aac*(6')-Ib-cr, *aac*(3)-IIa, *aadA1* and *aph*(6)-Id], and genes conferring resistance to chloramphenicol (*catA1* and *catB4*), tetracycline (*tetA*) and sulfonamides/trimethoprim (*sul1* and *dfpA14*). All isolates were highly resistant to colistin (MICs = 32–64 μ g/mL) without harbouring the *mcr*-1–5 genes. Such resistance can be explained by the fact that they belong to *E. cloacae* cluster XI (Supplementary Fig. S1). This cluster has been identified as being heteroresistant to colistin [14]. The Rosco test revealed synergy between meropenem and boronic acid, indicating production of a class A carbapenemase. Moreover, the Carba NP test, which uses imipenem as substrate, was positive within 30 min. Real-time PCR using the GeneXpert[®] system remained negative. The *bla*_{IMI-1} gene was identified in all 18 isolates by PCR and further sequencing.

PFGE identified one major pulsotype encompassing 16 of the 18 isolates, all belonging to ST820 (Supplementary Fig. S2); the 2 remaining isolates (E6 and E13) had different pulsotypes. The *bla*_{IMI-1} gene was borne in all 18 isolates by the integrative mobile element EcolIMEX-8, which exploits the Xer recombinases. The structure of EcolIMEX-8 (*E. cloacae* E-976, GenBank accession no. MG547711) is very close to that of EcolIMEX-7 (GenBank accession no. KY680208.1), with 99% nucleotide sequence homology. Interestingly, EcolIMEX-8 is also similar to EcolIMEX-2 (GenBank accession no. KU870984.1) recently described by Boyd et al. [9], but with a truncation of ca. 15 500 bp of the 3' terminal part (Fig. 2). The nucleotide sequence of the shared region (12 879 bp) is 98% identical to that of EcolIMEX-2. EcolIMEX-8 is also inserted into the same chromosomal location: the intergenic region between the *setB* gene, encoding the sugar efflux transporter B, and the *yeiP* gene, encoding an elongation factor P-like protein [9]. EcolIMEX-

8 has also lost a gene encoding the recombinase and carries three genes encoding a protease, an ATPase and a glycosyltransferase.

4. Discussion

Here we report a clonal outbreak of *E. cloacae* ST820 producing the class A carbapenemase IMI-1 in 15 colonised patients from Mayotte. All patients had been hospitalised in MMC, some for a very short period (≤ 2 days). Most cases were detected at admission (76.5%). None of the patients for whom the medical records were analysed (15 of the 17 colonised patients) had been hospitalised at MMC within the 6 months preceding their IMI-1-positive screening, nor had they met before hospitalisation. Intra-hospital outbreaks of carbapenemase-producing *E. cloacae* have already been described, but the authors suspected that they were of nosocomial origin [15]. Here, the fact that all hospital environmental samples tested negative for IMI-1-producing *E. cloacae* and that patients were colonised by this CPE at admission might suggest a reservoir in the community. This assumption is supported by the poor sanitary conditions and that of the water supply for some inhabitants of this French overseas island and the persistence of IMI-producing Enterobacteriaceae in water or seafood [16–18]. Investigations to identify the environmental source of IMI-1-producing *E. cloacae* are ongoing.

Detection of IMI-1-producing isolates in clinical samples can be challenging due to lack of knowledge of this unusual antibiotic type. Hence, isolates producing IMI-1 as the sole enzymatic resistance mechanism are still susceptible to extended-spectrum cephalosporins. Consequently, these isolates did not grow on ESBL screening media using extended-spectrum cephalosporins as the selective agent (e.g. ChromID[®] ESBL from bioMérieux and Brilliance ESBL agar from Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). In addition, IMI-1-producers show intermediate resistance to ertapenem, often used for the phenotypic screening of CPE. Here, the IMI-1-producing *E. cloacae* isolates only grew on the CARB section of the CPE ChromID[®] CARBA SMART screening media (bioMérieux). Furthermore, *bla*_{IMI-1} is not targeted by the GeneXpert[®] system. How-

ever, production of IMI-1 was easily detected by its resistance to an imipenem disk and synergy with a disk of AMC.

Enterobacter cloacae isolates producing IMI-1 as the sole acquired enzymatic resistance mechanism are still susceptible to many antibiotics (i.e. combined penicillins/inhibitors, third-generation cephalosporins, fluoroquinolones and aminoglycosides). Although one isolate co-producing both CTX-M-15 and IMI-1 was susceptible only to non- β -lactam compounds (amikacin, ofloxacin, ciprofloxacin, tigecycline and fosfomycin), IMI-1-producing *E. cloacae* isolates do not constitute an immediate threat in terms of a therapeutic dead-end. The threat of multidrug resistance for these carbapenemase-producers may come rather from the acquisition of other resistance mechanisms encoded by mobile genetic elements, such as ESBLs. However, these isolates were all resistant to colistin owing to chromosomally-encoded heteroresistance linked to *E. cloacae* complex cluster XI (Supplementary Fig. S1) and depending on the PhoP/PhoQ two-component regulatory system [14].

*bla*_{IMI-1} in all IMI-1-producing isolates was found to be chromosomally integrated within the new EcloMEX-8 element, which presumably exploits XerC/XerD-like sequence motifs at the chromosomal junctions [19]. This Xer recombination-dependent mechanism of mobilisation may limit the spread of *bla*_{IMI-1} relative to other types of mobile genetic elements such as plasmids or transposons [9]. Here, EcloMEX-8 had undergone deletion of the portion that contained the gene encoding the recombinase, further preventing its mobilisation.

This study has some limitations. It was limited by the small number of environmental samples from MMC, preventing us from definitively excluding a nosocomial source. MDR screening was not homogeneous in all departments of MMC, probably leading to an underestimation of the number of IMI-1 cases. Finally, the first IMI-1 cases were detected in October 2015, a few months after the implementation of ChromID® CARBA SMART agar at FGUH (May 2015); thus, we may have missed IMI-producers before this date. Identification of the IMI-1-producing *E. cloacae* environmental source is ongoing. In addition to screening environmental samples, IMI-1 carriers were given an individual diary in 2017 to identify risk factors.

5. Conclusion

Here we describe the first outbreak of IMI-1-producing Enterobacteriaceae for which the reservoir might be in the community. Investigations to identify the source of contamination are still ongoing. The resistance profile conferred by the sole production of IMI-1 still allows the use of third-generation cephalosporins for infected patients. However, transfer of *bla*_{CTX-M-15} in IMI-1-producing Enterobacteriaceae, which are prevalent in the Southwest Indian Ocean area, could be more problematic [20]. Furthermore, detection of IMI-1 by phenotypic methods may be difficult due to its unusual antibiotic profile, of which microbiologists should be made aware. Finally, characterisation of the epidemiology of this emerging class A carbapenemase is required to better understand its potential modes of transmission from the environment to humans.

Acknowledgments

The authors thank Marc Dumont for graphic illustrations, and Pauline Chardin for editorial assistance.

Funding

This research was partly supported by the Indian Ocean Regional Health Agency (ARS-OI).

Competing interests

None declared.

Ethical approval

Not required.

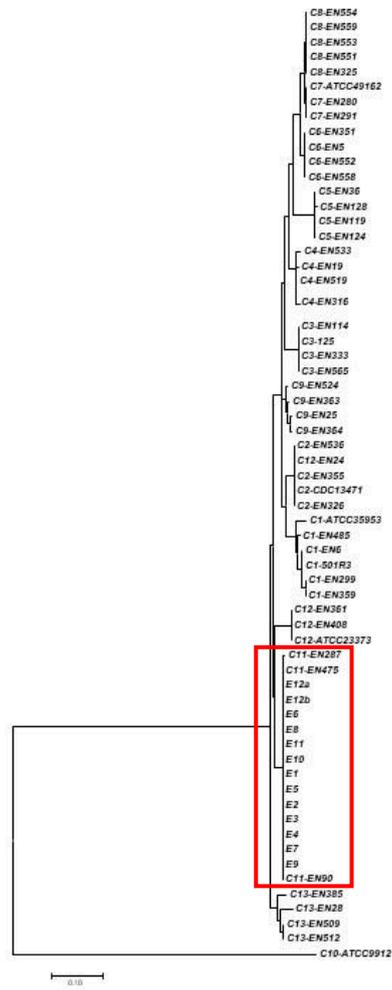
Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.05.015](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.05.015).

References

- [1] Albigier B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill* 2015;20.
- [2] Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, et al. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2080–6.
- [3] Naas T, Cattoen C, Bernusset S, Cuzon G, Nordmann P. First identification of bla_{IMI-1} in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1664–5.
- [4] Teo JW, La MV, Krishnan P, Ang B, Jureen R, Lin RT. *Enterobacter cloacae* producing an uncommon class A carbapenemase, IMI-1, from Singapore. *J Med Microbiol* 2013;62:1086–8.
- [5] Boo TW, O'Connell N, Power L, O'Connor M, King J, McGrath E, et al. First report of IMI-1-producing colistin-resistant *Enterobacter* clinical isolate in Ireland, March 2013. *Euro Surveill* 2013;18:20548.
- [6] Huang L, Wang X, Feng Y, Xie Y, Xie L, Zong Z. First identification of an IMI-1 carbapenemase-producing colistin-resistant *Enterobacter cloacae* in China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015;14:51.
- [7] Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:321–31.
- [8] Naas T, Massuard S, Garnier F, Nordmann P. AmpD is required for regulation of expression of NmcA, a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2908–15.
- [9] Boyd DA, Mataseje LF, Davidson R, Delport JA, Fuller J, Hoang L, et al. *Enterobacter cloacae* complex isolates harboring bla_{NMC-A} or bla_{IMI}-type Class A carbapenemase genes on novel chromosomal integrative elements and plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:e02578-16.
- [10] Mollet C, Drancourt M, Raoult D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* 1997;26:1005–11.
- [11] Talon D, Menget P, Thouvez M, Thiriez G, Gbaguidi Haore H, Fromentin C, et al. Emergence of *Enterobacter cloacae* as a common pathogen in neonatal units: pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Hosp Infect* 2004;57:119–25.
- [12] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–9.
- [13] Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One* 2013;8:e66358.
- [14] Guérin F, Isnard C, Sinel C, Morand P, Dhalluin A, Cattoir V, et al. Cluster-dependent colistin hetero-resistance in *Enterobacter cloacae* complex. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:3058–61.
- [15] Fernández J, Montero I, Ó Martínez, Fleites A, Poirel L, Nordmann P, et al. Dissemination of multiresistant *Enterobacter cloacae* isolates producing OXA-48 and CTX-M-15 in a Spanish hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:469–74.
- [16] Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. U.S. rivers. *Emerg Infect Dis* 2005;11:260–4.
- [17] Piedra-Carrasco N, Fàbrega A, Calero-Cáceres W, Cornejo-Sánchez T, Brown-Jaque M, Mir-Cros A, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* recovered from a Spanish river ecosystem. *PLoS One* 2017;12:e0175246.
- [18] Janecko N, Martz SL, Avery BP, Daignault D, Desruisseau A, Boyd D, et al. Carbapenem-resistant *Enterobacter* spp. in retail seafood imported from Southeast Asia to Canada. *Emerg Infect Dis* 2016;22:1675–7.
- [19] Antonelli A, D'Andrea MM, Di Pilato V, Viaggi B, Torricelli F, Rossolini GM. Characterization of a novel putative Xer-dependent integrative mobile element carrying the bla_(NMC-A) carbapenemase gene, inserted into the chromosome of members of the *Enterobacter cloacae* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:6620–4.
- [20] Belmonte O, Drouet D, Alba J, Moiton MP, Kuli B, Lugagne-Delpon N, et al. [Evolution of *Enterobacteriaceae* resistance to antibiotics in Reunion Island: emergence of extended-spectrum beta-lactamases]. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58:18–24.

Supplementary Figure S1:

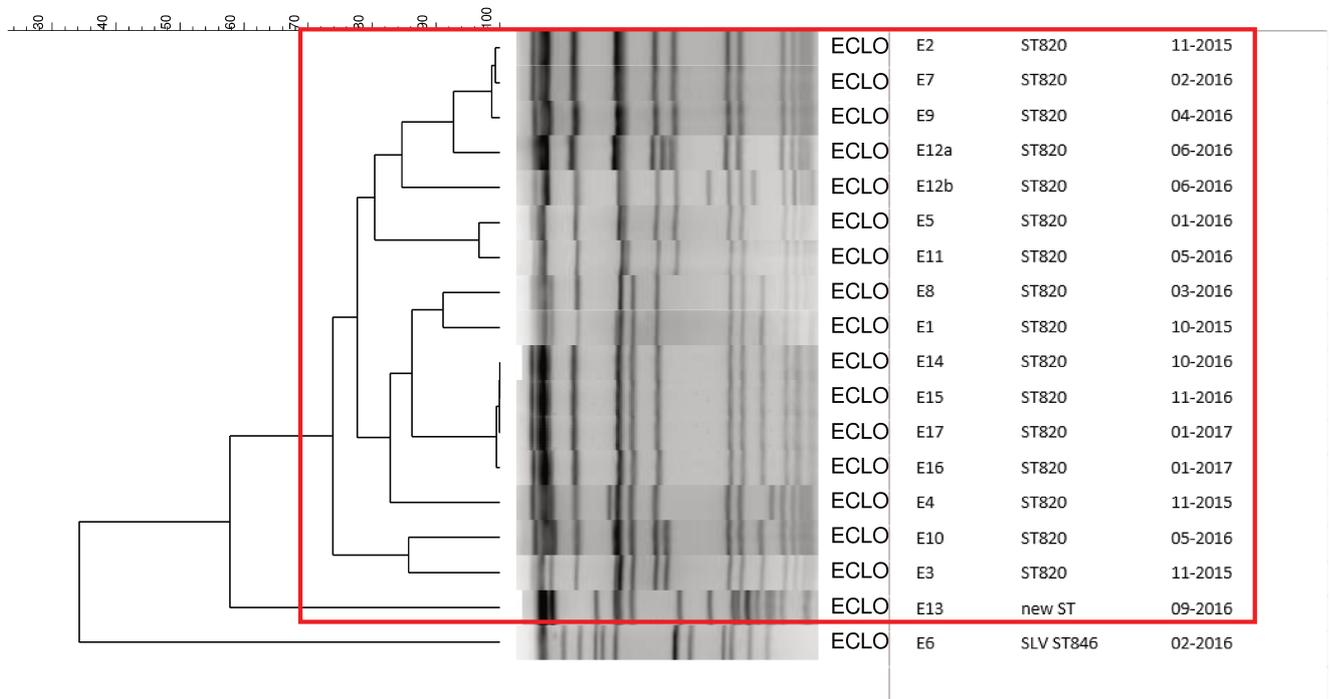


E. cloacae cluster XI identification based on HPS60 sequences.

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar *et al.*, *Mol Biol Evol.*, 2016).

Supplementary Figure S2:

GelCompar



Molecular genotyping (PFGE and MLST analysis) of 18 IMI-1 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* isolates from Mayotte Island.

The dendrogram constructed from the PFGE analysis highlighted one major pulsotype including 16 of the 18 strains analyzed. These 16 isolates, detected between October 2015 and January 2017, belong to the same sequence type ST820. Two isolates (E6 and E13) each presented a different pulsotype and ST.

Données supplémentaires :

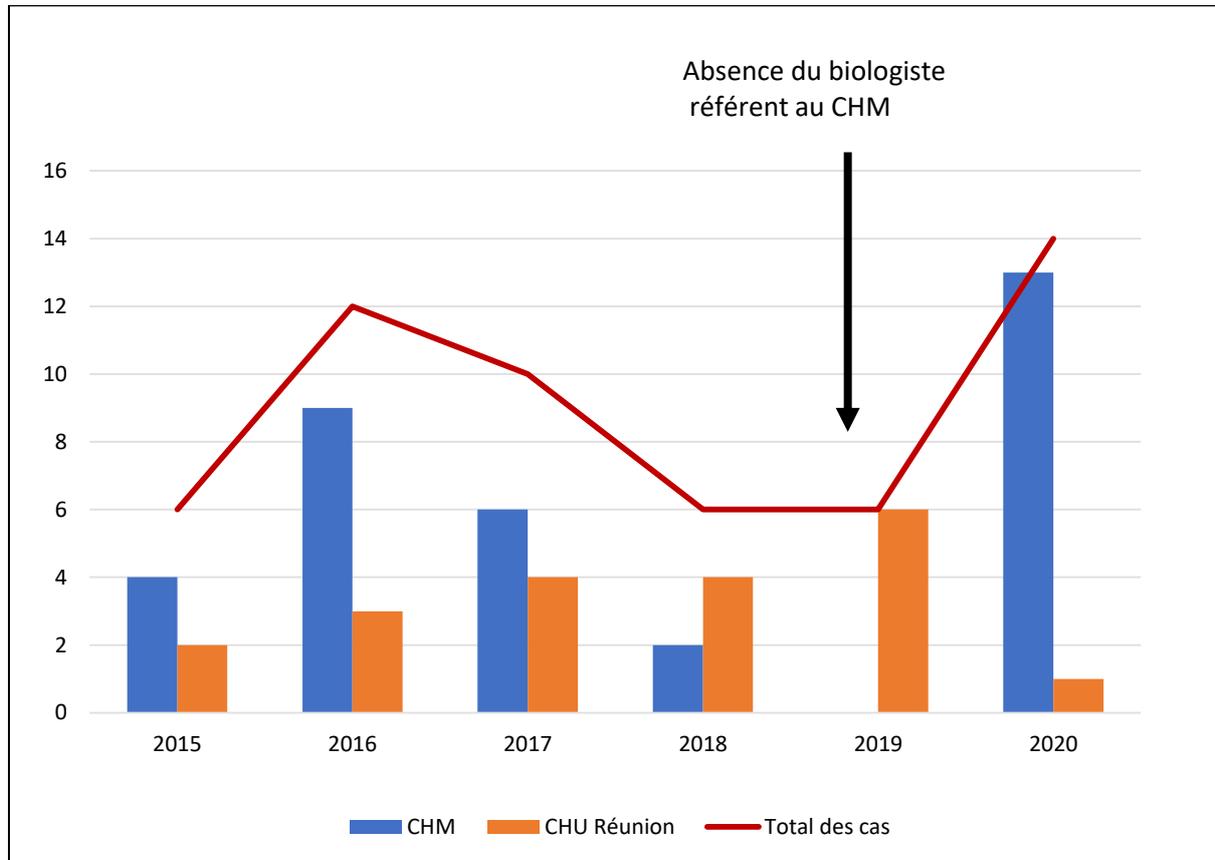


Figure 58. Nombre de cas d'EPC de type *E. cloacae* IMI-1 recensés à La Réunion et à Mayotte sur la période 2015-2020.

Un total de 54 cas a été détecté q< au CHU de La Réunion et au CHM sur cette période.

On note qu'entre 6 et 14 cas d'EPC de type *E. cloacae* IMI-1 sont détectés chaque année dans ces 2 DOM (Figure 58). Si l'épidémie a semblé ralentir en 2018-2019, une augmentation des cas recensés est observée en 2020 (n=14, chiffre le plus important depuis le début de l'épidémie). On peut notamment se poser la question de la détection optimale des cas au CHM en 2019 où le biologiste référent bien au fait de l'antibiotype particulier de cette EPC était absent pour longue maladie pendant près de 9 mois.

Cette étude a permis de mettre en évidence une épidémie monoclonale de *E. cloacae* IMI-1 en provenance de Mayotte incluant initialement 15 patients. Un point important sur cette épidémie est qu'elle est très probablement d'origine communautaire. En effet, la grande majorité des patients avait été dépistée dans les 48h après leur admission au CHM et aucun prélèvement environnemental dans les chambres des patients n'avait permis de mettre en évidence cette EPC. Cette découverte est intéressante car les EPC de type IMI ont à plusieurs reprises été détectées dans des milieux environnementaux hydriques ou dans des aliments issus de la mer (cf. 1^{ère} partie, paragraphe 1.3.1.1). Le gène *bla*_{IMI-1} avait une localisation chromosomique et était plus précisément situé sur un élément intégratif mobile de type EcloIMEX-8, un variant non encore décrit des différents éléments EcloIMEX documentés par Boyd *et al.* en 2017 (117). L'élément EcloIMEX-8 a la caractéristique d'avoir perdu sa recombinase, ce qui limite théoriquement sa capacité à se mobiliser hors du chromosome. Un phénomène plus problématique était que les patients étaient pour la plupart co-colonisés par des EBLSE, faisant craindre un passage plasmidique de gène de type *bla*_{CTX-M-15} chez les isolats *E. cloacae* IMI-1, comme rencontrés chez l'un des patients. Les souches co-productrices des enzymes IMI-1 et CTX-M-15 sont alors beaucoup plus résistantes aux antibiotiques, ce d'autant plus que ce clone de *E. cloacae* est naturellement résistant à la colistine.

Nous avons poursuivi l'investigation de cette épidémie avec le CPIAS et tenté de déterminer l'origine de cette épidémie à Mayotte. Les cas se sont maintenus chaque année avec même une recrudescence en 2020 (Figure 58). Au final, 54 cas d'EPC de type *E. cloacae* IMI-1 ont été détectés à La Réunion et à Mayotte entre 2015 et 2020. Deux sources d'exposition sont principalement suspectées suite à des discussions avec l'ARS de Mayotte : des eaux de puits de captation et de rétention (où les personnes viennent faire leur lessive et leur vaisselle) ou de la nourriture congelée de type « *seafood* » importée de l'étranger. Malheureusement, en raison des gros problèmes sanitaires déjà présents sur l'île de Mayotte avant l'épidémie de COVID-19, nous n'avons pas encore pu mettre en pratique cette campagne d'échantillonnage pour tenter d'identifier la source de l'épidémie. Néanmoins, même si les IMI sont des enzymes dont la prévalence reste stable et faible en France, elle constitue un modèle *One Health* de carbapénèmase avec une forte suspicion de contamination à partir de l'environnement (au sens large). L'étude publiée par Laurens *et al.* en 2018 sur un cas d'infection à *E. asburiae* IMI-2 post-noyade corrobore cette hypothèse (318).

4 Discussion générale

4.1 Dynamique de diffusion inter-compartimentale des EBLSE à La Réunion

Notre investigation moléculaire des populations de *E. coli* BLSE s'est basée sur un modèle pertinent pour explorer le phénomène d'émergence et de dissémination de l'antibiorésistance par une approche *One Health*. En effet, La Réunion est un milieu insulaire, fortement peuplé, connu pour être fortement impacté par le phénomène de l'antibiorésistance et appartenant à un pays « à hauts-revenus » (RNB/hab. en 2019 : 42 4500 \$ selon la classification de la Banque mondiale <https://donnees.banquemondiale.org/pays/>). Si des études ont pu évaluer la diffusion de ces souches multi-résistantes dans certaines îles de pays « à bas-revenus » tels que Zanzibar ou Madagascar, aucune étude n'avait à ce jour investi ce type d'environnement propice à l'évaluation de la circulation inter-compartimentale des EBLSE dans les pays développés ou « *high-income countries* ». Néanmoins, ce système insulaire ne peut être considéré comme complètement fermé du fait des fortes interactions entre La Réunion et les autres îles de la zone SOOI. Pour l'étude ECOH-RUN, nous avons appliqué une méthodologie visant à limiter au maximum ces occurrences d'origine externe.

La principale conclusion de notre étude est que les animaux de rente ne constituent pas un réservoir majeur de transmission des *E. coli* BLSE (et *a fortiori* des EBLSE) pour l'Homme à La Réunion. Cette conclusion s'appuie sur une comparaison étayée, à la fois génotypique et phénotypique, basée sur des collections conséquentes de *E. coli* BLSE d'origine humaine, environnementale et animale (410 isolats au total). Du fait des particularités de cette île, cette étude devra cependant être complétée par une exploration de la filière alimentaire et des animaux de compagnie sur l'île pour avoir une vision globale des échanges entre sphère humaine et animale à La Réunion. Ces études, notamment chez les animaux de compagnie, sont en cours de réalisation par nos collègues du CIRAD. Ainsi, cette étude sous-tend que la transmission des *E. coli* BLSE à La Réunion est principalement inter-humaine. C'est donc sur ce secteur qu'il faut agir pour limiter avec le maximum d'impact la dissémination de ces BMR dans la population générale. Enfin, la réduction de la consommation des antibiotiques dans le secteur de l'élevage n'en reste pas moins nécessaire car elle permet de (i) limiter ces transferts de résistances entre souches adaptées à l'Homme et souches adaptées à l'animal et (ii) de maintenir des antibiothérapies curatives efficaces quand celles-ci sont justifiées (206). Il serait intéressant d'évaluer si les effets du plan EcoAntibio 1 sont associés à une réelle diminution de la consommation des antibiotiques dans ces territoires ultra-périphériques que sont La Réunion ou Mayotte. D'autre part, certains indicateurs tels que le nombre croissant de EBLSE détectées chaque année par le groupement

de laboratoires Réunionlab (patientèle quasi exclusivement issue du secteur communautaire) ou la présence importante de *E. coli* BLSE dans les effluents communautaires de la ville de Saint-Denis, tendent à démontrer la dissémination importante des *E. coli* BLSE dans le secteur communautaire. En effet, sur l'ensemble des souches détectées dans l'étude ECOH-RUN dans les égouts, on observait environ une répartition 60%/40% entre effluents hospitaliers et communautaires, respectivement. De plus, l'étude AB-RUN menée en 2018 par le Dr J. Jaubert avec une prévalence de 8,3% dans la population entrante aux urgences ou en réanimation du CHU (et même près de 12% pour le bassin Nord) a confirmé cette tendance (333). Ces études sont en cohérence avec les données disponibles attestant d'une diffusion communautaire des *E. coli* BLSE mais avec des prévalences supérieures à celles dans la population communautaire en France métropolitaine (2,8% de *E. coli* BLSE en 2018, mission Primo, SPF, 355) et plus proche de celle en EHPAD (8% en 2018, mission Primo, SPF). On peut ainsi légitimement se poser la question de savoir si la bataille contre les EBLSE n'est pas déjà perdue... Nous noterons enfin que la STEP de Saint-Denis, qui est une STEP relativement moderne et munie d'une rampe à UV permet d'éliminer un nombre important de *E. coli* BLSE (rapport d'élimination de 5.10^4), mais rejette néanmoins une quantité non négligeable de ces bactéries multi-résistantes dans l'Océan. Ces émissions sont moins problématiques à Saint-Denis où ces zones sont peu concernées par les activités récréatives ou de pêche. On peut néanmoins se poser la question des rejets analogues émis par des STEP du bassin Ouest dans le lagon de l'Ermitage où le contexte récréatif est tout autre (358). De plus, certaines études ont démontré le caractère adaptatif des souches multi-résistantes permettant de limiter le « *fitness-cost* » lié au maintien de ces plasmides ainsi que la persistance prolongée de ces souches dans l'environnement (260,359). Aujourd'hui, les preuves de ré-infection de l'Homme à partir de l'environnement dans les pays « à hauts-revenus » sont cependant très rares (280,318).

Enfin, ces résultats qui aboutissent à une sectorisation importante entre les compartiments humains et animaux sont en fort contraste avec les études (basées sur le WGS) menées dans des pays « à faibles revenus » de la zone. En effet, **Büdel et al.** ont démontré une forte interconnexion entre le secteur aviaire, la viande de poulet et les souches responsables de colonisation dans la population communautaire à Zanzibar avec des clones communs de *E. coli* ST361/CTX-M-15 et *K. pneumoniae* ST17/CTX-M-14 et ST1741/CTX-M-15 (293). Cette étude est d'autant plus intéressante que l'île de Zanzibar est un très bon comparatif de La Réunion mais sur le versant pays « à faibles revenus » avec un milieu insulaire, très densément peuplé (1264 km² pour 896 000 habitants, soit une densité de population équivalente au double de celle de la Réunion) et fortement touché par l'antibiorésistance (91,5% de colonisation à entérobactéries résistante aux C3G dans un échantillon de la population communautaire en 2018, 358). Nos collègues du CIRAD ont également mené une étude en

collaboration avec l'Institut Pasteur de Madagascar dans la population communautaire, chez les animaux et dans leur environnement (eau consommée) à Madagascar et ont démontré qu'il existait de très nombreux clusters entre ces 3 compartiments, et pas de spécificité d'hôtes chez ces clones (données en cours de publication, 359). Ces deux études, démontrant un vrai modèle *One Health*, nous renseignent sur les éléments pouvant jouer un rôle dans ces échanges à savoir (i) un mode d'élevage « familial » de petite taille avec des contacts plus importants avec les animaux au sein du foyer, (ii) une absence de contrôle sanitaire sur la nourriture et (iii) une absence d'infrastructure d'évacuation et de traitement des *excreta*. Le tout associé à une utilisation non contrôlée des antibiotiques dans les 2 secteurs. On comprend ainsi les « ingrédients » de ces modèles « *low-income/One Health* » et les raisons qui pourraient expliquer que nous aboutissions, comme les études majeures publiées dernièrement au Royaume-Uni, aux Pays-Bas ou en Suède (287,297,304,362), à un modèle « *high-income/Two Health* » dans ces pays de l'hémisphère Nord. Nous noterons pour finir que, même dans les pays dits en croissance ou « à revenus intermédiaires » d'Asie du Sud-Est comme la Thaïlande (RNB/hab. en 2019 : 7260\$), le Vietnam (RNB/hab. en 2019 : 2590\$) mais pas le Cambodge (dont le RNB/hab. en 2019 était plus faible 1530\$, <https://donnees.banquemondiale.org/pays/>), le modèle avec sectorisation entre les compartiments semble également prédominant (289,298,301). Ces modèles « *Two Health* » devront toutefois être confirmés dans le temps dans les pays « à hauts revenus » et validés par des études visant à modéliser ces échanges en corrélant prévalence de EBLSE, probabilité d'exposition et méta-données de systèmes de surveillance nationaux ou continentaux (239). Ces études pourront notamment être permises grâce à la démocratisation du WGS et la disponibilité en libre accès de nombreux génomes séquencés.

4.2 Dynamique de diffusion des EPC dans la zone SOOI et d'importation à La Réunion

Les 2 études menées sur les EPC ont permis d'apporter des informations nouvelles sur (i) l'épidémiologie régionale des EPC dans la zone SOOI et (ii) la dynamique de circulation de ces EPC à La Réunion et dans la zone. La Réunion est ainsi un DOM soumis à une très forte pression d'importation en EPC avec près de 70% de souches importées sur la période 2011-2016. Si ce pourcentage tend à diminuer sur la période 2017-2020, la proportion des souches en lien avec l'étranger reste supérieure à celle de la France métropolitaine (70). Ces résultats sont probablement liés à une importation plus tardive des EPC à La Réunion par rapport à la métropole (2010 vs. 2004). Cette situation est une opportunité puisqu'elle permet de prévenir plus précocement la dissémination de ces EPC vers le secteur communautaire. On note une forte augmentation des EPC détectées à La Réunion sur la

période 2017-2019, suivie d'une diminution liée à un « effet COVID-19 » et la baisse des EVASAN. Toutefois, cette augmentation a une origine mixte liée d'une part aux EVASAN, mais d'autre part à l'augmentation importante des souches d'EPC détectées au CHU Sud (moins concerné par les EVASAN) et dans une moindre mesure dans les laboratoires de ville. Cependant, les EPC sont quasiment en totalité détectées dans le CHU, les CH ou des cliniques à La Réunion, suggérant une très faible dissémination communautaire dans la population générale et les EMS. Les prélèvements réalisés lors de l'étude ECOH-RUN semblent en phase avec cette tendance puisque, contrairement aux BLSE, quasi aucune EPC n'a été détectée sur le point de refoulement Vallon-Boarau correspondant aux effluents communautaires. On notera toutefois que 10% de l'effectif des EPC détectées dans les eaux usées dans l'étude ECOH-RUN l'ont été en sortie de STEP, avec la même réflexion que pour les EBLSE.

La dynamique de diffusion des EPC entre les interfaces hospitalières et communautaires est donc très différente de celle des EBLSE, avec un réservoir concentré dans les structures hospitalières. Nous sommes actuellement à un virage puisque certaines EPC ont dernièrement été détectées chez certains patients dialysés qui pourraient devenir un canal de transmission vers la ville. Concernant l'importation des souches d'EPC en lien avec l'étranger, la majorité entre sur le sol réunionnais directement dans un établissement de soins *via* les EVASAN, ce qui limite également la dissémination communautaire de ces souches. Il est cependant très difficile d'évaluer le portage asymptomatique d'EPC dans la population communautaire réunionnaise qui est sans doute plus élevé que dans la population de France métropolitaine en lien avec les voyages, le tourisme familial ou médical dans la zone (*cf.* 1^{ère} partie, chapitres 3.1.2 et 3.2.2).

Concernant la zone SOOI, La Réunion agit comme une sentinelle capable de détecter des phénomènes émergents se déroulant hors de ses propres frontières (334). De plus, elle peut jouer le rôle d'observatoire de l'épidémiologie des EPC dans la zone, dont elle était représentative au moins jusqu'en 2016. L'épidémie de *E. cloacae* IMI-1 détectée à La Réunion et toujours en cours à Mayotte est un très bon exemple de ces émergences singulières pouvant se dérouler dans la zone. Le switch épidémiologique qui s'est déroulé entre 2017-2019 où les îles des Comores et de Mayotte sont devenues les 1^{ères} pourvoyeuses d'EPC importées à La Réunion est également un indicateur de la connexion Réunion-Mayotte. L'archipel des Comores (dans sa globalité) semble fortement touché par l'émergence des EPC et notamment de *E. coli* NDM-5 et OXA-181 (étude en cours). Mais l'origine de cette évolution épidémiologique (transmission croisée au CHM ? Émergence dans la population communautaire mahoraise ? Souches issues d'importations indépendantes ou clonalement reliées ?) est pour l'heure inconnue du fait de l'absence de système de surveillance sur place. Ces phénomènes soulignent le lien fort qui existe entre ces 2 DOM de l'Océan Indien, qui s'est renforcé depuis la crise sanitaire de la COVID-19. Cette différence de développement ne doit pas être vue comme un frein mais

comme une opportunité de collaboration entre ces 2 territoires (*via* les 2 ARS récemment créées et le CPIAS-Réunion-Mayotte) pour prévenir ces phénomènes à leur source. Il faut néanmoins admettre que les autres problèmes sanitaires rencontrés à Mayotte (pauvreté, insalubrité, habitat) ainsi que l'immigration illégale constituent des entraves à ces collaborations qui devront être prioritairement ou parallèlement solutionnées.

4.3 Implications dans la lutte contre l'antibiorésistance à La Réunion et dans la zone SOOI

Ces études permettent d'aboutir à des connaissances importantes pour nos autorités de tutelles, et notamment l'ARS de La Réunion, dans la stratégie de lutte contre l'antibiorésistance à mettre en place sur l'île.

Concernant les EBLSE, les leviers de lutte contre l'antibiorésistance se situent dans le compartiment humain et repose sur 2 principaux piliers : *(i)* la diminution de la consommation des antibiotiques, notamment dans le secteur communautaire et *(ii)* la mise en place de mesures d'hygiène individuelle et collective permettant de limiter les transmissions inter-humaines. L'utilisation raisonnée des antibiotiques est un outil fondamental dans la lutte contre l'antibiorésistance car il permet de limiter la pression de sélection sur les populations bactériennes, notamment sur la flore digestive humaine. Or, aujourd'hui, 93% des antibiotiques (en tonnage annuel) sont consommés en ville en France, dont 78% sont prescrits en ville (205). C'est donc sur ce secteur qu'il est crucial d'agir par une approche inter-disciplinaire associant l'hôpital et les professionnels médicaux libéraux. C'est ce que nous allons faire prochainement en prenant part à la constitution très récente du CRA_{tb} de La Réunion et des EMA. Il faut également s'intéresser aux prescriptions des antibiotiques post-urgences pour les patients revus par leur médecin traitant afin de veiller à une bonne adaptation de ces prescriptions à 48-72h, en parallèle de la disponibilité des résultats microbiologiques (363). Mettre en place des mesures d'hygiène individuelle dans la population communautaire semble plus difficile, mais pourquoi ne pas surfer sur la vague de la COVID-19, où les gestes « barrières » ont permis de nettement diminuer les épidémies hivernales de gastro-entérites en 2020. Enfin, il est important de disposer dans les ES d'un système de dépistage des BMR efficace et homogène sur l'île afin de limiter les transmissions croisées nosocomiales à l'hôpital. Il est ainsi nécessaire d'harmoniser les politiques de dépistage dans les différents établissements et le CRA_{tb}, en relais du CPIAS, pourra participer à cette mission.

Pour les EPC à La Réunion, la stratégie doit être différente, puisque la dynamique de diffusion de ces souches est elle-même différente. Celle-ci consiste à bloquer efficacement l'entrée des EPC dans les hôpitaux et cliniques de l'île, et notamment les ES accueillant des patients d'origine externe provenant

de la zone SOOI. Il faut ainsi dépister et isoler rapidement ces patients grâce à une EOH et un laboratoire de Microbiologie agissant de pair, et limitant ainsi les épidémies ou transmissions croisées entre les patients. Cette stratégie passe également par une sensibilisation et une bonne formation des personnels soignants paramédicaux (les EMA intégreront secondairement aussi des IDE). Connaître l'épidémiologie des EPC à La Réunion, c'est ainsi identifier des « profils de patients à risque » comme c'est le cas actuellement pour les EVASAN issues de Maurice qui sont spécifiquement suivies par l'EOH au CHU Nord (dépistage spécifique des BMR, BHRe, et de *Candida auris*). Un autre enjeu crucial sera de limiter la dissémination communautaire de ces EPC. Réduire l'usage inapproprié des antibiotiques en ville participera à cet objectif puisqu'il limitera les phénomènes de co-sélection des souches résistantes aux carbapénèmes (254,364). Si la bataille est peut-être perdue contre la dissémination des EBLSE dans le secteur communautaire, elle ne fait que commencer pour les EPC...

Dans la zone SOOI, connaître les émergences et la dynamique de circulation des BMR/BHRe est également informative. En effet, identifier ces phénomènes, c'est permettre d'agir préventivement à la source de ces émergences. C'est notamment la vocation de la Commission de l'Océan Indien (COI) basée à Maurice. Cette organisation inter-gouvernementale intégrant les 5 îles de l'Océan Indien (à l'exception de Mayotte) est essentiellement financée par l'Agence Française pour le Développement, la Banque mondiale et l'Union Européenne. Elle vise à prévenir les problèmes, entre autres, sanitaires dans ces différents territoires avant que ceux-ci ne s'importent vers La Réunion et secondairement vers l'Europe occidentale. La Réunion agit ainsi comme un 1^{er} rempart dans cette stratégie et il est important de mettre en place les collaborations permettant ces investigations rétrospectives à la source. Si l'épidémie de *E. cloacae* IMI-1 a essentiellement concerné des cas de colonisation, nous avons notamment été confronté en 2019-2020 à une épidémie de *Acinetobacter baumannii* producteurs des carbapénémases OXA-23 et NDM-1 et résistants à la colistine (quasiment toto-résistants) ayant provoqué une épidémie de 13 cas en réanimation médicale au CHU Nord, dont 8 infections et 6 décès. Le cas index de cette épidémie était un patient originaire des Comores, hospitalisé au CHM puis transféré au CHU de La Réunion (la filière « classique »). Tout l'intérêt et la finalité de cette stratégie sera, au-delà de faire rempart à l'entrée de ces clones à La Réunion, de réussir à juguler ces émergences à la source quand ceci est possible. Enfin, notre rôle sera d'informer l'autorité compétente de la COI pour établir des stratégies de lutte contre l'antibiorésistances adaptées à chaque territoire. En effet, plusieurs travaux réalisés ou en cours dans la zone (Zanzibar et Madagascar) tendent à démontrer un modèle « *One Health/low-income countries* » notamment liés au péril orofécal dont les principales armes seront les améliorations de l'habitat, des infrastructures d'évacuation et de traitement des eaux, de contrôle sanitaire de la contamination fécale des aliments et de l'eau potable ou la structuration des élevages.

CONCLUSION – PERSPECTIVES

L'antibiorésistance est aujourd'hui un sujet de préoccupation majeur pour nos autorités de santé comme le témoigne la structuration régionale récemment demandée aux ARS par le ministère des solidarités et de la santé en 2020 (CRAtb et EMA) pour lutter contre ce phénomène. La Réunion et Mayotte sont 2 DOM de l'Océan Indien situés à environ 9000 km de la métropole et ayant connus une histoire et un développement différents. L'application de ces politiques de santé publique y est un challenge quotidien, et ceci est même un euphémisme lorsque l'on s'intéresse plus précisément à la situation sanitaire à Mayotte. Tenter de mieux comprendre les mécanismes de diffusion des bactéries multi- et hautement-résistantes dans ces territoires peut permettre de faire un premier bilan pouvant servir de socle (i) à des futures études scientifiques plus ciblées sur les problématiques principales identifiées, et (ii) à la mise en place de futures politiques de santé adaptées.

Dans ce travail, nous avons répondu à l'objectif principal qui consistait à explorer la dynamique de diffusion des EBLSE dans les 3 compartiments humain, animal et environnemental à La Réunion en prenant pour modèle l'espèce *E. coli*. Nous avons ainsi déterminé, en explorant le core-genome, le résistome et partiellement le plasmidome de ces souches, que les animaux de rente n'étaient pas un réservoir de transmission prépondérant de *E. coli* BLSE pour l'Homme à La Réunion et que l'essentiel de ces transmissions était très probablement issu d'échanges inter-humains. Cette étude apporte de nouvelles connaissances sur ce phénomène à La Réunion et oriente sur les mesures qui pourraient permettre de limiter cette diffusion des BMR sur l'île. Nous avons également tenté de répondre aux objectifs secondaires en faisant un premier bilan exhaustif des EPC à La Réunion et en décrivant les modalités d'importation de ces BHRé sur le territoire réunionnais. Nous avons ainsi pu décrire certaines émergences comme une épidémie de *E. cloacae* IMI-1 à Mayotte qui s'est secondairement importée à La Réunion. La Réunion est ainsi un DOM non seulement fortement touché par la diffusion des EPC (4^{ème} position en France en nombre de cas par rapport à la population réunionnaise) mais également soumis à une forte pression d'importation de ces BHRé (365). Les multiples liens établis entre La Réunion et Mayotte démontrent l'importance d'établir une politique régionale coordonnée de lutte contre l'antibiorésistance. Et même, plus largement, une politique inter-régionale par l'intermédiaire de la Commission de l'Océan Indien.

Les perspectives de ce travail sont multiples et étroitement liées aux collaborations que nous réussirons à maintenir, établir et mettre en application dans la zone. Au niveau scientifique tout d'abord, où il faudra compléter cette collection de *E. coli* BLSE avec des souches originaires d'autres secteurs pour valider notre modèle et quantifier plus précisément la part de chaque compartiment

dans les transmissions des EBLSE chez l'Homme. Une autre perspective consistera à affiner notre méthode d'analyse du résistome en s'intéressant à d'autres supports de résistance comme les IS, les transposons ou les intégrons car le mobilome ne correspond pas *stricto sensu* au plasmidome. Certaines études récentes ont notamment mentionné le rôle de certaines IS dans des transferts horizontaux inter-niches écologiques, il est donc important de vérifier et quantifier cette hypothèse (289). Enfin, le dernier challenge consistera à déterminer la source d'exposition communautaire des *E. cloacae* IMI-1 en réalisant plusieurs campagnes de prélèvements sur place. Le deuxième versant des perspectives sera ainsi de réussir à tisser de réelles collaborations sur l'antibiorésistance entre les 2 ARS de La Réunion et de Mayotte pour mener une action coordonnée et adaptée à chacun de ces 2 territoires. Cela permettrait de mener des actions préventives, en amont sur le terrain, pour prévenir d'éventuelles nouvelles émergences ou transmissions.

Ne nous trompons pas, si les BLSE sont aujourd'hui la problématique principale des infections dans le secteur communautaire et hospitalier à La Réunion, les EPC constituent le combat de demain. Dans la mesure où peu de molécules sont nouvellement commercialisées et que le gène *bla_{NDM}* (intrinsèquement plus résistant) est prédominant à La Réunion, ces BHRé pourraient conduire à de réelles impasses thérapeutiques à court terme (366). Le Pr T.R. Walsh parle de la carbapénèmase NDM comme « la future CTX-M du XXI^{ème} siècle » en raison de la plasticité des plasmides portant le gène *bla_{NDM}* et des très nombreuses IS porteuses d'autres gènes de résistance localisées sur ces plasmides. Des souches à la fois résistantes aux carbapénèmes et la colistine (résistance naturelle ou hétéro-résistance) ont déjà été rencontrées au CHU de La Réunion. Si l'association aztréonam+avibactam constitue le dernier rempart thérapeutique en cas d'infection sévère, on ne sait pas combien de temps celui-ci perdurera. Il est ainsi urgent de mener une politique efficace de réduction de la consommation des antibiotiques dans tous les secteurs et la constitution d'un CRAtb à La Réunion ne peut être qu'un atout pour y parvenir. Enfin, freiner l'introduction des EPC dans les établissements de soins par une politique d'hygiène hospitalière réactive et coordonnée des EOH avec le laboratoire de Microbiologie et le SAMU (qui coordonne les EVASAN) comme c'est déjà le cas au CHU Nord est un outil indispensable pour s'adapter aux « profils à risques » de patients ayant voyagé et susceptibles d'être colonisés au niveau digestif par ces EPC. **Ce n'est qu'au moyen d'une action massive, coordonnée et inter-disciplinaire associant connaissances scientifiques et politiques de santé que nous parviendrons à éviter la tragédie annoncée.**

« A moins que les nombreux acteurs concernés agissent d'urgence, de manière coordonnée, le monde s'achemine vers une ère post-antibiotique, où les infections courantes et des blessures mineures qui ont été soignées depuis des décennies pourraient à nouveau tuer »

Dr Keiji Fukuda,

Sous-directeur général de l'OMS, 2014.

Ou plus simplement, en créole réunionnais...

« Sof si le domoun i bouz à zot, tout ensemb, le monde i sava vers un l'ère post biotique, ou le band zinfection tou lé zour, et le ti bobo moins grave ke l'a fini et l'a soigné lé la lontan, i pe reni tuer encore »

Traduction Julien Aure.

AUTRES TRAVAUX DE VALORISATION SCIENTIFIQUE

Au cours de ce travail de thèse, j'ai également initié ou participé à d'autres travaux scientifiques s'intéressant à la circulation communautaire ou intra-hospitalière des EBLSE ou des EPC dans la zone. Ces travaux, issus de nos collaborations avec le CIRAD et l'UMR Chrono-Environnement, ont fait l'objet des valorisations suivantes :

(1) **Miltgen G**, Garrigos T, Cholley P, Deleume M, Allou N, Allyn J, Wilkinson DA, Lugagne N, Belmonte O, Bertrand X, Hocquet D, Mavingui P. Nosocomial cluster of carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in an intensive care unit dedicated COVID-19. *Antimicrob Resist Infect Control*. *En cours de reviewing*.

(2) Gay N, Lugagne N, **Miltgen G**, Belmonte O, Cardinale E. Reunion Island, a sentinel island for multidrug-resistant bacteria surveillance in South-western Indian ocean: a retrospective survey using hospitalized patients screening, 2015-2017. *BMC Public Health*. 2020 Oct 1;20(1):1488.

(3) Gay N, Leclaire A, Laval M, **Miltgen G**, Jégo M, Stéphane R, Jaubert J, Belmonte O, Cardinale E. Risk Factors of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *Enterobacteriaceae* Occurrence in Farms in Reunion, Madagascar and Mayotte Islands, 2016-2017. *Vet Sci*. 2018 Feb;23:5(1).

Antimicrobial Resistance & Infection Control

Nosocomial cluster of carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in an intensive care unit dedicated COVID-19

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Nosocomial cluster of carbapenemase-producing <i>Enterobacter cloacae</i> in an intensive care unit dedicated COVID-19
Article Type:	Short report
Funding Information:	
Abstract:	Concomitant prevention of SARS-CoV-2 and extensively drug-resistant bacteria transmission is a difficult challenge in intensive care units dedicated to COVID-19 patients. We report a nosocomial cluster of four patients carrying NDM-1 plasmid-encoded carbapenemase-producing <i>Enterobacter cloacae</i> . Two main factors may have contributed to cross-transmission: misuse of gloves and absence of change of personal protective equipment, in the context of COVID-19-associated shortage. This work highlights the importance of maintaining infection control measures to prevent CPE cross-transmission despite the difficult context and that this type of outbreak can potentially involve several species of <i>Enterobacteriales</i> .
Corresponding Author:	Guillaume MILTGEN, M.D., Ph.D. Student Centre Hospitalier Universitaire de la Reunion SAINT-DENIS, LA REUNION FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author E-Mail:	guillaume.miltgen@chu-reunion.fr
Corresponding Author's Institution:	Centre Hospitalier Universitaire de la Reunion
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Guillaume MILTGEN, M.D., Ph.D. Student
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Guillaume MILTGEN, M.D., Ph.D. Student Thomas Garrigos Pascal Cholley Marine Deleume Nicolas Allou Jérôme Allyn David A. Wilkinson Nathalie Lugagne Olivier Belmonte Xavier Bertrand Didier Hocquet Patrick Mavingui
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	
Manuscript Classifications:	10: Healthcare-Associated Infections (HAIs); 10.030: Sepsis; 20: Healthcare-Associated Infectious organisms; 20.050: Carbapenem resistant enterobacteriaceae

	(CRE); 30: Antimicrobial resistance; 40: Infection control
Additional Information:	
Question	Response
<p>Is this study a clinical trial?</p> <p>A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.</p>	No

[Click here to view linked References](#)

**Nosocomial cluster of carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae*
in an intensive care unit dedicated COVID-19**

1
2
3
4
5 Guillaume Miltgen¹⁻², Thomas Garrigos¹, Pascal Cholley^{3,4}, Marine Deleume¹, Nicolas Allou⁵, Jérôme
6
7 Allyn⁵, David A. Wilkinson², Nathalie Lugagne⁶, Olivier Belmonte¹, Xavier Bertrand^{3,4}, Didier Hocquet^{3,4}
8
9 and Patrick Mavingui²
10

11
12
13 ¹ Laboratoire de Bactériologie, CHU Félix Guyon, Saint-Denis, La Réunion, France.

14
15 ² UMR PIMIT, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249,
16
17 Université de La Réunion, Sainte-Clotilde, La Réunion, France.

18
19 ³ Service d'Hygiène Hospitalière, CHU Jean Minjot, Besançon, France.

20
21 ⁴ UMR CNRS 6249 Chrono-Environnement, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon,
22
23 France.

24
25 ⁵ Service de réanimation polyvalente, CHU Félix Guyon, Saint-Denis, La Réunion, France.

26
27 ⁶ Service d'hygiène hospitalière, CHU Félix Guyon, Saint-Denis, La Réunion, France.

28
29
30
31
32
33 *** Corresponding author:** Guillaume Miltgen

34
35 E-mail address: guillaume.miltgen@chu-reunion.fr ; phone number: +262 2 62 90 62 66

36
37
38 Postal address : Laboratoire de Bactériologie, CHU Félix Guyon, Allée des Topazes, 97400 Saint-Denis,
39
40 La Réunion, France.

41
42
43
44
45 **Keywords**

46
47 *Enterobacter cloacae*; carbapenemase; cross transmission; personal protective equipment; intensive
48
49 care unit; COVID-19.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

1
2
3 Concomitant prevention of SARS-CoV-2 and extensively drug-resistant bacteria transmission is
4
5 a difficult challenge in intensive care units dedicated to COVID-19 patients. We report a nosocomial
6
7 cluster of four patients carrying NDM-1 plasmid-encoded carbapenemase-producing *Enterobacter*
8
9 *cloacae*. Two main factors may have contributed to cross-transmission: misuse of gloves and absence
10
11 of change of personal protective equipment, in the context of COVID-19-associated shortage. This
12
13 work highlights the importance of maintaining infection control measures to prevent CPE cross-
14
15 transmission despite the difficult context and that this type of outbreak can potentially involve several
16
17 species of *Enterobacteriales*.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

1 The SARS-CoV-2 pandemic and antimicrobial resistance are two major public health problems
2
3 that have so far rarely been intertwined (1-2). Unfortunately, in regions with high prevalence of
4
5 carbapenemase-producing *Enterobacteriales* (CPE) such as the Southwest Indian Ocean area (SIOA),
6
7 some tertiary hospitals may be simultaneously confronted with both phenomena (3). We describe here
8
9 a nosocomial cluster of NDM-1 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* (NDM-1 Ec) in an
10
11 intensive care unit (ICU) of the University Hospital of Reunion Island (UHRI).
12
13
14
15

16 Reunion Island is a French overseas territory located close to Madagascar with similar
17
18 healthcare standards to those found in mainland France. Patients with COVID-19 hypoxemic
19
20 pneumonia from the SIOA requiring ICU are evacuated to the UHRI, considered as the reference
21
22 hospital in the region. During the SARS-CoV-2 epidemic, one of the three subunits of the ICU was
23
24 dedicated to suspected or confirmed COVID-19 patients.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Methods

CPE screening

Within the framework of the establishment policy, patients hospitalized in the ICU were systematically screened for carriage of multidrug-resistant microorganisms, upon admission and weekly thereafter. Patients were kept on contact precautions until the first negative result was obtained. CPE screening was performed on rectal swabs by culture on selective chromogenic agar (ChromID CARBA Smart, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) according to the manufacturer's recommendations.

CPE identification and antimicrobial susceptibility testing

Bacterial species was identified using MALDI-TOF mass spectrometry (Microflex, Bruker daltonics, Bremen, Germany). Carbapenemase production was confirmed using immunochromatographic assay (NG Rapid Test CARBA-5, NG Biotech, Guipry, France) and multiplex PCR (Xpert Carba, Cepheid, Sunnyvale, USA). Antibiotic susceptibility testing was performed by agar diffusion according to the 2020 EUCAST recommendations (www.eucast.org).

Molecular genotyping and bioinformatics analysis

Clonality between isolates was evaluated by pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing as previously described (3). Conjugation experiments were performed using the azide-resistant laboratory strain *Escherichia coli* J53 as previously described (4). Plasmid DNA of the transconjugant was extracted using the QIAGEN Maxiprep kit according to the manufacturer's recommendations. Sequencing of the extracted plasmid and of the genome of *E. cloacae* donor strain was performed on the MinION using an R9 (FLO-MIN106) flowcell. Antibiotic resistance genes were detected by querying the ResFinder database v. 4.0 (5). The plasmid sequence generated is available on the Genbank database under the accession number MW464182. The detailed bioinformatics protocol is supplied in the supplementary material.

Results

1 Case 1, considered as the index case, was hospitalized in ICU on 2020 June 13. He was positive
2
3 for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* both producing NDM-1 on admission and for NDM-1 Ec
4
5 for the first time on July 13, one month after its admission (Figure 1). During July and August 2020,
6
7 three other patients hospitalized in adjacent rooms tested positive for NDM-1 Ec. Case 1, originating
8
9 from Reunion Island, died from bacteremia with NDM-1 Ec; the other three cases were colonized.
10
11 Cases 2 and 3 had been transferred from Madagascar and were hospitalized for acute respiratory
12
13 distress due to COVID-19. Case 4 came from Reunion Island and was hospitalized for 3 days for a
14
15 digestive haemorrhage. The systematic screening on admission was negative for Cases 2, 3 and 4. A
16
17 total of seven isolates were collected (Figure 1). Four isolates were not susceptible to all β -lactams,
18
19 fluoroquinolones, sulfamethoxazole-trimethoprim, amikacin, and three were additionally resistant to
20
21 colistin (Minimal Inhibitory Concentration – MIC, 16 mg/L) and to tigecycline (MIC, 2 mg/L). They
22
23 remained susceptible only to gentamicin (MIC, 1 mg/L), fosfomicin (MIC, 16 mg/L) and the
24
25 combination of aztreonam and avibactam (cumulated MIC, 0.5 mg/L).
26
27
28
29
30
31

32
33 The analysis of five isolates of NDM-1 Ec (two isolates – one susceptible and one resistant to
34
35 colistin – were analyzed from Case 1) shared the same pulsotype and belonged to Sequence Type 90.
36
37 Resistance to carbapenem could be transferred by conjugation to the *E. coli* J53. The resistance gene
38
39 *bla*_{NDM-1} was carried by an IncC plasmid of 147,312 bp and associated with the bleomycin resistance
40
41 gene *ble* in a truncated IS*Aba125* insertion sequence (Figure 2). This plasmid also harbored a duplicated
42
43 region with *ampC* and *sugE* genes (3rd cephalosporin and quaternary ammonium resistances,
44
45 respectively), interspersed between components of the *tra* operon (Figure 2). The resistance
46
47 mechanism to colistin has not been explored.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Discussion

1 A cluster of CPEs shared by four patients is unusual in this ward, where paramedical staff are
2 well trained to preventive measures of cross-transmission and where enhanced contact precautions
3 often need to be applied for medical evacuation (6). In our opinion, two main factors could have
4 favoured the transmission of NDM-1 Ec - most likely imported into the ICU by the Case 1 - to the other
5 three patients: (i) the misuse of gloves in nursing acts, and (ii) the absence of change of over-gowns
6 between patient rooms, considering that the whole subunit was as a COVID-positive sector. This way
7 of using personal protective equipment (PPE) was implemented to limit the risk of contamination of
8 nursing staff during undressing and to reduce demand in a context of a PPE shortage. Concomitant
9 positive screening of Cases 2, 3, and 4 within a short time interval of seven days corroborates the
10 probable health-care workers carrying transmission (Figure 1). Moreover, these three patients had a
11 negative rectal screening at their admission into the ICU, confirming the nosocomial transmission.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 We immediately implemented infection control measures including (i) simultaneous screening
28 of all patients in the subunit and (ii) strict application of enhanced contact precautions with glove and
29 over-gown change between each room. In addition, a hygienist nurse was assigned to the ICU to advise
30 and retrain the nursing staff in the preventive measures of cross-transmission. Since, no new cases of
31 infection or colonization with this NDM-1 Ec clone have occurred to date, three months after the
32 episode.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Although the carbapenemase-encoding gene may be carried by the same species of
44 *Enterobacteriales* (as described here), one should be aware that carbapenemase-resistance
45 determinants are highly transferable via mobile genetic elements and can easily spread to other co-
46 occurring species of the gut flora, like *K. pneumoniae* or *E. coli*, as in Case 1 and described elsewhere
47 (7). As recently stated in an update of the French national guidelines, it is therefore important to
48 consider the type of enzyme produced by the enterobacteria (such as OXA-48-like or NDM)
49 independently of the bacterial species to define whether patients are part of the same outbreak (6).
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66

as this patient had been treated with colistin (Figure 1).

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

Conclusions

1 Here, we point out a new situation where the admission of COVID-19 patients can influence
2
3 the long-established infection control behaviours. Such “collateral damage” has recently been
4
5 described by authors who investigated the first nosocomial clusters in COVID-19 units (8-10). Our
6
7 observation highlights the importance of maintaining measures to control CPE despite the additional
8
9 pressure put on ICUs by the large number of incoming COVID-19 cases. Finally, clinicians and hygienists
10
11 should be aware that an CPE’s outbreak can affect several species of *Enterobacteriales* due to the high
12
13 transferability of the carbapenemase-encoding resistance genes.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Ethics approval and consent to participate

1 This study was approved by the Ethics Committee of the French Society of Infectious Diseases. The
2 need for informed consent was waived, as the study was non-interventional and followed our usual
3 protocol. However, all patients or their legally authorised representatives were verbally informed
4 about the process of data collection, and could refuse to participate in the study.
5
6
7
8
9

Consent for publication.

10
11 Not applicable.
12
13
14
15

Availability of data and materials

16 All data generated or analysed during this study are included in this published article and its
17 supplementary information files.
18
19
20
21
22
23
24

Competing interest

25
26 None declared.
27
28
29
30

Funding

31
32 None.
33
34
35
36
37
38

Authors' contributions

39 GM designed the study and wrote the manuscript. TG, MD, NA, JA contributed to acquisition, analysis
40 and interpretation of data. PC and DW made molecular genotyping and bioinformatics analysis.
41
42 NL, OB, XB, DH and PM critically revised the manuscript. GM and PM coordinated the study. All
43 authors read and approved the final manuscript.
44
45
46
47
48
49
50
51

Acknowledgements

52 We thank Julien Houivet and Karine Gambarotto for their help in the investigation and control of the
53 outbreak.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

1. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, To KK-W, Chu H, Yang J, *et al.* A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. 2020; 395(10223):514–23.
2. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019 Jan;19(1):56-66.
3. Miltgen G, Cholley P, Martak D, Thouverez M, Seraphin P, Leclaire A, *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* circulating in the Reunion Island, a French territory in the Southwest Indian Ocean. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020 19;9(1):36.
4. Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring b-lactamase gene *bla*CTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:1282–6.
5. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Dec 1;75(12):3491-3500.
6. Haut Conseil de Santé Publique. Actualisation des recommandations relatives à la maîtrise de la diffusion des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe). Décembre 2019. <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=758>.
7. Lo S, Goldstein V, Petitjean M, Rondinaud E, Ruppe E, Lolom I, *et al.* Analyse génomique d'une épidémie hospitalière d'entérobactéries productrices de NDM. CO-067. Congrès RICAI 2019. https://interactive-programme.europa-organisation.com/slides/programme_ricai-2019/CO-067.pdf.
8. Stevens MP, Doll M, Pryor R, Godbout E, Cooper K, Bearman G. Impact of COVID-19 on traditional healthcare-associated infection prevention efforts. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020:1–2.
9. Farfour E, Lecuru M, Dortet L, Guen ML, Cerf C, Karnycheff F *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacterales* outbreak: another dark side of COVID-19. *Am J Infect Control*. 2020 Oct 1:S0196-6553(20)30895-6.
10. Kampmeier S, Tönnies H, Correa-Martinez CL, Mellmann A, Schwierzeck V. A nosocomial cluster of vancomycin resistant *enterococci* among COVID-19 patients in an intensive care unit. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020 Sep 22;9(1):154.

Appendices

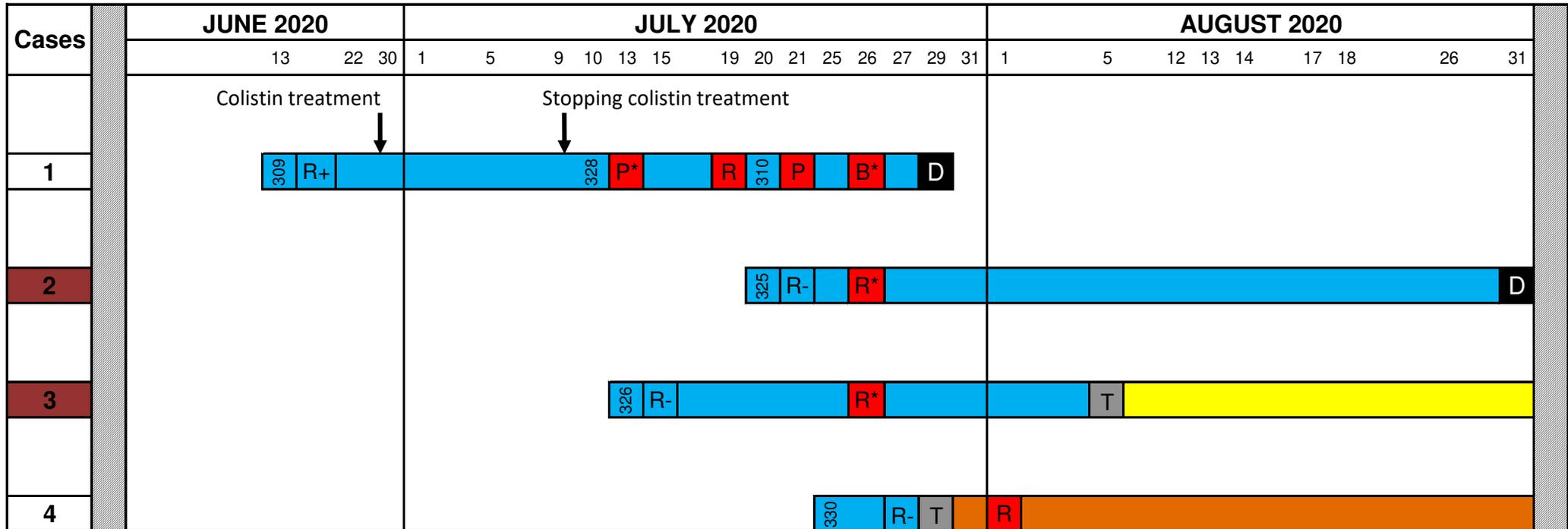
Figure 1.

Timeline of patients infected/colonized with NDM-1 producing *Enterobacter cloacae* (NDM-1 Ec) hospitalized in intensive care unit of the University Hospital of Reunion Island, Saint-Denis, France, June-August 2020 (n=4). Each NDM-1 Ec positive patient is represented by a line and each positive sample is symbolized by a red box. For the positive clinical samples, letters in the red boxes indicate the specimen source: B for blood origin, P for pulmonary origin and R for rectal origin. Numbers in the boxes are those of the room in ICU. The death of Case 2 was considered not attributable to NDM-1 Ec.

Figure 2.

Schematic map of the putative NDM-1 containing plasmid identified by conjugative transfer and MinION long-read sequencing. Genes associated with plasmid replication and maintenance as well as mobile elements related to the acquisition of antibiotic resistance are labelled. Other gene labels are left off for clarity. The plasmid carried 2 insertion sequences included resistances gene : (i) a truncated IS*Aba125* with *bla*_{NDM-1} and *ble* genes and (ii) a duplicated region with *ampC* and *sugE* genes, interspersed between components of the *tra* operon.

Figure 1



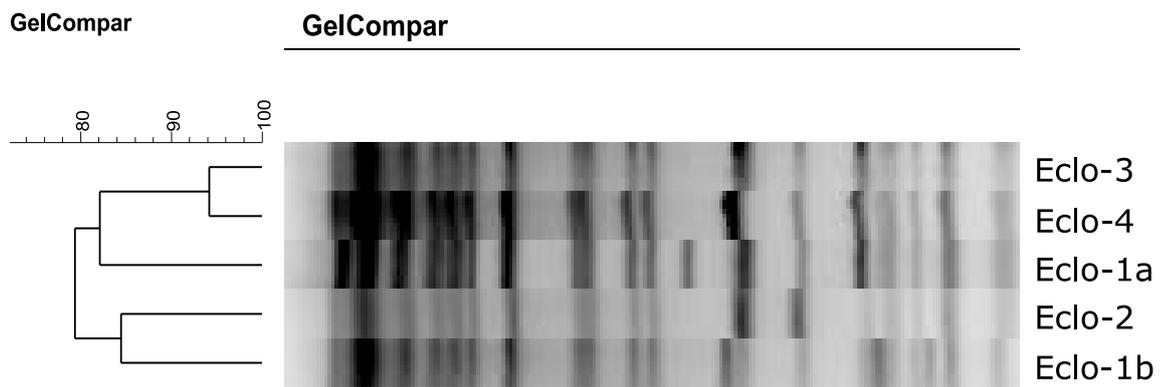
WARDS

- Intensive care unit
- Pneumology
- Gastroenterology

SAMPLES

- Clinical positive sample (* Resistant to colistin)
- Positive rectal screening (without *E. cloacae*)
- Negative rectal screening
- Transfert
- Death
- SARS-CoV-2 positive patients

Figure S1



Dendrogram obtained by PFGE using the Bionumerics software (Applied Math, Kortrijk, Belgium) and UPGMA (*Unweighted Pair Group using Arithmetic Averages*) hierarchical algorithm for the 5 isolates of NDM-1 carbapenemase-producing *E. cloacae*.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Reunion Island, a sentinel territory for antimicrobial-resistant bacteria surveillance in the South-Western Indian Ocean: a retrospective survey using hospitalized patient screening, 2015–2017

Noellie Gay^{1*}, Nathalie Lugagne², Guillaume Miltgen^{3,4}, Olivier Belmonte³ and Eric Cardinale^{1,5}

Abstract

Background: In 2015, antimicrobial resistance was identified as a public health priority for the South-Western Indian Ocean (SWIO) (i.e. Comoros, Madagascar, Mauritius, Mayotte (France), Reunion Island (France), and Seychelles). However, in 2020, colonization rates of antimicrobial-resistant bacteria (ARB) in human populations on most islands in SWIO were still not known and neither hospital nor community colonization rates had been estimated. The aim of this study was to estimate the prevalence of colonization of six ARB groups in hospitalized patients residing in the SWIO territories. The six groups comprise extended-spectrum betalactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E), carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant enterococci (VRE), and both ceftazidime and/or imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. (ACB), and ceftazidime and/or imipenem-resistant *Pseudomonas* spp. (PSA)).

Methods: Based on comprehensive hospital laboratory ARB screening data, we provide the first estimation of ARB colonization rates in hospitalized patients residing in SWIO (2015–2017). Using ARB colonization rates in Reunion Island (France) as the reference for estimating odds ratio, we identified at risk patients based on their territory of residence.

Results: The survey pointed to significantly higher overall ARB colonization rates in patients from Comoros, Madagascar, Mayotte, and Seychelles compared to Reunion Island as the reference. Extended-spectrum betalactamase producing Enterobacteriaceae was found to be the most common ARB group colonizing patients from SWIO territories. The highest MRSA colonization rates were observed in patients from Mayotte and Seychelles. Colonization by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) was highest in patients from Mauritius.

Conclusion: These results identify high ARB colonization rates in hospitalized patients from SWIO territories that require further investigation, particularly CRE in Mauritius and MRSA in Seychelles and Mayotte. This study is the first step toward the implementation of a broader regional ARB surveillance system.

Keywords: Epidemiology, Hospital, Indian Ocean, Multidrug resistance, Screening, Colonization

* Correspondence: gnoellie@hotmail.com

¹UMR Animal Santé Territoires Risque Environnement (CIRAD, INRAE, Univ Montpellier), Montpellier, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

An increase in the prevalence of antimicrobial-resistant bacteria (ARB) was observed in Reunion Island (France) between 1997 and 2007 [1]. Epidemiological surveillance in hospitals in In 2015 Reunion Island pointed to trends in the incidence of extended-spectrum betalactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) similar to Occitanian Region in mainland France and a lower incidence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [2].

The South-Western Indian Ocean (SWIO) region contains the islands of the Union of Comoros, Madagascar, Mauritius, Mayotte (France), Reunion Island (France), and Seychelles. Based on a review of the literature, ESBL-E and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) were identified as a main public and veterinary health issue for SWIO [3]. Antimicrobial resistance has been considered a public health priority in the region since 2015. However, the absence of an ARB surveillance network in most SWIO territories and rare publications on the topic prevented researchers from identifying the most affected islands and the implementation of targeted action plans.

Felix-Guyon University hospital in Reunion Island is well suited for medical evacuations and receives most patients evacuated from other islands of SWIO. Since 2015, an ARB screening strategy has been in place for all patients residing abroad who arrive via medical evacuation, or who visited a foreign country in the three preceding months, and/or were hospitalized abroad in the past year. All patients admitted to the intensive care patients in Felix-Guyon hospital are screened to avoid introducing ARB in the unit.

Based on comprehensive hospital laboratory ARB screening data, we estimated the prevalence of colonization by ARB (i.e. ESBL-E, CRE, MRSA, vancomycin-resistant enterococci, and both ceftazidime and/or imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. (ACB), and ceftazidime and/or imipenem-resistant *Pseudomonas* spp. (PSA)) of hospitalized patients residing in SWIO. This is the first estimation of the ARB colonization rates in patients from SWIO territories using standard indicators.

Methods

Data collection and inclusion criteria

We conducted a retrospective survey of all patients admitted to the Felix-Guyon University hospital, which is the main hospital in Reunion Island, between 2015 and 2017. Only patients who resided in SWIO were included. All the patients were screened for ARB detection (i.e. anal for ESBL-E, CRE, VRE, ACB, PSA, and nasal swabbing for MRSA). For Reunion Island, only patients admitted to the intensive care unit (all patients were

screened) were used as the reference to estimate odds ratio.

Definition of ARB

Bacterial species were routinely identified for all isolates using MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Antimicrobial susceptibility testing was performed using the disc diffusion method according to guidelines published by the Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing of the French Society of Microbiology in 2015 [4].

The ARB groups included in the survey were:

- (i) *Staphylococcus aureus* resistant to oxacillin was designated as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) according to the French national multidrug-resistant bacteria surveillance network [5];
- (ii) Enterobacteriaceae resistant to cefotaxime and/or ceftazidime and/or cefepime were designated as ESBL-E if a synergy between third-generation cephalosporins and clavulanic acid was confirmed by the disc diffusion method according to French recommendations [4]. ESBL-E definition was according to the French national multidrug-resistant bacteria surveillance network [5];
- (iii) Enterobacteriaceae resistant to imipenem and/or ertapenem were confirmed for the presence of relevant resistance genes by PCR (X-pert Carba-R, GeneXpert, Cepheid, Sunnyvale, USA) and designated as carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE).
- (iv) *Enterococcus faecium* resistant to vancomycin and/or teicoplanin and confirmed for the presence of relevant resistance genes by PCR (X-pert vanA/vanB, GeneXpert, Cepheid, Sunnyvale, USA) were designated by vancomycin-resistant enterococci (VRE);
- (v) both *Acinetobacter* spp. (ACB) and (vi) *Pseudomonas* spp. (PSA) included in our survey were ceftazidime and/or imipenem resistant.

A patient was considered ARB positive if one or more ARB group was isolated from that patient.

Statistical analyses

ARB colonization rates in patients were compared based on their territory of residence using a logistic regression analysis with ARB colonization as the dependent variable and the patient's territory of residence as the explanatory variable. Odds ratio were calculated using patients residing in Reunion Island as the reference and the statistical significance threshold was set at p -values < 0.05. Confidence intervals of ARB prevalence were estimated using

the Wilson method. All statistical analyses were performed using R software version 3.4.2 [6], the package *tydiverse* [7], *binom* [8], and the package *finalfit* [9].

The study was approved by the French national commission on data protection and liberties (reference 2, 210,228 v0, January 10th 2019).

Results

From January 1st 2015 to December 31st 2017, a total of 4135 hospitalized patients from the SWIO territories were surveyed. A total of 978 out of 4135 (23.7%) patients tested positive for ARB colonization.

The number of hospitalized patients varied between the SWIO territories of residence ranging from 13 patients residing in Seychelles to 2184 patients residing in Reunion Island. The highest ARB colonization rates were observed for patients residing in Seychelles (61.5%) and Madagascar (41.3%) (Fig. 1). A total of 923 (94.4%) ARB positive patients were colonized by ESBL-E. ARB colonization rates varied with the patient's territory of residence.

Overall, ARB colonization rates were significantly higher in Comoros, Madagascar, Mayotte, and Seychelles than in Reunion Island (used as reference); ESBL-E colonization rates followed the same trend (Table 1). MRSA colonization rates were significantly higher in Seychelles and Mayotte hospitalized patients than in patients residing in Reunion Island. CRE colonization rates were significantly higher in patients residing in Mauritius than in patients residing in Reunion Island.

Discussion

This study pointed to higher ARB colonization rates in hospitalized patients from Comoros, Madagascar, Mayotte, and Seychelles compared to patients who reside in Reunion Island. ESBL-E colonization was common in all SWIO territories whereas specific epidemiological trends were observed for MRSA and CRE. Higher MRSA colonization rates were reported in patients from Mayotte and Seychelles and a high CRE colonization rate was identified in patients residing in Mauritius ($p < 0.001$). These results are the first step toward a regional hospital-based ARB surveillance system as planned by the Indian Ocean Commission in 2015 [10].

Our survey used the biggest sample of SWIO individuals ever reported in the literature. The study design is based on a convenience sample. Accordingly individuals included in the analysis were not randomly selected, but these data are relevant for the estimation of ARB colonization rates in SWIO hospitals based on the knowledge that i) the patient's territory of residence is a known risk factor for ARB infection and carriage [11–14] and that ii) individuals included in the study were probably looking for care in Reunion Island after being treated in facilities in the territory in which they reside. Thus, estimated ARB colonization rates should approximate the ARB epidemiological situation in local SWIO hospitals. However, the socio-economic status of patients seeking care on Reunion Island (higher incomes than the local population) may have favor access to healthcare, medicine, and hygiene. Accordingly,

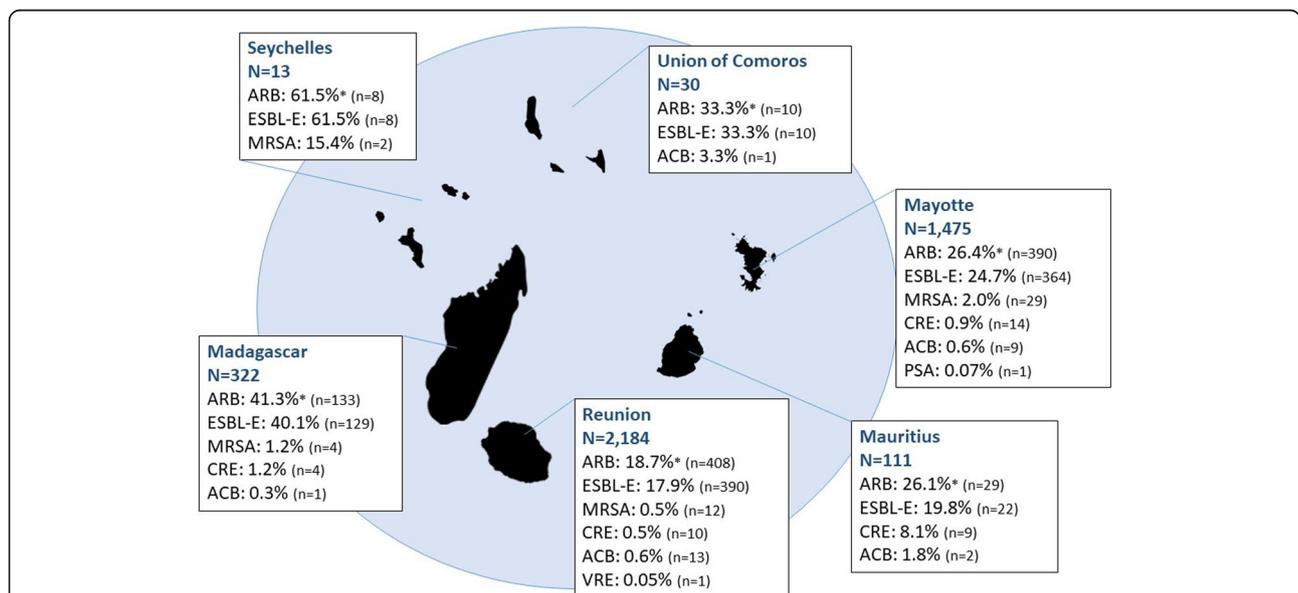


Fig. 1 ARB colonization rates according to the patient's territory of residence in the South-Western Indian Ocean. * An ARB positive patient could be a carrier of more than one ARB group; ESBL-E: extended-spectrum betalactamase producing Enterobacteriaceae; MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CRE: carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; ACB: ceftazidime and/or imipenem-resistant *Acinetobacter* spp.; VRE: vancomycin-resistant enterococci; PSA: ceftazidime and/or imipenem-resistant *Pseudomonas* spp.

Table 1 Comparison of ARB colonization rates according to the patient’s territory of residence (2015–2017) using Reunion Island (France) as reference

	Patients (n)	ARB positive patients		ESBL-E		MRSA		CRE	
		OR (95% CI)	Prevalence (95% CI)	OR (95% CI)	Prevalence (95% CI)	OR (95% CI)	Prevalence (95% CI)	OR (95% CI)	Prevalence (95% CI)
Seychelles	13	7.0 [2.3–23.2] **	61.5% [35.5–82.3%]	7.4 [2.4–24.5] **	61.5% [35.5–82.3%]	32.9 [4.8–140.8] **	15.4% [4.3–42.2%]	–	–
Madagascar	322	3.1 [2.4–3.9] **	41.3% [36.1–46.8%]	3.1 [2.4–3.9] **	40.1% [34.9–45.5%]	2.3 [0.7–6.6]	1.2% [0.5–3.2%]	2.7 [0.8–8.2]	1.2% [0.5–3.2%]
Comoros	30	2.2 [1.0–4.6] *	33.3% [19.2–51.2%]	2.3 [1.0–4.8] *	33.3% [19.2–51.2%]	–	–	–	–
Mayotte	1475	1.6 [1.3–1.8] **	26.4% [24.3–28.8%]	1.5 [1.3–1.8] **	24.7% [22.5–26.9%]	3.6 [1.9–7.4] **	2.0% [1.4–2.8%]	2.1 [0.9–4.8]	0.9% [0.6–1.6%]
Mauritius	111	1.5 [1.0–2.4]	26.1% [18.9–35.0%]	1.1 [0.7–1.8]	19.8% [13.5–28.2%]	–	–	19.2 [7.5–48.6] **	8.1% [4.3–14.7%]
Reunion	2184	1 (ref)	18.7% [17.1–20.4%]	1 (ref)	17.9% [16.3–19.5%]	1 (ref)	0.5% [0.3–1.0%]	1 (ref)	0.5% [0.2–0.8%]

ARB Antimicrobial-resistant bacteria, ESBL-E Extended-spectrum betalactamase producing Enterobacteriaceae, MRSA Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, CRE Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, OR Odds ratio, CI Confidence interval, ref. reference for odds ratio estimation; ** ≤ 0.001; * < 0.05; ACB, PSA, and VRE are not presented here as odds ratio were not significant

estimated ARB colonization rates could underestimate the real colonization rates in local health care settings as poverty is a known risk factor for ARB colonization [15]. Furthermore, using screening data from patients in the intensive care unit in Reunion Island (reference) may also under-estimate the odds ratio. Indeed, the intensive care unit has the highest prevalence of hospital-acquired infections in hospital settings [16]. Finally, the small number of hospitalized patients arriving from Seychelles and Comoros could limit our interpretation.

ESBL-E occurrence in SWIO has already been highlighted as a public health issue both in the community and in hospitals [3] for which our analysis provided quantitative confirmation. For instance, the estimated ESBL-E colonization rate for Madagascar was high (40.1%) which is in accordance with the colonization rates of travelers reported in the literature, which ranged from one in three (33.3%) [17] to four out of seven (57.1%) [18] in 2012–2013, but higher than the 18.5% ESBL-E colonization rate reported in the community in 2013–2014 [19]. A high CRE colonization rate in patients repatriated from Mauritius has already been reported [20]; this may confirm CRE circulation in hospitals in Mauritius and/or in the community. Large fluxes of travelers from India may also contribute to changes in ARB epidemiology in Mauritius [21] as NDM-producing isolates are considered endemic in India [22]. Finally, as ACB and PSA colonization rates were low in SWIO patients, comparisons of the two colonization rates between territories were not possible. Further surveys are needed to confirm the low rates of ACB and PSA colonization observed in this study.

Conclusion

Our study provides the first estimate of ARB colonization rates in hospitalized patients in the SWIO. Overall high ESBL-E colonization rates were identified in patients from SWIO territories; MRSA and CRE colonization rates were high in certain territories. These results raise awareness on the circulation of specific ARB groups in local SWIO hospitals. This is the first step toward a targeted action plan for the prevention and control of ARB in the region. The results of this study will serve as a basis for the implementation of broader regional surveillance systems.

Abbreviations

ARB: Antimicrobial-resistant bacteria; SWIO: South-Western Indian Ocean; ESBL-E: Extended-spectrum betalactamase producing Enterobacteriaceae; MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CRE: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; ACB: Ceftazidime and/or imipenem-resistant *Acinetobacter* spp.; VRE: Vancomycin-resistant enterococci; PSA: Ceftazidime and/or imipenem-resistant *Pseudomonas* spp.

Acknowledgements

We are grateful to Laurent Filleul from Santé Publique France for advice on the study design and on the methodology.

Authors' contributions

NG conceived the study. NG, OB, and EC defined the study methods. OB, GM, NL provided the database. NG performed the analyses and drafted the manuscript. All authors provided comments and approved the final version of the manuscript.

Funding

This project was commissioned and funded by the Indian Ocean Health Agency (Noellie Gay PhD fellowship), the INTERREG FEDER TROI 2018–2020 (Eric Cardinale, principal investigator) and the grant L'Oréal-UNESCO For Women in Science 2019 (Noellie Gay rewarded).

Availability of data and materials

The data were obtained from Felix-Guyon hospital laboratory, Saint Denis, Reunion Island. Data were provided for the survey according to the French law (reference 2210228 v0, January 10th 2019) but are not publicly available.

Ethics approval and consent to participate

The study was carried out with the approval of the French Commission for Data Protection (*Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés*) under reference 2210228 v0, January 10th 2019. Neither research ethics committee nor consent by individuals was required for this study as the data were routinely collected and anonymized according to the *Rectificatif au règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données, et abrogeant la directive 95/46/CE (règlement général sur la protection des données) JOUE L127 2 du 23/05/2018*.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹UMR Animal Santé Territoires Risque Environnement (CIRAD, INRAE, Univ Montpellier), Montpellier, France. ²Nosocomial infection Unit, Felix-Guyon University hospital, La Reunion, Saint-Denis, France. ³Bacteriology laboratory, Felix-Guyon University hospital, La Reunion, Saint-Denis, France. ⁴UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, Univ La Réunion), La Reunion, Saint-Denis, France. ⁵Health Monitoring Unit, Indian Ocean Commission, Port-Louis, Mauritius.

Received: 7 February 2020 Accepted: 22 September 2020

Published online: 01 October 2020

References

- Belmonte O, Drouet D, Alba J, Moiton MP, Kuli B, Lugagne-Delpon N, et al. Evolution of Enterobacteriaceae resistance to antibiotics in Reunion Island: emergence of extended-spectrum beta-lactamases. *Pathol Biol.* 2010;58:18–24.
- Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin, France. Résultats 2015. Saint Maurice: Santé publique France; 2017. 112p. Available at: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques/documents/rapport-synthese/surveillance-des-bacteries-multiresistantes-dans-les-etablissements-de-sante-en-france-reseau-bmr-raisin-resultats-2013>. Accessed 5 May 2020.
- Gay N, Belmonte O, Collard JM, Halifa M, Issack MI, Mindjae S, et al. Review of antibiotic resistance in the Indian Ocean commission: a human and animal health issue. *Front Public Health.* 2017;5:162.
- Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing of the French Society of Microbiology. French Society of Microbiology. 2015. Available at: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASFM2019_V1.0.pdf. Accessed 5 May 2020.
- Carbonne A, Arnaud I, Maugat S, Marty N, Dumartin C, Bertrand X, et al. National multidrug-resistant bacteria (MDRB) surveillance in France through the RAISIN network: a 9 year experience. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:954–9.

6. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2019. Available at URL: <https://www.R-project.org/>.
7. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, Francois R, et al. Welcome to tidyverse. *JOSS*. 2019;4:1686.
8. Sundar Dorai-Raj. binom: Binomial Confidence Intervals For Several Parameterizations. R package version 1.1–1; 2014. <https://CRAN.R-project.org/package=binom>.
9. Harrison E, Drake T, Ots R. Finalfit: Quickly Create Elegant Regression Results Tables and Plots when Modelling. R Package version 1.0.1. 2020. <https://CRAN.R-project.org/package=finalfit>.
10. Rapport Annuel 2015. Commission de l'Océan Indien. Port Saint Louis; 2015. Available at: <https://www.commissionoceanindien.org/rapport-annuel-2015/>. Accessed 15 Jan 2020.
11. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*. 2013;62:34–42.
12. Manns BJ, Fanning EA, Cowie RL. Antituberculosis drug resistance in immigrants to Alberta, Canada, with tuberculosis, 1982–1994. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1997;1:225–30.
13. Laifer G, Widmer AF, Simcock M, Bassetti S, Trampuz A, Frei R, et al. TB in low-incidence country: differences between new immigrants, foreign-born residents and native residents. *Am J Med*. 2007;120:350–6.
14. Bryce A, Costelloe C, Hawcroft C, Wootton M, Hay AD. Faecal carriage of antibiotic resistant *Escherichia coli* in asymptomatic children and associations with primary care antibiotic prescribing: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2016;16:359.
15. Herindrainy P, Randrianirina F, Ratovoson R, Ratsima Hariniana E, Buisson Y, Genel N, et al. Rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in community settings in Madagascar. *PLoS One*. 2011;6:e22738.
16. Masse J, Elkalioubie A, Blazejewski C, Ledoux G, Wallet F, Poissy J, et al. Colonization pressure as a risk factor of ICU-acquired multidrug resistant bacteria: a prospective observational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36:797–805.
17. Arcilla MS, van Hattem JM, Haverkate MR, Bootsma MCJ, van Genderen PJJ, Goorhuis A, et al. Import and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17:78–85.
18. Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, Consigny PH, El Mniai A, Boussadia Y, et al. High rate of acquisition but short duration of carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae after travel to the tropics. *Clin Infect Dis*. 2015; 61:593–600.
19. Chereau F, Herindrainy P, Garin B, Huynh BT, Randrianirina F, Padget M, et al. Colonization of extended-spectrum-beta-lactamase- and NDM-1-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in the community in a low-income country: a potential reservoir for transmission of multiresistant Enterobacteriaceae to neonates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:3652–5.
20. Holman AM, Allyn J, Miltgen G, Lugagne N, Traversier N, Picot S, et al. Surveillance of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the Indian Ocean region between January 2010 and December 2015. *Med Mal Infect*. 2017;47:333–9.
21. International travel and Tourism in Mauritius: Digest 2018. <http://statsmauritius.govmu.org/English/StatsbySubj/Pages/INTERNATIONAL-TRAVEL-and-TOURISM.aspx>. Accessed 3 Aug 2020.
22. Dortet L, Cuzon G, Nordmann P. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2012. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:623–7.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Article

Risk Factors of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing Enterobacteriaceae Occurrence in Farms in Reunion, Madagascar and Mayotte Islands, 2016–2017

Noellie Gay ^{1,*}, Alexandre Leclaire ², Morgane Laval ¹, Guillaume Miltgen ^{2,3}, Maël Jégo ¹, Ramin Stéphane ¹, Julien Jaubert ², Olivier Belmonte ² and Eric Cardinale ¹

¹ Animals, Health, Territories, Risks and Ecosystems, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier CEDEX 5, France; laval.morgane1@gmail.com (M.L.); jego.mael@gmail.com (M.J.); ramin.stephane@hotmail.fr (R.S.); eric.cardinale@cirad.fr (E.C.)

² Bacteriology laboratory, Félix Guyon Hospital, Saint-Denis, 97400 Reunion, France; alexandre.leclaire@yahoo.fr (A.L.); guillaume.miltgen@chu-reunion.fr (G.M.); julien.jaubert@chu-reunion.fr (J.J.); olivier.belmonte@chu-reunion.fr (O.B.)

³ UMR PIMIT, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, F-97418 Sainte-Clotilde, La Réunion, France

* Correspondence: noellie.gay@cirad.fr, Tel.: +262-693-828-223

Received: 5 January 2018; Accepted: 19 February 2018; Published: 23 February 2018

Abstract: In South Western Indian ocean (IO), Extended-Spectrum β -Lactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) are a main public health issue. In livestock, ESBL-E burden was unknown. The aim of this study was estimating the prevalence of ESBL-E on commercial farms in Reunion, Mayotte and Madagascar and genes involved. Secondly, risk factors of ESBL-E occurrence in broiler, beef cattle and pig farms were explored. In 2016–2017, commercial farms were sampled using boot swabs and samples stored at 4 °C before microbiological analysis for phenotypical ESBL-E and gene characterization. A dichotomous questionnaire was performed. Prevalences observed in all production types and territories were high, except for beef cattle in Reunion, which differed significantly. The most common ESBL gene was *bla*_{CTX-M-1}. Generalized linear models explaining ESBL-E occurrence varied between livestock production sectors and allowed identifying main protective (e.g., water quality control and detergent use for cleaning) and risk factors (e.g., recent antibiotic use, other farmers visiting the exploitation, pet presence). This study is the first to explore tools for antibiotic resistance management in IO farms. It provides interesting hypothesis to explore about antibiotic use in IO territories and ESBL-E transmission between pig, beef cattle and humans in Madagascar.

Keywords: Indian ocean; livestock; extended-spectrum β -Lactamase producing Enterobacteriaceae; risk factors; CTX-M; enzymes

1. Introduction

Extended-spectrum β -Lactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) is a public and veterinary health burden worldwide and particularly in West Indian ocean countries [1]. These multi-resistant bacteria have been identified as a priority in terms of epidemiological surveillance in humans and animals from the Indian Ocean Commission (IOC) state members (i.e., Comoros, Madagascar, Mauritius, Reunion and Seychelles) and Mayotte (French oversea territory) [1].

ESBL-E are resistant to almost all beta-lactam antibiotic drugs including third generation cephalosporin (3GC), co-resistance is often observed with other classes of antibiotics such as fluoroquinolones, aminoglycosides, sulfonamides and tetracyclins, leading to the use of last-resort antibiotics (i.e., carbapenems) in ESBL-E infections in humans [2].

The occurrence of ESBL-E has been identified in broiler and swine farms in Europe [3–5] and the CTX-M β -lactamases is the most frequently detected enzyme in livestock, especially *bla*_{CTX-M-1} [4].

Selection pressure exerted by antibiotic drugs on microbiota favours carriage and persistence of ESBL-E in humans (hospital and community) [6,7], livestock and pets [7–9]; thus, all could act as potential reservoirs of ESBL-E.

The main known risk factor identified in ESBL-E occurrence in livestock was “use of 3GC or fourth generation cephalosporin (4GC) (ceftiofur, cefoperazone and cefquinome) in the last 12 months” in dairy and pig farms [10,11].

Other risk factors such as storage of slurry in a pit, operating an open herd policy and infrequent cleaning of calf feeding equipment were also identified in dairy farms [4] and fish ponds presence in poultry farms of Vietnam [12].

In IOC, no estimate of ESBL-E prevalence in livestock was available. Thus, the aim of this study was first estimate the prevalence of ESBL-E on beef cattle, broiler and pig commercial farms in Reunion, Mayotte and Madagascar Islands and identify ESBL enzymes occurrence in each production type and territory. Secondly, potential risk factors of ESBL-E occurrence in poultry, beef cattle and pig farms were explored.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

Reunion and Mayotte are French overseas territories located in South Western Indian ocean. Reunion with an area of 2512 km² is home for around 850,996 people [13]. In Reunion, 156 poultry producers, 340 pig producers and 331 beef cattle producers are structured in official breeding organization and could be considered as intensive or partially free ranging [14].

Mayotte with an area of 374 km² is home for around 235,132 people [13]. One hundred fifty modern poultry producers and 3600 beef cattle farms are recorded in this territory [15]. However, twenty poultry producers and 320 beef cattle producers are structured in breeding official organizations [16].

Madagascar is the fifth largest island in the world, with a land mass of 587,000 km² and 24.24 million inhabitants in 2016 [17]. Its economy is based essentially on agriculture and tourism; producer census was not available at the Direction of Veterinary Services of the Ministry of Livestock Production [18].

2.2. Sampling

From February to August 2016, broiler, pigs and beef cattle farms were sampled in Reunion. Due to a foot-and-mouth outbreak in Mauritius Island, sampling had to be stopped in beef cattle in Reunion for sanitary reasons. Sampling was reported to August 2017 for beef cattle. In Mayotte, beef cattle and broiler were sampled from September to October 2016, no pig farms were present in this territory due to mostly Muslim community representation; thus, no sample of pigs was collected. In Madagascar, sampling was performed in November 2016. Beef cattle were sampled in Antsirabe, broiler in Mahitsy and pig farms in Imerintsiatosika, known to be key production sites. It is to be noted that broiler and beef cattle farms from Mayotte and Madagascar could also raise few hen and dairy cattle in the farm without being the main commercial activity.

In each territory, the sample size of thirty breeding farms of each livestock production sector were targeted. Samples were collected using boot swabs Sterisox[®]. Number of samples depended on the house's surface area, one Sterisox[®] covered 100 m² of building. If possible all boxes were visited and livestock gathering points (e.g., water pond, watering trough) were also sampled. Number of samples per farm varied between one and five.

All samples were immediately maintained at 4 °C before analyses proceeded within 48 h after reception (transport within the day for Reunion and within one week for Mayotte and Madagascar).

No ethical approval was needed as non-invasive sampling methods were used to identify farm ESBL-E sanitary status.

2.3. Laboratory Investigations

2.3.1. ESBL-E Phenotype

Sterisox[®] boot swabs were incubated 20 ± 4 h at room temperature with 100 mL of physiological water and 900 μ L of Brain-Heart Infusion broth (BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France). Ten μ L of the enriched suspension was directly streaked onto selective chromogenic agar plates (ChromID-ESBL, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated overnight at 37 °C under aerobic condition. Presumptive ESBL-producers were sub-cultured individually on Drigalski lactose agar and bacterial species identification performed using MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics, Breme, Germany). All Enterobacteriaceae isolates identified, one or more by positive farms, were considered ESBL-E if confirmed by the combination disc test according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines [19]. Thus, Muller Hinton agar with cefotaxime, ceftazidime, cefixime and cefepime disks with and without clavulanic acid allowed testing. The result was considered positive if the inhibition zone diameter was ≥ 5 mm larger with clavulanic acid than without for at least on cephalosporin tested.

If ESBL-E were identified, antibiograms were performed on isolates with ertapenem (ETP), nalidixic acid (NA), ofloxacin (OFL), gentamicin (GEN), Amikacin (AMK), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) and tetracycline (TCN) tested.

2.3.2. Characterization of ESBL Genes

ESBL-producing isolates were randomly selected per livestock production sector for each territory (except Reunion with 35 *E. coli* isolates). Total DNA was extracted using the NucliSens[®]Easymag[®] system (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) according to the manufacturer's instructions. Extracted eluates were stored at -80 °C. Molecular characterization was performed using Check-MDR CT103XL array test (Check-Points Health B.V., Wageningen, The Netherlands) for identification of ESBL genes (i.e., encoding BEL, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-8/25, GES-ESBL, PER, SHV-ESBL, TEM-ESBL, VEB) and discriminated ESBL and non-ESBL TEM and SHV variants. The assay consisted in a two-step amplification process of the ESBL target sequences, followed by a colorimetric microarray detection of the reaction products. Image analysis and interpretation were provided by Check-Points "5-2-2015" software (Check-Points Health B.V., Wageningen, The Netherlands).

2.4. Questionnaire

A dichotomous questionnaire to assess potential risk factors on farms was developed. Data regarding farm building, biosecurity measures, breeding practices including management of knackery, water quality, quarantine and effluent, vector control, cleaning and disinfection techniques, use of antibiotics and questions related to the breed like housing system and origins of animals were collected (See questionnaire annex). Answers were cross-checked by direct observation and corrected if necessary.

2.5. Risk Factors Analyses

A farm was considered positive if at least one boot swab was found positive for ESBL-E in bacteriological analysis. A farm was considered negative if all boot swabs samples were negative for ESBL-E.

Explanatory variables considered for analysis were categorical. If fewer than five observations recorded in a category the variable was excluded. The variable to be explained was ESBL-E occurrence in the livestock production sector in each territory. Bivariate analyses were performed using Fisher test ($p < 0.05$).

For generalized linear models (GLM), a preliminary step aimed at evaluating association between explicative variables and ESBL-E farm status with bivariate analyses in each livestock production sectors (including all three territories). Factors associated with ESBL-E positivity with a p -value < 0.20 were offered to a full model form multivariate analysis (GLM). The variable territory was not included in models as it was significantly associated with other variables. Interactions between variables were not including in the models. The preferred model was the one with the minimum Akaike information criterion (AIC). Goodness of fit test were also performed. R software (R Development Core team, 2012) was used to perform statistical analysis (<https://www.r-project.org/>).

3. Results

3.1. Prevalence Observed, Bacterial Diversity and Antibigram Results

In Reunion, high prevalences were observed in poultry (70.0% \pm 16.7%) and pig farms (53.3% \pm 18.2) (Table 1). Prevalence differed significantly between livestock production type in Reunion (p -value < 0.001) with a low prevalence observed in beef cattle farms (3.7% \pm 5.1%). In Mayotte and Madagascar, no difference in prevalence was observed between livestock type in each territory (p -value > 0.05).

Comparing prevalence among poultry production in the three territories, no difference was observed (p -value = 0.94). In pig production, the prevalence differed significantly between Madagascar and Reunion (p -value < 0.005). Finally, in beef cattle the prevalence between the three territories differed significantly (p -value < 0.001).

Table 1. Prevalence of ESBL-E in livestock production farms of Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016–2017.

Territory	N (Positive Farm)	ESBL-E Positive Farms	p -Value ⁽¹⁾	p -Value ⁽²⁾
Reunion			<0.001	
Poultry	30 (21)	70.0% [53.3–86.7]	–	0.94
Pigs	30 (16)	53.3% [35.1–71.5]	–	<0.005
Beef cattle	54 (2)	03.7% [00.0–08.8]	–	<0.001
Mayotte			0.70	
Poultry	23 (17)	73.9% [55.6–92.2]	–	–
Beef cattle	19 (13)	68.4% [47.1–89.7]	–	–
Madagascar			0.16	
Poultry	30 (21)	70.0% [53.6–86.7]	–	–
Pigs	30 (26)	86.7% [74.3–99.1]	–	–
Beef cattle	30 (20)	66.7% [49.5–83.9]	–	–

N: total livestock commercial farms sampled. ⁽¹⁾ p -value of Fisher test regarding occurrence between livestock production type in each territory. ⁽²⁾ p -value of Fisher test regarding occurrence in each livestock production type between each territory.

In Reunion, four different species were found among Enterobacteriaceae isolates with two species (*Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae complex*) in both poultry and beef cattle farms, three species in pig (*E. coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Citrobacter freundii*) (Table 2).

In Mayotte, Enterobacteriaceae diversity was reduced to *E. coli* and *E. cloacae complex* in both poultry and beef cattle production.

In Madagascar, an important diversity of species was found among Enterobacteriaceae isolates with six different species identified in all types of production. Species diversity varied according to the production type with five species identified in pig production, three in beef cattle and poultry production.

The main represented species in all territories and all types of production was *E. coli* with 89.0% ($n = 307$) of all Enterobacteriaceae isolates ($N = 345$), 95.1% ($n = 292$) out of them being ESBL producers (Table 2).

Table 2. Diversity of the ESBL-E species isolated in chromogenic agar from livestock production farms of Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016–2017.

Bacterial Species	Reunion						Mayotte						Madagascar					
	Poultry		Pig		Cattle		Poultry		Cattle		Poultry		Pig		Cattle			
	N (% ESBL-E)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	
<i>Citrobacter freundii</i>	6 (100.0%)	-	-	2	2 (100.0%)	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4 (100.0%)	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	307 (95.1%)	145	136 (93.8%)	45	40 (88.9%)	2	2 (100.0)	19	19 (100.0%)	17	17 (100.0%)	28	28 (100.0%)	29	28 (96.6%)	22	22 (100.0%)	
<i>Escherichia hermannii</i>	2 (100.0%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2 (100.0%)	
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	13 (92.3%)	1	1 (100.0%)	-	-	1	0 (00.0%)	1	1 (100.0%)	1	1 (100.0%)	1	1 (100.0%)	6	6 (100.0%)	2	2 (100.0%)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11 (100.0%)	-	-	2	2 (100.0%)	-	-	-	-	-	-	2	2 (100.0%)	7	7 (100.0%)	-	-	
<i>Morganella morganii</i>	2 (100.0%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2 (100.0%)	-	-	

Table 3. Antibiogram results of ESBL-E from livestock production farms of Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016–2017.

	ETP			NA			OFL			GEN			AMK			SXT			TCN			ND
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
Reunion																						
Broiler																						
<i>E. coli</i> (N = 136)	136 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	102 (75.0%)	5 (03.7%)	29 (21.3%)	131 (96.3%)	2 (01.5%)	3 (02.2%)	128 (94.1%)	0 (00.0%)	8 (05.9%)	134 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	34 (25.0%)	0 (00.0%)	102 (75.0%)	33 (24.3%)	0 (00.0%)	65 (47.8%)	38 (27.9%)
<i>E. cloacae</i> (N = 1)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	
Pig																						
<i>E. coli</i> (N = 40)	39 (97.5%)	1 (02.5%)	0 (00.0%)	29 (72.5%)	1 (02.5%)	10 (25.0%)	30 (75.0%)	0 (00.0%)	10 (25.0%)	35 (87.5%)	0 (00.0%)	5 (12.5%)	40 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	5 (12.5%)	0 (00.0%)	35 (87.5%)	5 (12.5%)	1 (02.5%)	23 (57.5%)	11 (27.5%)
<i>C. freundii</i> (N = 2)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	
<i>K. pneumoniae</i> (N = 2)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	2 (100.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	
Beef cattle																						
<i>E. coli</i> (N = 2)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)
Mayotte																						
Broiler																						
<i>E. coli</i> (N = 19)	19 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	14 (73.7%)	4 (21.1%)	1 (05.3%)	19 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	18 (94.7%)	0 (00.0%)	1 (05.3%)	19 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	14 (73.7%)	0 (00.0%)	5 (26.3%)	3 (15.8%)	0 (00.0%)	16 (84.2%)	
<i>E. cloacae</i> (N = 1)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	
Beef cattle																						
<i>E. coli</i> (N = 16) *	16 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	7 (43.8%)	5 (31.3%)	4 (25.0%)	14 (87.5%)	2 (12.5%)	0 (00.0%)	12 (75.0%)	0 (00.0%)	4 (25.0%)	16 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	15 (93.8%)	0 (00.0%)	1 (06.3%)	12 (75.0%)	0 (00.0%)	4 (25.0%)	
<i>E. cloacae</i> (N = 1)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	

Table 3. Cont.

	ETP			NA			OFL			GEN			AMK			SXT			TCN			ND
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
Madagascar																						
Broiler																						
<i>E. coli</i>	28	0	0	13	7	8	22	3	3	27	0	1	28	0	0	27	0	1	1	1	26	
(N = 28)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(46.4%)	(25.0%)	(28.6%)	(78.6%)	(10.7%)	(10.7%)	(96.4%)	(00.0%)	(03.6%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(96.4%)	(00.0%)	(03.6%)	(03.6%)	(03.6%)	(92.9%)	
<i>E. cloacae</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	
(N = 1)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	
<i>K. pneumoniae</i>	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	1	
(N = 2)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	
Pig																						
<i>E. coli</i>	28	0	0	13	8	7	20	2	6	28	0	0	28	0	0	28	0	0	7	0	21	
(N = 28)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(46.4%)	(28.6%)	(25.0%)	(71.4%)	(07.1%)	(21.4%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(25.0%)	(00.0%)	(75.0%)	
<i>E. cloacae</i>	6	0	0	2	2	2	6	0	0	4	0	2	6	0	0	4	0	2	0	0	6	
(N = 6)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(33.3%)	(33.3%)	(33.3%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(66.7%)	(00.0%)	(33.3%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(66.7%)	(00.0%)	(33.3%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	
<i>C. freundii</i>	4	0	0	0	0	4	0	0	4	1	0	3	4	0	0	1	0	3	0	0	4	
(N = 4)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(25.0%)	(00.0%)	(75.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(25.0%)	(00.0%)	(75.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	
<i>M. organii</i>	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	6	
(N = 6)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	
<i>K. pneumoniae</i>	7	0	0	0	3	4	5	0	2	0	0	7	7	0	0	0	0	7	0	0	7	
(N = 7)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(42.9%)	(57.1%)	(71.4%)	(00.0%)	(28.6%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	
Beef cattle																						
<i>E. coli</i>	22	0	0	15	3	4	18	3	1	21	0	1	22	0	0	21	0	1	11	0	11	
(N = 22)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(68.2%)	(13.6%)	(18.2%)	(81.8%)	(13.6%)	(04.5%)	(95.5%)	(00.0%)	(04.5%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(95.5%)	(00.0%)	(04.5%)	(50.0%)	(00.0%)	(50.0%)	
<i>E. cloacae</i>	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	2	
(N = 2)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	
<i>E. hermannii</i>	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	2	
(N = 2)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(00.0%)	(100.0%)	

ETP: ertapenem; NA: nalidixic acid; OFL: Ofloxacin; GEN: gentamicin; AMK: amikacin; SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole; TCN: tetracyclin * One ESBL producing *E. coli* was lost at the laboratory. Antibiograms was performed on 16 of the 17 ESBL-E.

No phenotypic resistance to ertapenem (ETP) was identified in ESBL-E isolates (Table 3). Resistance to nalidixic acid (NA) was high in ESBL producing *E. coli* in beef cattle from Reunion (50.0%) and in Madagascar both in poultry (28.6%) and pig (25.0%) farms. Resistance to ofloxacin (OFX) was high in ESBL producing *E. coli* in pig production both in Madagascar (21.4%) and Reunion (25.0%). Resistance to gentamicin (GEN) was elevated in ESBL producing *K. pneumoniae* in Madagascar. No resistant profile to amikacin (AKN) was identified in all territories. In ESBL producing *E. coli* trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) resistance was high in Reunion both in poultry and pig production (75.0% and 87.5% respectively). ESBL producing *E. coli* most resistant profiles to tetracycline (TE) were observed in Madagascar (i.e., 92.9% in broiler, 75.0% in pigs and 50.0% in beef cattle).

3.2. ESBL Identification

ESBL-producing isolates were randomly selected per livestock production sector for each territory, except for Poultry in Reunion. The most common ESBL gene identified in all territories and production type was *bla*_{CTX-M-1} which accounted for 53.7% (n = 49) of all *E. coli* isolates tested (N = 95), followed by *bla*_{CTX-M-15} (29.5%, n = 28) (Table 4). The higher diversity in ESBL gene was found in poultry production from all territories.

Table 4. ESBL genes identified in a subset of *E. coli* isolated from poultry, pig and beef cattle production farms in Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016–2017.

Territory/ Production Type	<i>E. coli</i> Tested	ESBL Genes Identified (%)							
		ND	CTX-M-1 Group				CTX-M-9 Group	SHV	TEM
Enzymes			CTX-M-1	CTX-M-3	CTX-M-15	CTX-M-32			
Reunion									
Poultry	35	3	29 (90.6%)	-	-	-	-	1 (3.1%)	2 (6.3%)
Pigs	10	-	7 (70.0%)	1 (10.0%)	2 (20.0%)	-	-	-	-
Beef cattle	2	-	2 (100.0%)	-	-	-	-	-	-
Mayotte									
Poultry	10	1	7 (77.8%)	1 (11.1%)	1 (11.1%)	-	-	-	-
Beef cattle	10	3	1 (14.3%)	-	5 (71.4%)	1 (14.3%)	-	-	-
Madagascar									
Poultry	10	-	5 (50.0%)	-	2 (20.0%)	-	-	-	-
Pigs	9*	-	-	-	9 (100.0%)	-	-	-	-
Beef cattle	9*	-	-	-	9 (100.0%)	-	-	-	-
TOTAL	95 (100.0%)	7 (7.4%)	51 (53.7%)	2 (2.1%)	28 (29.5%)	1 (1.1%)	3 (3.2%)	1 (1.1%)	2 (2.1%)

* Reunion and Madagascar only, (a) Intercept = 0.01376, null deviance: 99.832, model *d.f.* = 4; (b) Intercept = -2.7919, null deviance: 73.304, model *d.f.* = 3; (c) Intercept = 0.9959, null deviance: 132.027, model *d.f.* = 5.

3.3. Explanatory Factors of ESBL-E Occurrence in Livestock Sectors Production in Reunion, Madagascar and Mayotte, 2016–2017

Univariate Odds Ratios (ORs) for the occurrence of ESBL-E in each livestock production sectors and territory are presented in (Table 5). Premises building constructed after 1999 were associated with an increased probability of ESBL-E occurrence in broiler production in Reunion. In pig production, changing shoes/boots before entering the building was associated with an increase of ESBL-E occurrence whereas rodent control by a company and two disinfections between two consecutive batches of fattening pigs were associated with a decreased probability of ESBL-E occurrence.

In Madagascar, absence of chick introduction in the farm (self-production) in broiler farms was associated with decreased ESBL-E occurrence. Clearing space around the farm was associated with a decreased probability of ESBL-E occurrence in beef cattle production.

Generalized linear models explaining ESBL-E occurrence (all territories included) varied between livestock production (Table 6). In broiler, “water quality control” was identified was associated with

decreased of ESBL-E occurrence (OR: 0.12); the best model selected the variables “distance to another farm”, “foot bath at entrance”, “water quality” and “water storage tank” (AIC: 93.98).

In pig production, “other farmers visiting the farm”, “soak the floor”, “detergent use for cleaning” and “antibiotic use recently” were identified in the best model (AIC: 65.09).

For beef cattle, the best model kept “livestock size”, “antibiotic use”, “disinfestation”, “clearing space around the building”, “pet presence” and “water storage tank” (AIC: 83.53).

Table 5. Bivariate explanatory factors of ESBL-E occurrence in livestock from Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016–2017.

Country	Livestock	Variable	OR, IC95%	p-Value
Reunion	Broiler	Premises building constructed > 1999	12.72 [1.25–671.77]	0.01
		Change clothes before entering house/pen	6.52 [0.92–80.50]	0.05
	Pigs	Change shoes/boots before entering house/pen	13.62 [1.35–716.37]	0.01
		Rodent control by a company	0.11 [0.01–0.75]	0.01
		Lightning in the building	0.18 [0.01–2.13]	0.04
		Two disinfections between two consecutive batches	0 [0–0.92]	0.04
Beef cattle cows	–	–	–	
Madagascar	Broiler	Chicks produced in the farm	0 [0.00–0.91]	0.02
	Pigs	Use of antibiotic for prophylaxis	0.09 [0.00–1.36]	0.05
	Beef cattle	Clearing space around the building	0 [0.00–0.94]	0.03
		Clean condition around the farm	0 [0–1.94]	0.003
Mayotte	Broiler	Distance from another poultry farm (>500 m)	13.39 [0.79–883.37]	0.04
	Beef cattle	–	–	–

Table 6. Best model explaining ESBL-E occurrence in poultry, pig and cow production (including all territories), 2016–2017.

Dependent Variables	Independent Variables	Adj. OR (CI95%)	p-Value	AIC
Broiler occurrence (a)	Distance elev oth species >500 m	3.18 (0.65–15.56)	0.15	93.68
	Distance elev oth species <500 m	0.99 (0.26–4.39)	0.99	
	Foot bath at room entrance	5.89 (0.61–57.17)	0.13	
	Water quality control	0.12 (0.02–0.82)	0.03	
	Water storage tank	2.58 (0.85–7.79)	0.09	
Pig occurrence * (b)	Farmers visits	14.15 (1.17–171.35)	0.04	65.09
	Soak the floor	22.34 (1.51–330.98)	0.02	
	Detergent use for cleaning	0.12 (0.02–0.75)	0.02	
	Antibiotic use recently (<1 year)	8.82 (1.09–71.4)	0.04	
Beef cattle occurrence (c)	Livestock size > 25	0.07 (0.02–0.28)	<0.001	83.53
	Antibiotic drug use recently (<1 year)	3.94 (1.04–14.98)	0.04	
	Disinfestation	0.19 (0.04–0.91)	0.04	
	Clearing space around the building	0.22 (0.04–1.29)	0.09	
	Water storage tank	0.38 (0.11–1.35)	0.14	
	Pet presence	6.87 (1.13–41.67)	0.04	

* Reunion and Madagascar only, (a) Intercept = 0.01376, null deviance: 99.832, model *d.f.* = 4; (b) Intercept = –2.7919, null deviance: 73.304, model *d.f.* = 3; (c) Intercept = 0.9959, null deviance: 132.027, model *d.f.* = 5.

4. Discussion

Our study pointed out high ESBL-E prevalence in Madagascar, Reunion and Mayotte livestock commercial farms. Overall ESBL genes diversity in *E. coli* was reduced with *bla*_{CTX-M-1} mainly identified. In Madagascar, all genes identified in pig and beef cattle were *bla*_{CTX-M-15}, main enzyme observed in humans [20,21]. It could confirm circulation of ESBL-E between human and livestock. Concrete factors associated with an increased risk of ESBL-E occurrence in farms were identified such as pet presence, farmer visits and recent antibiotic use. Finally, biosecurity and hygienic measures (e.g., disinfection, water quality control, detergent use) were globally reducing ESBL-E occurrence in IOC farms.

Our study clearly pointed a high ESBL-E prevalence in Madagascar, Reunion (except beef cattle) and Mayotte. Prevalence estimate was not accurate as obtained with a limited sample size; Madagascar ESBL-E prevalence calculated could neither estimate the overall prevalence in this large territory nor be the reflect of livestock farms diversity. If ESBL characterization allowed, for the first time, to identify a circulation of *bla*_{CTX-M-1} in all livestock types, the limited number of ESBL found in each livestock and IO territory (N = 10) cannot rule out patterns. Less diversity was expected by livestock type (e.g., in poultry in each territory, pigs from Reunion and beef cattle from Mayotte) and could highlight needs of further enzyme identification as diversity could not be captured as a whole.

No phenotypic resistance to ertapenem in ESBL-E isolates was identified, which is in accordance with the absence of carbapenemase producing Enterobacteriaceae (CPE) detection in IO livestock in 2018 [1]. However, use of CPE selective media would be more suitable for CPE detection. Resistance to fluoroquinolone could be low in Mayotte as no resistance to ofloxacin was observed but should be confirmed as few isolates were tested. Hypothesis about risk factors identification in our study was opportunistic and case control or cohort study designs to rule out ESBL-E control measures would be needed. Furthermore, antibiotic drug use recently was identified as increasing ESBL-E occurrence in IO farms but the farmers were not able to tell which antibiotic drug was used. Further studies should be undertaken to evaluate antibiotic drugs consumption and practices in IO farms.

In broiler production, the estimated prevalence in IO territories was higher than 50.0% reported in 2012 in Germany [22] but similar to 70.0% reported in Japan in 2007 [23]. In India, in 2014, among 87.0% of ESBL-E were detected in broiler and 42.0% in layer farms [24]. In pig farms, the prevalence in IO was higher than 8.3% reported in pigs in Japan in 2007 [23]. For Madagascar, it was similar to the 88.2% of ESBL-E positive farms observed in 2012 in Germany [22]. ESBL-E occurrence of Mayotte and Madagascar beef cattle farms were similar to data reported from other studies in Germany with 73.3% of farms tested positive in 2011 to 2012 (Bavaria) [25] and 54.4% in 2012 in Mecklenburg-Vorpommern [22]. In Reunion, the prevalence of ESBL-E in beef cattle farms tends to be significantly lower than in other territories. It could reflect the effectiveness of the French governmental antibiotic reduction plan (Ecoantibio) in Reunion and better biosecurity. Mayotte is a French oversea territory, breeding practices are clearly different from Reunion with mixed livestock farms and could explain observed differences.

Finally, the high ESBL-E prevalence observed in IO territories could point to important antibiotic drug use and/or misuse, including cephalosporins. This is particularly true for pigs in Madagascar where high antibiotic residues were reported in pork products at abattoirs [26].

Main ESBL-E co-resistance were observed in Madagascar (i.e., ofloxacin, tetracyclin, nalidixic acid and gentamicin) and Reunion (i.e., ofloxacin, nalidixic acid and trimethoprim/sulfamethoxazole). High ESBL-E co-resistance observed in Madagascar could point out a drug overuse, particularly for widely available oral agents [1]. Nalidixic acid resistant isolates were resistant to ofloxacin in Reunion and Madagascar pig productions as observed in majority of cases [27]. Fluoroquinolone resistance was high in ESBL producing *E. coli* in pig production of both territories which could indicate past or present use/misuse of this critically important antimicrobial drug. Pig production was identified as the most important antibiotic consumer worldwide [28]. French national data indicated that fluoroquinolones use was higher in cattle production than in pig and poultry production [29]; trends, not estimated in IO French overseas territories, could differ from mainland France.

The most common ESBL gene identified in *E. coli* isolates tested was *bla*_{CTX-M-1} (54.4%) as observed in food-producing animals in European countries [30]. CTX-M β -lactamase is largely located on plasmids, which allows the horizontal transfer between Enterobacteriaceae [31] and explains the current epidemic spread of this enzyme worldwide.

Overall ESBL gene diversity was reduced in our study with circulation of few genes by production type (e.g., *bla*_{CTX-M-1} in pig and poultry from Reunion and *bla*_{CTX-M-15} in pigs and beef cattle in Madagascar). It probably indicated a common past source of contamination with introduction of ESBL-E carriers and diffusion due to close contact in livestock as reported with *bla*_{CTX-M-14} in cattle from the United Kingdom [10]. Thus, overall introduction/exchanges of ESBL-E between reservoirs

and environment seems limited as observed by Dorado-Garcia in the Netherlands (2005–2015) [32]. A more diverse ESBL genes pool was identified in IO poultry production with at least three different genes detected in each territory. Most of ESBL genes were *bla*_{CTX-M-1} but SHV-ESBL and TEM-ESBL genes were also identified as in Dutch broilers [33]. This diversity of ESBL genes in poultry could be related to close contact with poultry house surrounding environment. Interestingly, *bla*_{CTX-M-15} was observed in pig production, beef cattle and poultry from Mayotte and Madagascar; It is the main enzyme observed in humans in IO [1,20,21] and circulation of ESBL-E between human and livestock could be suspected.

In broiler farms, “Premises building constructed after 1999” and “change of shoes/boots before entering the building” were significantly increasing ESBL-E occurrence in Reunion. Both factors were difficult to explain as related to improved biosecurity measures. Antibiotic drug use could be higher in modern farms and “change of shoes/boots” was identified also as a risk factor ESBL-E occurrence in Vietnam poultry production [12] confirming that further investigations are needed to identify a potential confounding explanatory factor. In Madagascar, “chick production in the farm” significantly reduced occurrence of ESBL-E. This is in accordance with a vertical ESBL-E transmission into the production chain through external introduction such as imported day-old grandparent chickens as in Dutch poultry farms [34]. In all IO territories, “water quality control” was a protective factor of ESBL-E occurrence in commercial farms. It was in accordance with studies on *Campylobacter* spp. that showed that electrolyzed water or chlorinated-water allowed reducing bacterial presence [35,36]. Rural surface water may become a large reservoir of antibiotic residues and resistant bacteria [37], thus, in order to minimize transmission of enteropathogens, drinking water should be of potable quality to ensure freedom from enteric pathogens [37].

In pig farms, both “rodent control” and “two disinfections between two consecutive batches” were significantly reducing ESBL-E occurrence in Reunion. Both measures are related to biosecurity and hygiene helping to control disease and antibiotic resistance spread. In all IO territories, “recent antibiotic use”, “soak the floor” and “farmer visits” were associated with an increase of ESBL-E occurrence in pig production whereas “detergent use for cleaning” was associated with a decreased occurrence. ESBL-E occurrence could be more determined by the presence or absence of cephalosporin use at the farm as in Dutch pig production [38]. “Others farmer visits” has never been identified as increasing ESBL-E occurrence and could be more related to the frequency of visits as observed with the veterinarian in cattle farms in Israel [39]. Visitors could contribute to ESBL-E introduction and could carry/share material that favours transmission pathways. Detergent use for cleaning was associated with a decreased ESBL-E occurrence in IO pig production. Using effective detergent for cleaning was identified to decrease the risk of batch infection by Enterobacteriaceae such as *Salmonella* sp. [40]. However, “soak floor” practice in IO pig farm production could be explained by wrong biosecurity practices; for instance, let water for a too short period could not allow complete cleaning. For instance, a period of one-hour soak time may could be insufficient to demonstrate a significant difference in organic matter removal in pig pens [41]. Thus, cleaning and disinfection processes are a cornerstone in ESBL-E eradication which was obtained in pig farms under specific disinfection procedures [42].

In beef cattle production, “clearing space around the building” and “clean condition around the farm” reduced significantly ESBL-E occurrence in Madagascar. This explanatory variable could be related to a confounding factor; garbage presence in the farm probably attracting potential ESBL-E reservoirs such as dogs, cats or rodents. Accordingly, pet presence in the farm was identified as increasing ESBL-E occurrence in IO beef cattle farms. This finding was in accordance with Santman-Berends et al. 2017 [43] which found cat presence as an explanatory factor of ESBL-E occurrence in organic herds in the Netherlands in 2011. It could be due to the fact that pets could be both given antibiotic drugs by owners and/or play a role of reservoir/vector of ESBL-E from the close environment. Furthermore, “recent antibiotic use” was associated with an increased ESBL-E occurrence in beef cattle farms. However, 3rd or 4th generation cephalosporin use in IO beef cattle

farm was not studied while use was estimated to increase by nearly 4 times ESBL producing *E. coli* in dairy farms if used in the last 12 months [10].

Factors associated with a decrease of ESBL-E occurrence in IO beef cattle farms were “livestock size” and “disinfection”. IO big farms, herd size (>25 cattle), could apply stricter biosecurity measures. However, Adler et al. (2017) reported that an increased density was associated with more ESBL-E carriage in Israeli cattle farms [39]. As discussed before, cleaning and disinfection seems to be cornerstones in ESBL-E management and hygiene paucity was identified as a risk factors of ESBL-E occurrence on dairy farms (e.g., storage of slurry in a pit, infrequent cleaning of feeding equipment) [10].

In IO ESBL-E occurrence in 2016–2017 was high probably pointing out antibiotic drug overuses and/or misuses and particularly cephalosporins. The situation could be reversible if better practices were implemented regarding antibiotic use. For instance, in the Netherlands in 2010–2011, 20% of prevalence was observed if no cephalosporin was used (3CG and 4CG) within the preceding year in pig farms and 79% if those antibiotics were used [11].

*Bla*_{CTX-M-15} gene, mainly identified in humans both in hospital and community, was observed in IO livestock and particularly Madagascar Further investigations, including complete genome sequencing, are needed to evaluate the hypothesis of ESBL-E transmission and diffusion between reservoirs in this territory. Finally, interesting factors related to biosecurity and hygiene measures in commercial farms were identified (e.g., controlled water, disinfection, rodent control) to control ESBL-E occurrence.

5. Conclusions

Finally, this study in IOC commercial farms pointed out high ESBL-E prevalences in livestock, except beef cattle in Reunion. It highlighted probable antibiotic overuse/misuse in farms contributing in ESBL-E selection. It confirmed the need to evaluate consumption and use of antibiotic drugs in IOC territories. Concrete protective and risk factors of ESBL-E occurrence (e.g., pet presence, detergent use for cleaning) were identified, even if further investigations are needed to reinforce these results. This study is the first to explore the situation of antibiotic drug resistance in farm animals and explore potential tools for management of ESBL-E in IO farms. As a whole, it confirms the need for improving in biosecurity and hygienic measures as efficient means to reduce antibiotic resistance in livestock. Finally, it provides interesting hypotheses to explore about ESBL-E transmission between food-producing animals and humans in Madagascar and developing countries.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2306-7381/5/1/22/s1>, Table S1: Questionnaire.

Acknowledgments: French Regional Health Agency and the European Regional Development Fund “Traquer les Risques Sanitaires dans l’Océan Indien avec une approche One Health” funded this research project. Florence Naze, Marie-Gladys Robert and Anais Etheve for support regarding laboratory experiments; Catherine Cêtre-Sossah and Johny Hoarau for sampling.

Author Contributions: Eric Cardinale and Olivier Belmonte conceived and designed the experiments; Morgane Laval, Mael Jego collected samples in the field; Alexandre Leclaire, Julien Jaubert, Guillaume Miltgen, Stéphane Ramin performed the laboratory experiments; Noellie Gay analysed the data and provided analysis tools; Noellie Gay wrote the paper.” Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gay, N.; Belmonte, O.; Collard, J.M.; Halifa, M.; Issack, M.I.; Mindjae, S.; Palmyre, P.; Ibrahim, A.A.; Rasamoelina, H.; Flachet, L.; et al. Review of Antibiotic Resistance in the Indian Ocean Commission: A Human and Animal Health Issue. *Front. Public Health* **2017**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Blaak, H.; van Hoek, A.H.; Hamidjaja, R.A.; van der Plaats, R.Q.; Kerkhof-de Heer, L.; de Roda Husman, A.M.; Schets, F.M. Distribution, Numbers and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment. *PLoS ONE* **2015**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Mesa, R.J.; Blanc, V.; Blanch, A.R.; Cortes, P.; Gonzalez, J.J.; Lavilla, S.; Miro, E.; Muniesa, M.; Saco, M.; Tortola, M.T.; et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 211–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ewers, C.; Bethe, A.; Semmler, T.; Guenther, S.; Wieler, L.H. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals and their putative impact on public health: A global perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 646–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Leverstein-van Hall, M.A.; Dierikx, C.M.; Cohen Stuart, J.; Voets, G.M.; van den Munckhof, M.P.; van Essen-Zandbergen, A.; Platteel, T.; Fluit, A.C.; van de Sande-Bruinsma, N.; Scharinga, J.; et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 873–880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Van Duijkeren, E.; Wielders, C.C.H.; Dierikx, C.M.; van Hoek, A.; Hengeveld, P.; Veenman, C.; Florijn, A.; Lotterman, A.; Smit, L.A.M.; van Dissel, J.T.; et al. Long-term carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the general population in the Netherlands. *Clin. Infect. Dis.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Grall, N.; Lazarevic, V.; Gaia, N.; Couffignal, C.; Laouenan, C.; Ilic-Habensus, E.; Wieder, I.; Plesiat, P.; Angebault, C.; Bougnoux, M.E.; et al. Unexpected persistence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the faecal microbiota of hospitalised patients treated with imipenem. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *50*, 81–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Dierikx, C.M.; van Duijkeren, E.; Schoormans, A.H.; van Essen-Zandbergen, A.; Veldman, K.; Kant, A.; Huijsden, X.W.; van der Zwaluw, K.; Wagenaar, J.A.; Mevius, D.J. Occurrence and characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 1368–1374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Cortes, P.; Blanc, V.; Mora, A.; Dahbi, G.; Blanco, J.E.; Blanco, M.; Lopez, C.; Andreu, A.; Navarro, F.; Alonso, M.P.; et al. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2799–2805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Snow, L.C.; Warner, R.G.; Cheney, T.; Wearing, H.; Stokes, M.; Harris, K.; Teale, C.J.; Coldham, N.G. Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales. *Prev. Vet. Med.* **2012**, *106*, 225–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hammerum, A.M.; Larsen, J.; Andersen, V.D.; Lester, C.H.; Skovgaard Skytte, T.S.; Hansen, F.; Olsen, S.S.; Mordhorst, H.; Skov, R.L.; Aarestrup, F.M.; et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 2650–2657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Nguyen, V.T.; Carrique-Mas, J.J.; Ngo, T.H.; Ho, H.M.; Ha, T.T.; Campbell, J.I.; Nguyen, T.N.; Hoang, N.N.; Pham, V.M.; Wagenaar, J.A.; et al. Prevalence and risk factors for carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* on household and small-scale chicken farms in the Mekong Delta of Vietnam. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 2144–2152. [[PubMed](#)]
13. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (Insee). *Estimates of the Total Population as of 1 January 2015*; INSEE: Paris, France, 2016. Available online: http://www.insee.fr/themes/detail.asp?ref_id=estim-pop®_id=99 (accessed on 23 February 2018).
14. Cardinale, E. (Animals, Health, Territories, Risks and Ecosystems, Avenue Agropolis, Montpellier, France). Personal communication, 2017.
15. Direction Générale de l’Alimentation. *Mayotte: Synthèse Illustrée du Recensement Agricole 2010*; Agreste: Paris, France, 2011. Available online: http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf_D97611A07.pdf (accessed on 23 February 2018).
16. Merot, P. (French National Institute for Agricultural Research, Paris, France). Personal communication, 2017.
17. The World Bank Group. *Countries: Madagascar*; The World Bank Group: Washington, DC, USA, 2016. Available online: www.worldbank.org/en/country/madagascar (accessed on 23 February 2018).
18. Rakotoharnome, M. (Ministère de l’Elevage, Antananarivo, Madagascar). Personal communication, 2017.

19. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Société Française de Microbiologie; Société Française de Microbiologie*: Paris, France, 2015. Available online: <http://www.sfm-microbiologie.org> (accessed on 23 February 2018).
20. Naas, T.; Cuzon, G.; Robinson, A.L.; Andrianirina, Z.; Imbert, P.; Ratsima, E.; Ranosiarisoa, Z.N.; Nordmann, P.; Raymond, J. Neonatal infections with multidrug-resistant ESBL-producing *E. cloacae* and *K. pneumoniae* in Neonatal Units of two different Hospitals in Antananarivo, Madagascar. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Rakotonirina, H.C.; Garin, B.; Randrianirina, F.; Richard, V.; Talarmin, A.; Arlet, G. Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated in Antananarivo, Madagascar. *BMC Microbiol.* **2013**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Dahms, C.; Hubner, N.O.; Kossow, A.; Mellmann, A.; Dittmann, K.; Kramer, A. Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PLoS ONE* **2015**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hiroi, M.; Yamazaki, F.; Harada, T.; Takahashi, N.; Iida, N.; Noda, Y.; Yagi, M.; Nishio, T.; Kanda, T.; Kawamori, F.; et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J. Vet. Med. Sci.* **2012**, *74*, 189–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Brower, C.H.; Mandal, S.; Hayer, S.; Sran, M.; Zehra, A.; Patel, S.J.; Kaur, R.; Chatterjee, L.; Mishra, S.; Das, B.R.; et al. The Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Poultry Chickens and Variation According to Farming Practices in Punjab, India. *Environ. Health Perspect.* **2017**, *125*. [[CrossRef](#)]
25. Schmid, A.; Hormansdorfer, S.; Messelhauser, U.; Kasbohrer, A.; Sauter-Louis, C.; Mansfeld, R. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 3027–3032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rakotoharinome, M.; Pognon, D.; Randriamparany, T.; Ming, J.C.; Idoumbin, J.P.; Cardinale, E.; Porphyre, V. Prevalence of antimicrobial residues in pork meat in Madagascar. *Trop. Anim. Health Prod.* **2014**, *46*, 49–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Pereira, R.V.; Siler, J.D.; Ng, J.C.; Davis, M.A.; Grohn, Y.T.; Warnick, L.D. Effect of on-farm use of antimicrobial drugs on resistance in fecal *Escherichia coli* of preweaned dairy calves. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 7644–7654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Van Boeckel, T.P.; Brower, C.; Gilbert, M.; Grenfell, B.T.; Levin, S.A.; Robinson, T.P.; Teillant, A.; Laxminarayan, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 5649–5654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Agence Nationale de la Sécurité de L'alimentation, de L'environnement et du Travail (ANSES). *Suivi des Ventes de Médicaments Vétérinaires Contenant des Antibiotiques en France en 2015, Anses Rapport Annuel*; ANSES: Paris, France, 2016. Available online: <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2015.pdf> (accessed on 23 February 2018).
30. Coque, T.M.; Baquero, F.; Canton, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eur. Surveill.* **2008**, *13*, 19051.
31. Rodriguez, I.; Thomas, K.; Van Essen, A.; Schink, A.K.; Day, M.; Chattaway, M.; Wu, G.; Mevius, D.; Helmuth, R.; Guerra, B.; et al. Chromosomal location of blaCTX-M genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, The Netherlands and the UK. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, *43*, 553–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Dorado-Garcia, A.; Smid, J.H.; van Pelt, W.; Bonten, M.J.M.; Fluit, A.C.; van den Bunt, G.; Wagenaar, J.A.; Hordijk, J.; Dierikx, C.M.; Veldman, K.T.; et al. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: A pooled analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *73*, 339–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Huijbers, P.M.; Graat, E.A.; Haenen, A.P.; van Santen, M.G.; van Essen-Zandbergen, A.; Mevius, D.J.; et al. Extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: Prevalence, risk factors and molecular characteristics. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 2669–2675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Dierikx, C.; van Essen-Zandbergen, A.; Veldman, K.; Smith, H.; Mevius, D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet. Microbiol.* **2010**, *145*, 273–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Park, H.; Hung, Y.C.; Brackett, R.E. Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *72*, 77–83. [[CrossRef](#)]
36. Mead, G.C.; Hudson, W.R.; Hinton, M.H. Effect of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with campylobacter. *Epidemiol. Infect.* **1995**, *115*, 495–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Zhang, X.; Li, Y.; Liu, B.; Wang, J.; Feng, C.; Gao, M.; Wang, L. Prevalence of veterinary antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the surface water of a livestock production region in northern China. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dohmen, W.; Dorado-Garcia, A.; Bonten, M.J.; Wagenaar, J.A.; Mevius, D.; Heederik, D.J. Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PLoS ONE* **2017**, *12*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Adler, A.; Sturlesi, N.; Fallach, N.; Zilberman-Barzilai, D.; Hussein, O.; Blum, S.E.; Klement, E.; Schwaber, M.J.; Carmeli, Y. Prevalence, Risk Factors and Transmission Dynamics of Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: A National Survey of Cattle Farms in Israel in 2013. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 3515–3521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Martelli, F.; Lambert, M.; Butt, P.; Cheney, T.; Tatone, F.A.; Callaby, R.; Rabie, A.; Gosling, R.J.; Fordon, S.; Corcker, G.; et al. Evaluation of an enhanced cleaning and disinfection protocol in salmonella contaminated pig holdings in the United Kingdom. *PLoS ONE* **2017**, *12*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Hancox, L.R.; Le Bon, M.; Dodd, C.E.; Mellits, K.H. Inclusion of detergent in a cleaning regime and effect on microbial load in livestock housing. *Vet. Rec.* **2013**, *173*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Schmithausen, R.M.; Kellner, S.R.; Schulze-Geisthoevel, S.V.; Hack, S.; Engelhart, S.; Bodenstein, I.; Al-Sabti, N.; Reif, M.; Fimmers, R.; Korber-Irrgang, B.; et al. Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and of Enterobacteriaceae expressing extended-spectrum beta-lactamases on a model pig farm. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 7633–7643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Santman-Berends, I.M.; Gonggrijp, M.A.; Hage, J.J.; Heuvelink, A.E.; Velthuis, A.; Lam, T.J.; van Schaik, G. Prevalence and risk factors for extended-spectrum beta-lactamase or AmpC-producing *Escherichia coli* in organic dairy herds in The Netherlands. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 562–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Stuart B. Levy. The antibiotic paradox. How the misuse of antibiotics destroy their curative powers. 2nd edition. Broché. 1982.
2. Dyar OJ, Huttner B, Schouten J, Pulcini C, ESGAP (ESCMID Study Group for Antimicrobial stewardship). What is antimicrobial stewardship? Clin Microbiol Infect. 2017 Nov;23(11):793–8.
3. INSTRUCTION N° DGS/Mission antibiorésistance/DGOS/PF2/DGCS/SPA/2020/79 du 15 mai 2020 relative à la mise en œuvre de la prévention de l'antibiorésistance sous la responsabilité des agences régionales de santé. Ministère des solidarités et de la Santé. 2020. https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/instruction_du_15_mai_2020_.pdf
4. Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2021 Jan;19(1):37–54.
5. Daniau Côme, Léon Lucie, Berger-Carbonne Anne. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017. Santé Publique France. 2019 Sep 13. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/infections-associees-aux-soins/documents/enquetes-etudes/enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-mai-juin-2017>
6. Organization WH. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Geneva: World Health Organization; 2014. 232 p.
7. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. Pathog Glob Health. 2015 Oct;109(7):309–18.
8. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016 https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf
9. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, *et al*. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. Lancet Infect Dis. 2019;19(1):56–66.
10. Colomb-Cotinat M, Lacoste J, Brun-Buisson C, Jarlier V, Coignard B, Vaux S. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. Antimicrob Resist Infect Control. 2016;5:56.
11. Feuille de route de maîtrise de l'antibiorésistance. Ministère des solidarités et de la santé. 2016. https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/synthese_feuille_de_route_gouvernementale_antibioresistance_17112016.pdf
12. Jouvin-Marche E, Carrara G, Pulcini C, Andremont A, Danan C, Couderc-Obert C, *et al*. French research strategy to tackle antimicrobial resistance. Lancet Lond Engl. 2020 Apr 18;395(10232):1239–41.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

13. Appel à Projet : 'Antibiorésistance : comprendre, innover, agir'. Ministère des solidarités et de la santé ; 2020. <https://anr.fr/fileadmin/aap/2020/ia-ami-amr-2020.pdf>
14. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, *et al.* A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 1991 May 15;276 (Pt 1):269–70.
15. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):969–76.
16. 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.
17. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):161–82, Table of Contents.
18. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection.* 1989 Oct;17(5):316–21.
19. Mack AR, Barnes MD, Taracila MA, Hujer AM, Hujer KM, Cabot G, *et al.* A Standard Numbering Scheme for Class C β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Feb 21;64(3).
20. Rapport d'activité 2018. Centre National de la Résistance aux Antibiotiques. Laboratoire coordonnateur '*Pseudomonas* et *Acinetobacter*' de Besançon. 2018. https://maquette.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_CNR_2018v1.pdf
21. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandation 2020. Version 1.2 Octobre 2020. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/10/CASFM2020_Octobre2020_V1.2.pdf
22. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 1983 Dec;11(6):315–7.
23. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Oct;18(4):657–86.
24. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct;14(4):933–51.
25. Cattoir V. Les nouvelles Bêta-Lactamases à Spectre Étendu (BLSE). MAPAR 2008. Pathologie infectieuse en réanimation. 2008. <https://www.mapar.org/article/1/Communication%20MAPAR/qm6segij/Les%20nouvelles%20b%C3%AAta-lactamases%20%C3%A0%20spectre%20%C3%A9tendu%20%28BLSE%29.pdf>
26. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol.* 2012 Jul;12(5):883–93.
27. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 Aug;28(2):302–7.
28. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: neglected yet ubiquitous. *Front Microbiol.* 2016;7:1374.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

29. Madec J-Y, Haenni M. Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and food-producing animals. *Plasmid*. 2018 Sep 1;99:72–81.
30. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, *et al*. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14 Suppl 1:144–53.
31. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 1990 Oct;18(5):294–8.
32. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988 Aug;32(8):1243–6.
33. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):1–14.
34. Rossolini GM, D’Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14 Suppl 1:33–41.
35. Zhao W-H, Hu Z-Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2013 Feb;39(1):79–101.
36. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Oct;9(5):466–75.
37. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Sep;46(9):3045–9.
38. Poirel L, Kämpfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Dec;46(12):4038–40.
39. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Mar;8(3):207–17.
40. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, *et al*. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*. 2008 Feb;14(2):195–200.
41. Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, *et al*. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother*. 2008 May;61(5):1024–8.
42. Peirano G, Pitout JDD. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: update on molecular epidemiology and treatment options. *Drugs*. 2019 Sep;79(14):1529–41.
43. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS Net), 2012. 2013. <https://data.europa.eu/doi/10.2900/93403>

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

44. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jan;8(1):26–38.
45. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahim N, Bingen E, *et al*. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun*. 1999 Feb;67(2):546–53.
46. Pitout JDD, DeVinney R. *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Research*. 2017;6.
47. Pitout JDD, Finn TJ. The evolutionary puzzle of *Escherichia coli* ST131. *Infect Genet Evol*. 2020 Jul;81:104265.
48. Matsumura Y, Johnson JR, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, *et al*. CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(6):1639–49.
49. Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, De Maio N, Moore CE, Sebra R, *et al*. Evolutionary history of the global emergence of the *Escherichia coli* epidemic clone ST131. *mBio*. 2016 Mar 22;7(2):e02162.
50. Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, *et al*. Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. *mBio*. 2016 Apr 26;7(2):e00347-00316.
51. Merino I, Hernández-García M, Turrientes M-C, Pérez-Viso B, López-Fresneña N, Díaz-Agero C, *et al*. Emergence of ESBL-producing *Escherichia coli* ST131-C1-M27 clade colonizing patients in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Nov 1;73(11):2973–80.
52. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Aug;47(8):2385–92.
53. Ebmeyer S, Kristiansson E, Larsson DGJ. PER extended-spectrum β -lactamases originate from *Pararheinheimera spp*. *Int J Antimicrob Agents*. 2019 Feb;53(2):158–64.
54. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Mar;43(3):573–81.
55. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14 Suppl 1:42–52.
56. Hidalgo L, Hopkins KL, Wareham DW, Gutierrez B, González-Zorn B. Association of extended-spectrum β -lactamase VEB-5 and 16S rRNA methyltransferase armA in *Salmonella enterica* from the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Sep;56(9):4985–7.
57. Beigverdi R, Jabalameli L, Jabalameli F, Emaneini M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: First systematic review and meta-analysis from Iran. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Sep;18:12–21.
58. Hawkey PM. Prevalence and clonality of extended-spectrum β -lactamases in Asia. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan 1;14:159–65.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

59. Moura Q, Cerdeira L, Fernandes MR, Vianello MA, Lincopan N. Novel class 1 integron (In1390) harboring *bla*_{GES-5} in a *Morganella morganii* strain recovered from a remote community. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018 Aug;91(4):345–7.
60. Poirel L, Carattoli A, Bernabeu S, Bruderer T, Frei R, Nordmann P. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Aug;65(8):1594–8.
61. Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM, *et al*. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Sep;47(9):2838–43.
62. Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. A structure-based classification of class A β -lactamases, a broadly diverse family of enzymes. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Jan;29(1):29–57.
63. Philippon A, Jacquier H, Ruppé E, Labia R. Structure-based classification of class A beta-lactamases, an update. *Curr Res Transl Med*. 2019 Nov;67(4):115–22.
64. Oueslati S, Retailleau P, Marchini L, Dortet L, Bonnin RA, Iorga BI, *et al*. Biochemical and structural characterization of OXA-405, an OXA-48 variant with extended-spectrum β -lactamase activity. *Microorganisms*. 2019 Dec 21;8(1):24.
65. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Apr;27(2):241–63.
66. Gomez S, Pasteran F, Faccone D, Bettiol M, Veliz O, De Belder D, *et al*. Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*. 2013 May;19(5):E233-235.
67. Dortet L, Oueslati S, Jeannot K, Tandé D, Naas T, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of OXA-405, an OXA-48-type extended-spectrum β -lactamase without significant carbapenemase activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jul;59(7):3823–8.
68. Haut Conseil de Santé Publique. Prévention de la transmission des Bactéries Hautement Résistantes émergentes (BHRé). Rapport Juillet 2013. 2013. https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/Telecharger?NomFichier=hcspr20130710_recoprevtransxbhre.pdf
69. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al*. 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.
70. Ponties V, Savitch Y, Soing-Altrach S, Colomb-Cotin M, Blanchard H, Bernet C, *et al*. Surveillance des EPC en France : bilan 2004 - 2016. Santé Publique France. Poster Congrès RICAI 2017. <https://www.santepubliquefrance.fr/content/download/51334/1112084>
71. Kassis-Chikhani N, Decré D, Gautier V, Burghoffer B, Saliba F, Mathieu D, *et al*. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{VIM-1} and *bla*_{SHV-5} in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Jan;57(1):142–5.
72. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, *et al*. β -lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century. *J Mol Biol*. 2019 Aug 23;431(18):3472–500.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

73. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 2002 Jun;8(6):321–31.
74. Dortet L, Poirel L, Abbas S, Oueslati S, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of FRI-1, a carbapenem-hydrolyzing Class A β -Lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Dec;59(12):7420–5.
75. Bonnin RA, Jousset AB, Emeraud C, Oueslati S, Dortet L, Naas T. Genetic diversity, biochemical properties, and detection methods of minor carbapenemases in *Enterobacterales*. *Front Med.* 2020;7:616490.
76. Octavia S, Koh TH, Ng OT, Marimuthu K, Venkatachalam I, Lin RTP, *et al.* Genomic study of *bla*_{IMI}-positive *Enterobacter cloacae* Complex in Singapore over a five-year study period. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Jul 22;64(8).
77. Mangat CS, Boyd D, Janecko N, Martz S-L, Desruisseau A, Carpenter M, *et al.* Characterization of VCC-1, a novel Ambler class A carbapenemase from *Vibrio cholerae* isolated from imported retail shrimp sold in Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Jan 11;60(3):1819–25.
78. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Apr;45(4):1151–61.
79. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011 Oct;17(10):1791–8.
80. Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Oct;49(10):4423–4.
81. Centre National de la Résistance aux Antibiotiques. Laboratoire coordonnateur ‘*Pseudomonas* et *Acinetobacter*’ de Besançon. Rapport d’activité 2019. 2020. https://maquette.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_CNR_RA_2019_resume.pdf
82. Dortet L, Bonnin R, Jousset A, Emeraud C, Creton E, Cotellon G, Naas T. Épidémiologie des Entérobactéries Productrices de Carbapénèmase (EPC) en France en 2019. Communication orale CO-005. Congrès RICAI 2020. <https://www.ricai.fr/appel-a-communication>
83. Schweizer C, Bischoff P, Bender J, Kola A, Gastmeier P, Hummel M, *et al.* Plasmid-mediated transmission of KPC-2 carbapenemase in *Enterobacteriaceae* in critically ill patients. *Front Microbiol.* 2019;10:276.
84. Mathers AJ, Cox HL, Kitchel B, Bonatti H, Brassinga AKC, Carroll J, *et al.* Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *mBio.* 2011 Nov 1;2(6):e00204-11.
85. Cuzon G, Naas T, Correa A, Quinn JP, Villegas M-V, Nordmann P. Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-*Klebsiella pneumoniae* enterobacterial isolates from Colombia. *Int J Antimicrob Agents.* 2013 Jul 1;42(1):59–62.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

86. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, *et al.* First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Aug;50(8):2880–2.
87. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, *et al.* Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*_{KPC-2} gene. *Emerg Infect Dis.* 2010 Sep;16(9):1349–56.
88. Tijet N, Muller MP, Matukas LM, Khan A, Patel SN, Melano RG. Lateral dissemination and inter-patient transmission of *bla*_{KPC-3}: role of a conjugative plasmid in spreading carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Feb;71(2):344–7.
89. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, *et al.* Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Aug;53(8):3365–70.
90. Gomez SA, Pasteran FG, Faccione D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, *et al.* Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Oct;17(10):1520–4.
91. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Petrolito V, Sciortino D, Sciacca A, *et al.* Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Sep;17(9):1444–7.
92. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Oct;59(10):5873–84.
93. Ryoo NH, Kim E-C, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK, *et al.* Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Oct;56(4):698–702.
94. Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouveleki LS. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 May 15;234(2):209–13.
95. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Sep;60(3):470–82.
96. Giakkoupi P, Tzouveleki LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Sep;44(9):2247–53.
97. Bonnin RA, Jousset AB, Urvoy N, Gauthier L, Tlili L, Creton E, *et al.* Detection of GES-5 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*, a newcomer in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Mar;61(3).
98. Kotsakis SD, Miriagou V, Tzelepi E, Tzouveleki LS. Comparative biochemical and computational study of the role of naturally occurring mutations at Ambler positions 104 and 170 in GES β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Nov;54(11):4864–71.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

99. Naas T, Dortet L, Iorga BI. Structural and functional aspects of class A carbapenemases. *Curr Drug Targets*. 2016 Jul;17(9):1006–28.
100. Poirel L, Nordmann P. Rapidec Carba NP Test for rapid detection of carbapenemase producers. *J Clin Microbiol*. 2015 Sep;53(9):3003–8.
101. Miltgen G, Plésiat P, Mille A, Chatelain P, Fournier D. Detection of carbapenemase activity in *Pseudomonas aeruginosa* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *J Microbiol Methods*. 2018 Feb;145:66–8.
102. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O’Gara C, *et al*. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Sep;40(9):2080–6.
103. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 May;34(5):755–8.
104. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis*. 2005 Feb;11(2):260–4.
105. Yu Y-S, Du X-X, Zhou Z-H, Chen Y-G, Li L-J. First isolation of *bla*_{IMI-2} in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Apr;50(4):1610–1.
106. Rojo-Bezares B, Martín C, López M, Torres C, Sáenz Y. First detection of *bla*_{IMI-2} gene in a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Feb;56(2):1146–7.
107. Hopkins KL, Findlay J, Doumith M, Mather B, Meunier D, D’Arcy S, *et al*. IMI-2 carbapenemase in a clinical *Klebsiella variicola* isolated in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Jul 1;72(7):2129–31.
108. Zhang F, Wang X, Xie L, Zheng Q, Guo X, Han L, *et al*. A novel transposon, Tn6306, mediates the spread of *bla*_{IMI} in *Enterobacteriaceae* in hospitals. *Int J Infect Dis*. 2017 Dec;65:22–6.
109. Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Finland: the first years (2008-11). *J Antimicrob Chemother*. 2012 Dec;67(12):2860–4.
110. Boo TW, O’Connell N, Power L, O’Connor M, King J, McGrath E, *et al*. First report of IMI-1-producing colistin-resistant *Enterobacter* clinical isolate in Ireland, March 2013. *Euro Surveill*. 2013 Aug 1;18(31).
111. Hartl R, Kerschner H, Gattringer R, Lepuschitz S, Allerberger F, Sorschag S, *et al*. Whole-genome analysis of a human *Enterobacter mori* isolate carrying a *bla*_{IMI-2} carbapenemase in Austria. *Microb Drug Resist*. 2019 Feb;25(1):94–6.
112. Rotova V, Papagiannitsis CC, Chudejova K, Medvecký M, Skalova A, Adamkova V, *et al*. First description of the emergence of *Enterobacter asburiae* producing IMI-2 carbapenemase in the Czech Republic. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017 Dec;11:98–9.
113. Di Luca MC, Skaare D, Aasnaes B, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. Identification of a novel IMI carbapenemase variant (IMI-9) in *Enterobacter cloacae* complex. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Dec;48(6):764–5.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

114. Koh TH, Rahman NBA, Teo JWP, La M-V, Periaswamy B, Chen SL. Putative integrative mobile elements that exploit the Xer recombination machinery carrying *bla*_{IMI-type} carbapenemase genes in *Enterobacter cloacae* complex isolates in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Jan;62(1).
115. Tarumoto N, Kodana M, Watanabe N, Sakai J, Imai K, Yamaguchi T, *et al*. First report of the isolation of *bla*_{IMI-1}-producing colistin-heteroresistant *Enterobacter cloacae* in Japan, September 2016. *J Infect Chemother*. 2018 Nov;24(11):941–3.
116. Cuzon G, Levy M, Jacob E, Dortet L, Naas T. IMI-1-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Tahiti, French Polynesia. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016 Jun;5:1–2.
117. Boyd DA, Mataseje LF, Davidson R, Delpont JA, Fuller J, Hoang L, *et al*. *Enterobacter cloacae* complex isolates harboring *bla*_{NMC-A} or *bla*_{IMI-type} class A carbapenemase genes on novel chromosomal integrative elements and plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 May;61(5).
118. Nicoletti AG, Marcondes MFM, Martins WMBS, Almeida LGP, Nicolás MF, Vasconcelos ATR, *et al*. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Sep;59(9):5159–64.
119. Poirel L, Héritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Feb;47(2):755–8.
120. Poirel L, Ortiz de la Rosa J-M, Richard A, Aires-de-Sousa M, Nordmann P. CTX-M-33, a CTX-M-15 derivative conferring reduced susceptibility to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Sep 16;
121. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul;20(3):440–58, table of contents.
122. Sabath LD, Abraham EP. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem J*. 1966 Jan;98(1):11C-13C.
123. Kuwabara S. Purification and properties of two extracellular beta-lactamases from *Bacillus cereus* 569-H. *Biochem J*. 1970 Jul;118(3):457–65.
124. Yotsuji A, Minami S, Inoue M, Mitsuhashi S. Properties of novel beta-lactamase produced by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1983 Dec;24(6):925–9.
125. Massidda O, Rossolini GM, Satta G. The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. *J Bacteriol*. 1991 Aug;173(15):4611–7.
126. Rossolini GM, Franceschini N, Riccio ML, Mercuri PS, Perilli M, Galleni M, *et al*. Characterization and sequence of the *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* carbapenemase: a new molecular class B beta-lactamase showing a broad substrate profile. *Biochem J*. 1998 May 15;332 (Pt 1):145–52.
127. Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, McLaughlin RE, Biedenbach DJ, Bouchillon SK, *et al*. Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jan 29;60(2):1067–78.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

128. Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frère JM, *et al.* Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Mar;45(3):660–3.
129. Garau G, García-Sáez I, Bebrone C, Anne C, Mercuri P, Galleni M, *et al.* Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jul;48(7):2347–9.
130. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, *et al.* Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017 Jul 19;32(1):917–9.
131. Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW. Metallo- β -lactamases: structure, function, epidemiology, treatment options, and the development pipeline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Sep 21;64(10).
132. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al.* 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.
133. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Mar;55(3):1274–8.
134. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* 2017 Apr 27;17(1):101.
135. González LJ, Bahr G, Nakashige TG, Nolan EM, Bonomo RA, Vila AJ. Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- β -lactamase. *Nat Chem Biol.* 2016 Jul;12(7):516–22.
136. Marrs ECL, Day KM, Perry JD. In vitro activity of mecillinam against *Enterobacteriaceae* with NDM-1 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Oct;69(10):2873–5.
137. Dadashi M, Yaslianifard S, Hajikhani B, Kabir K, Owlia P, Goudarzi M, *et al.* Frequency distribution, genotypes and prevalent sequence types of New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Escherichia coli* among clinical isolates around the world: A review. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019 Dec;19:284–93.
138. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010 Sep;10(9):597–602.
139. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Sep;20(9):821–30.
140. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed Res Int.* 2014;2014:249856.
141. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM metallo- β -Lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clin Microbiol Rev.* 2019 Mar 20;32(2).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

142. Politi L, Gartzonika K, Spanakis N, Zarkotou O, Poulou A, Skoura L, *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: evidence of a widespread clonal outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Aug 1;74(8):2197–202.
143. Paskova V, Medvecký M, Skalova A, Chudejova K, Bitar I, Jakubu V, *et al.* Characterization of NDM-encoding plasmids from *Enterobacteriaceae* recovered from Czech hospitals. *Front Microbiol.* 2018;9:1549.
144. Hamzaoui Z, Ocampo-Sosa A, Maamar E, Fernandez Martinez M, Ferjani S, Hammami S, *et al.* An outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, associated with OmpK35 and OmpK36 porin loss in Tunisia. *Microb Drug Resist.* 2018 Oct;24(8):1137–47.
145. 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).
146. Hornsey M, Phee L, Wareham DW. A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo-β-lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Dec;55(12):5952–4.
147. 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.
148. Chatterjee S, Mondal A, Mitra S, Basu S. *Acinetobacter baumannii* transfers the *bla*_{NDM-1} gene *via* outer membrane vesicles. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Aug 1;72(8):2201–7.
149. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jul;28(3):565–91.
150. Safavi M, Bostanshirin N, Hajikhani B, Yaslianifard S, van Belkum A, Goudarzi M, *et al.* Global genotype distribution of human clinical isolates of New Delhi metallo-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*; a systematic review. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020 Dec;23:420–9.
151. Dortet L, Girlich D, Virlouvet A-L, Poirel L, Nordmann P, Iorga BI, *et al.* Characterization of BRPMBL, the Bleomycin Resistance Protein associated with the carbapenemase NDM. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Mar;61(3).
152. Toleman MA, Spencer J, Jones L, Walsh TR. *bla*_{NDM-1} is a chimera likely constructed in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 May;56(5):2773–6.
153. Partridge SR, Iredell JR. Genetic contexts of *bla*_{NDM-1}. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Nov;56(11):6065–7; author reply 6071.
154. Toleman MA, Walsh TR. Evolution of the ISCR3 group of ISCR elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Oct;52(10):3789–91.
155. Lambert T, Gerbaud G, Bouvet P, Vieu JF, Courvalin P. Dissemination of amikacin resistance gene *aphA6* in *Acinetobacter spp.* *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Jun;34(6):1244–8.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

156. Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A, Schrenzel J, Kaase M, Nordmann P. Tn125-related acquisition of *bla*_{NDM-like} genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Feb;56(2):1087–9.
157. Campos JC, da Silva MJF, dos Santos PRN, Barros EM, Pereira M de O, Seco BMS, *et al*. Characterization of Tn3000, a transposon responsible for *bla*_{NDM-1} dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec;59(12):7387–95.
158. Dortet L, Nordmann P, Poirel L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Apr;56(4):1693–7.
159. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, *et al*. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jul;43(7):1584–90.
160. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, *et al*. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Apr;44(4):891–7.
161. Matsumura Y, Peirano G, Devinney R, Bradford PA, Motyl MR, Adams MD, *et al*. Genomic epidemiology of global VIM-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Aug 1;72(8):2249–58.
162. Peirano G, Moolman J, Pitondo-Silva A, Pitout JDD. The characteristics of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from South Africa. *Scand J Infect Dis*. 2012 Jan;44(1):74–8.
163. Birgy A, Doit C, Mariani-Kurkdjian P, Genel N, Faye A, Arlet G, *et al*. Early detection of colonization by VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and NDM-1-producing *Escherichia coli* in two children returning to France. *J Clin Microbiol*. 2011 Aug;49(8):3085–7.
164. Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P, *et al*. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a *bla*_{VIM-1} metallo-beta-lactamase gene. *J Clin Microbiol*. 2005 Oct;43(10):5344–7.
165. Galani I, Souli M, Koratzanis E, Koratzanis G, Chryssouli Z, Giamarellou H. Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* clinical isolates harbouring the same transferable plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1 in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Mar;59(3):578–9.
166. Koratzanis E, Souli M, Galani I, Chryssouli Z, Armaganidis A, Giamarellou H. Epidemiology and molecular characterisation of metallo-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a university hospital Intensive Care Unit in Greece. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Nov;38(5):390–7.
167. Sánchez-Romero I, Asensio A, Oteo J, Muñoz-Algarra M, Isidoro B, Vindel A, *et al*. Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jan;56(1):420–7.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

168. Heller I, Grif K, Orth D. Emergence of VIM-1-carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in Tyrol, Austria. *J Med Microbiol*. 2012 Apr;61(Pt 4):567–71.
169. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Lambropoulou A, Solomou A, Tsiata E, Anastassiou ED, et al. Reversal of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemiology from *bla_{KPC}*- to *bla_{VIM}*-harbouring isolates in a Greek ICU after introduction of ceftazidime/avibactam. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Jul 1;74(7):2051–4.
170. Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques. Laboratoire coordonnateur 'Pseudomonas et Acinetobacter' de Besançon. Rapport annuel d'activité 2012. 2013. https://maquette.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_annuel_2012_CNR.pdf
171. Aschbacher R, Doumith M, Livermore DM, Larcher C, Woodford N. Linkage of acquired quinolone resistance (*qnrS1*) and metallo-beta-lactamase (*bla_{VIM-1}*) genes in multiple species of *Enterobacteriaceae* from Bolzano, Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Mar;61(3):515–23.
172. Loli A, Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Carattoli A, Vatopoulos AC, Tassios PT, et al. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla_{VIM-1}*. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Sep;58(3):669–72.
173. Samuelsen Ø, Toleman MA, Hasseltvedt V, Fuursted K, Leegaard TM, Walsh TR, et al. Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Dec;17(12):1811–6.
174. Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Vatopoulos AC, Giakkoupi P, Maâtallah M, Giske CG. Dissemination of *bla_{VIM}* in Greece at the peak of the epidemic of 2005-2006: clonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 147. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jan;20(1):34–7.
175. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Jan;35(1):147–51.
176. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Jan;38(1):71–8.
177. Matsumura Y, Peirano G, Bradford PA, Motyl MR, DeVinney R, Pitout JDD. Genomic characterization of IMP and VIM carbapenemase-encoding transferable plasmids of *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Nov 1;73(11):3034–8.
178. Malchione MD, Torres LM, Hartley DM, Koch M, Goodman JL. Carbapenem and colistin resistance in *Enterobacteriaceae* in Southeast Asia: Review and mapping of emerging and overlapping challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2019 Oct;54(4):381–99.
179. Cai Y, Chen C, Zhao M, Yu X, Lan K, Liao K, et al. High prevalence of metallo-β-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* from three tertiary hospitals in China. *Front Microbiol*. 2019;10:1610.
180. Sidjabat HE, Townell N, Nimmo GR, George NM, Robson J, Vohra R, et al. Dominance of IMP-4-producing *Enterobacter cloacae* among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Australia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jul;59(7):4059–66.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

181. Roberts LW, Catchpoole E, Jennison AV, Bergh H, Hume A, Heney C, *et al.* Genomic analysis of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Queensland reveals widespread transmission of *bla*_{IMP-4} on an IncHI2 plasmid. *Microb Genomics*. 2020 Jan;6(1).
182. Karlowsky JA, Lob SH, Kazmierczak KM, Badal RE, Young K, Motyl MR, *et al.* In vitro activity of imipenem against Carbapenemase-positive *Enterobacteriaceae* isolates collected by the SMART Global Surveillance Program from 2008 to 2014. *J Clin Microbiol*. 2017 Jun;55(6):1638–49.
183. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Mar;57(3):373–83.
184. Docquier J-D, Mangani S. Structure-function relationships of class D carbapenemases. *Curr Drug Targets*. 2016;17(9):1061–71.
185. 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.
186. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom K-A, Matsumura Y. The global ascendancy of OXA-48 type carbapenemases. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Nov 13;33(1):e00102-19.
187. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Oct;55(10):4896–9.
188. Potron A, Rondinaud E, Poirel L, Belmonte O, Boyer S, Camiade S, *et al.* Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Apr;41(4):325–9.
189. Kasap M, Torol S, Kolayli F, Dundar D, Vahaboglu H. OXA-162, a novel variant of OXA-48 displays extended hydrolytic activity towards imipenem, meropenem and doripenem. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2013 Oct;28(5):990–6.
190. Potron A, Nordmann P, Poirel L. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):633–6.
191. Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Sáez D, Bautista V, *et al.* Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Feb;68(2):317–21.
192. Mataseje LF, Abdesselam K, Vachon J, Mitchel R, Bryce E, Roscoe D, *et al.* Results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program on Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*, 2010 to 2014. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Nov;60(11):6787–94.
193. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jul;67(7):1597–606.
194. Robert J, Pantel A, Merens A, Meiller E, Lavigne J-P, Nicolas-Chanoine M-H, *et al.* Development of an algorithm for phenotypic screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the routine laboratory. *BMC Infect Dis*. 2017 Jan 17;17(1):78.
195. Poirel L, Héritier C, Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):348–51.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

196. Villa L, Carattoli A, Nordmann P, Carta C, Poirel L. Complete sequence of the IncT-type plasmid pT-OXA-181 carrying the *bla*_{OXA-181} carbapenemase gene from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1965–7.
197. Potron A, Hocquet D, Triponney P, Plésiat P, Bertrand X, Valot B. Carbapenem-susceptible OXA-23-producing *Proteus mirabilis* in the French community. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Jun;63(6).
198. Findlay J, Hamouda A, Dancer SJ, Amyes SGB. Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of *Klebsiella pneumoniae* arising during meropenem therapy. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Feb;18(2):140–6.
199. Richardot C, Plésiat P, Fournier D, Monlezun L, Broutin I, Llanes C. Carbapenem resistance in cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa* as a result of amino acid substitutions in porin OprD. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 May;45(5):529–32.
200. Rice LB, Carias LL, Hujer AM, Bonafede M, Hutton R, Huyen C, *et al*. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Feb;44(2):362–7.
201. Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. Trends in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill*. 2017 Feb 9;22(6).
202. Thanner S, Drissner D, Walsh F. Antimicrobial Resistance in Agriculture. *mBio*. 2016 Apr 19;7(2):e02227-15.
203. Destoumieux-Garzón D, Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, *et al*. The *One Health* concept: 10 years old and a long road ahead. *Front Vet Sci*. 2018 Feb 12;5:14.
204. Walsh TR. A *One-Health* approach to antimicrobial resistance. *Nat Microbiol*. 2018;3(8):854–5.
205. Antibiotiques et résistance bactérienne : une menace mondiale, des conséquences individuelles. Rapport Santé Publique France. 2019. <https://www.santepubliquefrance.fr/content/download/213219/2432706>
206. Bourély C, Cazeau G, Collineau L, Haenni M, Jarrige N, Jouy E, Lupo A, Madec JY, Mader R. Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. Bilan 2019. 2020. <https://www.anses.fr/fr/system/files/LABO-Ra-Resapath2019.pdf>
207. Antimicrobial consumption in the EU/EEA. Annual epidemiological report for 2018. European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network (ESAC-Net). ECDC. 2019. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Antimicrobial-consumption-EU-EA.pdf>
208. Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, *et al*. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog*. 2011 Jul;7(7):e1002158.
209. Wellington EMH, Boxall AB, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, *et al*. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2013 Feb;13(2):155–65.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

210. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Aug 1;72(8):2145–55.
211. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep;64 Suppl 1:i3-10.
212. Peirano G, van Greune CHJ, Pitout JDD. Characteristics of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from community hospitals in South Africa. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 Apr;69(4):449–53.
213. Mshana SE, Hain T, Domann E, Lyamuya EF, Chakraborty T, Imirzalioglu C. Predominance of *Klebsiella pneumoniae* ST14 carrying CTX-M-15 causing neonatal sepsis in Tanzania. *BMC Infect Dis.* 2013 Oct 7;13:466.
214. Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, *et al.* Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jan;16(1):48–54.
215. Otto SJG, Carson CA, Finley RL, Thomas MK, Reid-Smith RJ, McEwen SA. Estimating the number of human cases of ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in Québec and Ontario, Canada. *Clin Infect Dis.* 2014 Nov 1;59(9):1281–90.
216. Franco A, Leekitcharoenphon P, Feltrin F, Alba P, Cordaro G, Iurescia M, *et al.* Emergence of a clonal lineage of multidrug-resistant ESBL-producing *Salmonella* Infantis transmitted from broilers and broiler meat to humans in Italy between 2011 and 2014. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144802.
217. Le Hello S, Harrois D, Bouchrif B, Sontag L, Elhani D, Guibert V, *et al.* Highly drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198-X1: a microbiological study. *Lancet Infect Dis.* 2013 Aug;13(8):672–9.
218. Eller C, Leistner R, Guerra B, Fischer J, Wendt C, Rabsch W, *et al.* Emergence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Feb;69(2):562–4.
219. Denagamage TN, Wallner-Pendleton E, Jayarao BM, Xiaoli L, Dudley EG, Wolfgang D, *et al.* Detection of CTX-M-1 extended-spectrum beta-lactamase among ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* clinical isolates of poultry. *J Vet Diagn Invest.* 2019 Sep;31(5):681–7.
220. Cormier A, Zhang PLC, Chalmers G, Weese JS, Deckert A, Mulvey M, *et al.* Diversity of CTX-M-positive *Escherichia coli* recovered from animals in Canada. *Vet Microbiol.* 2019 Apr;231:71–5.
221. Gundran RS, Cardenio PA, Villanueva MA, Sison FB, Benigno CC, Kreausukon K, *et al.* Prevalence and distribution of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. *BMC Vet Res.* 2019 Jul 5;15(1):227.
222. Rao L, Lv L, Zeng Z, Chen S, He D, Chen X, *et al.* Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003-2012. *Vet Microbiol.* 2014 Aug 27;172(3–4):534–41.
223. Madec J-Y, Haenni M, Nordmann P, Poirel L. Extended-spectrum β -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? *Clin Microbiol Infect.* 2017 Nov;23(11):826–33.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

224. Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, Kobisch M, Madec J-Y. CTX-M-1- and CTX-M-15-type β -lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Nov 1;28(5):402–7.
225. Tamang MD, Nam H-M, Kim S-R, Chae MH, Jang G-C, Jung S-C, *et al.* Prevalence and molecular characterization of CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy swine and cattle. *Foodborne Pathog Dis*. 2013 Jan;10(1):13–20.
226. Hordijk J, Mevius DJ, Kant A, Bos MEH, Graveland H, Bosman AB, *et al.* Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: a longitudinal approach. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Nov;68(11):2468–76.
227. Haenni M, Saras E, Ponsin C, Dahmen S, Petitjean M, Hocquet D, *et al.* High prevalence of international ESBL CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* ST114 clone in animals. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Jun;71(6):1497–500.
228. Ewers C, Stamm I, Pfeifer Y, Wieler LH, Kopp PA, Schønning K, *et al.* Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Oct;69(10):2676–80.
229. Haenni M, Ponsin C, Métayer V, Médaille C, Madec J-Y. Veterinary hospital-acquired infections in pets with a ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 clone. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Mar;67(3):770–1.
230. Poirel L, Nordmann P, Ducroz S, Boulouis H-J, Arné P, Millemann Y. Extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type ST274 in companion animals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 May;57(5):2372–5.
231. Donati V, Feltrin F, Hendriksen RS, Svendsen CA, Cordaro G, García-Fernández A, *et al.* Extended-spectrum-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in *Klebsiella spp.* from companion animals in Italy. *PLoS One*. 2014;9(3):e90564.
232. Melo LC, Oresco C, Leigue L, Netto HM, Melville PA, Benites NR, *et al.* Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing *Enterobacteriaceae* in healthy and diseased companion animals in Brazil. *Vet Microbiol*. 2018 Jul;221:59–66.
233. Timofte D, Maciucă IE, Williams NJ, Wattret A, Schmidt V. Veterinary hospital dissemination of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 in the United Kingdom. *Microb Drug Resist*. 2016 Oct;22(7):609–15.
234. Moreno A, Bello H, Guggiana D, Domínguez M, González G. Extended-spectrum β -lactamases belonging to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin. *Vet Microbiol*. 2008 May 25;129(1):203–8.
235. Dahmen S, Haenni M, Châtre P, Madec J-Y. Characterization of *bla*_{CTX-M} IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Dec;68(12):2797–801.
236. Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, *et al.* Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Apr;65(4):651–60.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

237. Kawamura K, Sugawara T, Matsuo N, Hayashi K, Norizuki C, Tamai K, *et al.* Spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates of epidemic clone B2-O25-ST131 among dogs and cats in Japan. *Microb Drug Resist.* 2017 Dec;23(8):1059–66.
238. Said LB, Hamdaoui M, Jouini A, Boudabous A, Slama KB, Torres C, *et al.* First detection of CTX-M-1 in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in seafood from Tunisia. *J Food Prot.* 2017 Oct 17;1877–81.
239. Mughini-Gras L, Dorado-García A, van Duijkeren E, van den Bunt G, Dierikx CM, Bonten MJM, *et al.* Attributable sources of community-acquired carriage of *Escherichia coli* containing β -lactam antibiotic resistance genes: a population-based modelling study. *Lancet Planet Health.* 2019;3(8):e357–69.
240. Le QP, Ueda S, Nguyen TNH, Dao TVK, Van Hoang TA, Tran TTN, *et al.* Characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in retail meats and shrimp at a local market in Vietnam. *Foodborne Pathog Dis.* 2015 Aug;12(8):719–25.
241. van Hoek AHAM, Veenman C, van Overbeek WM, Lynch G, de Roda Husman AM, Blaak H. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. *Int J Food Microbiol.* 2015 Jul 2;204:1–8.
242. Rodrigues C, Machado E, Peixe L, Novais A. Inc11/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of *bla*_{TEM-52} and *bla*_{CTX-M-1/-32} in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Oct;68(10):2245–8.
243. Yang Q-E, Sun J, Li L, Deng H, Liu B-T, Fang L-X, *et al.* IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. *Front Microbiol.* 2015 Sep 22;6:964.
244. Casella T, Nogueira MCL, Saras E, Haenni M, Madec J-Y. High prevalence of ESBLs in retail chicken meat despite reduced use of antimicrobials in chicken production, France. *Int J Food Microbiol.* 2017 Sep 18;257:271–5.
245. Madec J-Y, Haenni M, Métayer V, Saras E, Nicolas-Chanoine M-H. High prevalence of the animal-associated *bla*_{CTX-M-1} Inc11/ST3 plasmid in human *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Sep;59(9):5860–1.
246. Accogli M, Fortini D, Giufrè M, Graziani C, Dolejska M, Carattoli A, *et al.* Inc11 plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin. *Clin Microbiol Infect.* 2013 May;19(5):E238-240.
247. Dahmen S, Haenni M, Châtre P, Madec J-Y. Characterization of *bla*_{CTX-M} IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Dec 1;68(12):2797–801.
248. Poirel L, Potron A, De La Cuesta C, Cleary T, Nordmann P, Munoz-Price LS. Wild coastline birds as reservoirs of broad-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Miami Beach, Florida. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 May;56(5):2756–8.
249. Darwich L, Vidal A, Seminati C, Albamonte A, Casado A, López F, *et al.* High prevalence and diversity of extended-spectrum β -lactamase and emergence of OXA-48 producing *Enterobacterales* in wildlife in Catalonia. *PLoS One.* 2019;14(8):e0210686.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

250. Carvalho I, Tejedor-Junco MT, González-Martín M, Corbera JA, Suárez-Pérez A, Silva V, *et al.* Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from vultures in Canary Islands. *Environ Microbiol Rep.* 2020;12(5):540–7.
251. Zurfluh K, Albini S, Mattmann P, Kindle P, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R, *et al.* Antimicrobial resistant and extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in common wild bird species in Switzerland. *MicrobiologyOpen.* 2019 Nov;8(11):e845.
252. Holtmann AR, Meemken D, Müller A, Seinige D, Büttner K, Failing K, *et al.* Wild Boars Carry Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC-Producing *Escherichia coli*. *Microorganisms.* 2021 Feb 12;9(2):367.
253. Fick J, Söderström H, Lindberg RH, Phan C, Tysklind M, Larsson DGJ. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ Toxicol Chem.* 2009 Dec;28(12):2522–7.
254. Gullberg E, Albrecht LM, Karlsson C, Sandegren L, Andersson DI. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *mBio.* 2014 Oct 7;5(5):e01918-01914.
255. Amos GCA, Hawkey PM, Gaze WH, Wellington EM. Wastewater effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Jul;69(7):1785–91.
256. Bajaj P, Singh NS, Kanaujia PK, Viridi JS. Distribution and molecular characterization of genes encoding CTX-M and AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from an Indian urban aquatic environment. *Sci Total Environ.* 2015 Feb 1;505:350–6.
257. Dhanji H, Murphy NM, Akhigbe C, Doumith M, Hope R, Livermore DM, *et al.* Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase from UK river water. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Mar;66(3):512–6.
258. Maravić A, Skočibušić M, Cvjetan S, Šamanić I, Fredotović Ž, Puizina J. Prevalence and diversity of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from marine beach waters. *Mar Pollut Bull.* 2015 Jan 15;90(1–2):60–7.
259. Chen P-A, Hung C-H, Huang P-C, Chen J-R, Huang I-F, Chen W-L, *et al.* Characteristics of CTX-M Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from multiple rivers in Southern Taiwan. *Appl Environ Microbiol.* 2016 Jan 15;82(6):1889–97.
260. Martak D, Henriot CP, Broussier M, Couchoud C, Valot B, Richard M, *et al.* High prevalence of Human-associated *Escherichia coli* in wetlands located in Eastern France. *Front Microbiol.* 2020;11:552566.
261. Mavroidi A, Liakopoulos A, Gounaris A, Goudesidou M, Gaitana K, Miriagou V, *et al.* Successful control of a neonatal outbreak caused mainly by ST20 multidrug-resistant SHV-5-producing *Klebsiella pneumoniae*, Greece. *BMC Pediatr.* 2014 Apr 17;14:105.
262. Tzelepi E, Magana C, Platsouka E, Sofianou D, Paniara O, Legakis NJ, *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2003 Mar;21(3):285–8.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

263. Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM. Beta-lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jul;56(1):115–21.
264. Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miró E, *et al.* ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol.* 2006 Dec 20;118(3–4):299–304.
265. Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol.* 2010 Oct 26;145(3–4):273–8.
266. Jouini A, Slama KB, Klibi N, Sallem RB, Estepa V, Vinué L, *et al.* Lineages and virulence gene content among extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains of food origin in Tunisia. *J Food Prot.* 2013 Feb;76(2):323–7.
267. Noda T, Murakami K, Etoh Y, Okamoto F, Yatsuyanagi J, Sera N, *et al.* Increase in resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Salmonella* isolated from retail chicken products in Japan. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116927.
268. Machado E, Coque TM, Cantón R, Sousa JC, Peixe L. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Aug;62(2):296–302.
269. Alcalá L, Alonso CA, Simón C, González-Esteban C, Orós J, Rezusta A, *et al.* Wild birds, frequent carriers of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 types. *Microb Ecol.* 2016 Nov;72(4):861–9.
270. Zurfluh K, Nüesch-Inderbinen M, Morach M, Zihler Berner A, Hächler H, Stephan R. Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Appl Environ Microbiol.* 2015 May 1;81(9):3115–20.
271. Garmyn A, Haesebrouck F, Hellebuyck T, Smet A, Pasmans F, Butaye P, *et al.* Presence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in wild geese. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jul;66(7):1643–4.
272. Ceccarelli D, Kant A, van Essen-Zandbergen A, Dierikx C, Hordijk J, Wit B, *et al.* Diversity of plasmids and genes encoding resistance to extended spectrum cephalosporins in commensal *Escherichia coli* from Dutch livestock in 2007-2017. *Front Microbiol.* 2019;10:76.
273. Ben Sallem R, Ben Slama K, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Estepa V, Jouini A, *et al.* Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. *Foodborne Pathog Dis.* 2012 Dec;9(12):1137–42.
274. Hong JS, Song W, Park H-M, Oh J-Y, Chae J-C, Jeong S, *et al.* Molecular characterization of fecal extended-spectrum β -lactamase- and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* from healthy companion animals and cohabiting humans in South Korea. *Front Microbiol.* 2020;11:674.
275. Ghosh KK, Lebert LA, McEwen SA, Reid-Smith RJ, Deckert AE, Agunos A, *et al.* Extended-spectrum β -lactamase and AmpC β -Lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens raised in small flocks in Ontario, Canada. *Microb Drug Resist.* 2019 Oct;25(8):1250–6.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

276. Koga VL, Maluta RP, da Silveira WD, Ribeiro RA, Hungria M, Vespero EC, *et al.* Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. *BMC Microbiol.* 2019 Jul 30;19(1):174.
277. Nesporova K, Wyrsh ER, Valcek A, Bitar I, Chaw K, Harris P, *et al.* *Escherichia coli* sequence type 457 is an emerging extended-spectrum- β -lactam-resistant lineage with reservoirs in wildlife and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Dec 16;65(1).
278. Directive 2006/7/CE du Parlement européen et du Conseil du 15 février 2006 concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade et abrogeant la directive 76/160/CEE. Annexe 1. 2006. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0007&from=EN>
279. Zarfel G, Galler H, Feierl G, Haas D, Kittinger C, Leitner E, *et al.* Comparison of extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection. *Environ Pollut.* 2013 Feb;173:192–9.
280. Leonard AFC, Zhang L, Balfour AJ, Garside R, Gaze WH. Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. *Environ Int.* 2015 Sep;82:92–100.
281. Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, *et al.* Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jun;17(6):873–80.
282. Dierikx C, van der Goot J, Fabri T, van Essen-Zandbergen A, Smith H, Mevius D. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jan;68(1):60–7.
283. de Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, *et al.* Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS Genet.* 2014 Dec 18;10(12):e1004776.
284. Huijbers PMC, Graat EAM, Haenen APJ, van Santen MG, van Essen-Zandbergen A, Mevius DJ, *et al.* Extended-spectrum and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Oct 1;69(10):2669–75.
285. Day MJ, Rodríguez I, van Essen-Zandbergen A, Dierikx C, Kadlec K, Schink A-K, *et al.* Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2016 May;71(5):1178–82.
286. Falgenhauer L, Imirzalioglu C, Ghosh H, Gwozdziński K, Schmiedel J, Gentil K, *et al.* Circulation of clonal populations of fluoroquinolone-resistant CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST410 in humans and animals in Germany. *Int J Antimicrob Agents.* 2016 Jun;47(6):457–65.
287. Ludden C, Raven KE, Jamrozy D, Gouliouris T, Blane B, Coll F, *et al.* *One Health* genomic surveillance of *Escherichia coli* demonstrates distinct lineages and mobile genetic elements in isolates from humans versus livestock. *mBio.* 2019 22;10(1).
288. Nguyen VT, Jamrozy D, Matamoros S, Carrique-Mas JJ, Ho HM, Thai QH, *et al.* Limited contribution of non-intensive chicken farming to ESBL-producing *Escherichia coli* colonization in humans in Vietnam: an epidemiological and genomic analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2019 01;74(3):561–70.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

289. Nguyen MN, Hoang HTT, Xavier BB, Lammens C, Le HT, Hoang NTB, *et al.* Prospective *One Health* genetic surveillance in Vietnam identifies distinct *bla*_{CTX-M}-harbouring *Escherichia coli* in food-chain and human-derived samples. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Jan 18;S1198-743X(21)00032-X.
290. Reid CJ, McKinnon J, Djordjevic SP. Clonal ST131-H22 *Escherichia coli* strains from a healthy pig and a human urinary tract infection carry highly similar resistance and virulence plasmids. *Microb Genomics.* 2019 Sep;5(9).
291. Valcek A, Roer L, Overballe-Petersen S, Hansen F, Bortolaia V, Leekitcharoenphon P, *et al.* Inc11 ST3 and Inc11 ST7 plasmids from CTX-M-1-producing *Escherichia coli* obtained from patients with bloodstream infections are closely related to plasmids from *E. coli* of animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Aug 1;74(8):2171–5.
292. Alzayn M, Findlay J, Schubert H, Mounsey O, Gould VC, Heesom KJ, *et al.* Characterization of AmpC-hyperproducing *Escherichia coli* from humans and dairy farms collected in parallel in the same geographical region. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Sep 1;75(9):2471–9.
293. Büdel T, Kuenzli E, Campos-Madueno EI, Mohammed AH, Hassan NK, Zinsstag J, *et al.* On the island of Zanzibar people in the community are frequently colonized with the same MDR *Enterobacteriales* found in poultry and retailed chicken meat. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Sep 1;75(9):2432–41.
294. van Hoek AHAM, Dierikx C, Bosch T, Schouls L, van Duijkeren E, Visser M. Transmission of ESBL-producing *Escherichia coli* between broilers and humans on broiler farms. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Mar 1;75(3):543–9.
295. Bortolaia V, Hansen KH, Nielsen CA, Fritsche TR, Guardabassi L. High diversity of plasmids harbouring *bla*_{CMY-2} among clinical *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the upper Midwestern USA. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Jun;69(6):1492–6.
296. Guenther S, Ewers C, Wieler LH. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front Microbiol.* 2011 Dec 19; 2011 Dec 19;2:246.
297. Dorado-García A, Smid JH, van Pelt W, Bonten MJM, Fluit AC, van den Bunt G, *et al.* Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Feb 1;73(2):339–47.
298. Nadimpalli M, Vuthy Y, de Lauzanne A, Fabre L, Criscuolo A, Gouali M, *et al.* Meat and fish as sources of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, Cambodia. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(1).
299. Lazarus B, Paterson DL, Mollinger JL, Rogers BA. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. *Clin Infect Dis.* 2015 Feb 1;60(3):439–52.
300. Purohit MR, Chandran S, Shah H, Diwan V, Tamhankar AJ, Stålsby Lundborg C. Antibiotic resistance in an Indian rural community: A '*One-Health*' observational study on commensal coliform from humans, animals, and water. *Int J Environ Res Public Health.* 2017 06;14(4).
301. Runchaen C, Raven KE, Reuter S, Kallonen T, Paksanont S, Thammachote J, *et al.* Whole genome sequencing of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from patients, farm waste and canals in Thailand. *Genome Med.* 2017 Sep 6;9(1):81.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

302. Runcharoen C, Moradigaravand D, Blane B, Paksanont S, Thammachote J, Anun S, *et al.* Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med.* 2017 Jan 24;9(1):6.
303. Seni J, Moremi N, Matee M, van der Meer F, DeVinney R, Mshana SE, *et al.* Preliminary insights into the occurrence of similar clones of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in humans, animals and the environment in Tanzania: A systematic review and meta-analysis between 2005 and 2016. *Zoonoses Public Health.* 2018 Feb;65(1):1–10.
304. Day MJ, Hopkins KL, Wareham DW, Toleman MA, Elviss N, Randall L, *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and Scotland: an epidemiological surveillance and typing study. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(12):1325–35.
305. Tansawai U, Walsh TR, Niumsup PR. Extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* among backyard poultry farms, farmers, and environments in Thailand. *Poult Sci.* 2019 Jun 1;98(6):2622–31.
306. Ludden C, Moradigaravand D, Jamrozy D, Gouliouris T, Blane B, Naydenova P, *et al.* A *One Health* study of the genetic relatedness of *Klebsiella pneumoniae* and their mobile elements in the East of England. *Clin Infect Dis.* 2020 Jan 2;70(2):219–26.
307. Yaici L, Haenni M, Saras E, Boudehouche W, Touati A, Madec J-Y. *bla*_{NDM-5}-carrying IncX3 plasmid in *Escherichia coli* ST1284 isolated from raw milk collected in a dairy farm in Algeria. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Sep;71(9):2671–2.
308. He T, Wei R, Zhang L, Sun L, Pang M, Wang R, *et al.* Characterization of NDM-5-positive extensively resistant *Escherichia coli* isolates from dairy cows. *Vet Microbiol.* 2017 Aug;207:153–8.
309. He T, Wang Y, Sun L, Pang M, Zhang L, Wang R. Occurrence and characterization of *bla*_{NDM-5}-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates from dairy cows in Jiangsu, China. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Jan;72(1):90–4.
310. Purkait D, Ahuja A, Bhattacharjee U, Singha A, Rhetso K, Dey TK, *et al.* Molecular characterization and computational modelling of New Delhi Metallo- β -Lactamase-5 from an *Escherichia coli* isolate (KOE3) of bovine origin. *Indian J Microbiol.* 2016 Jun;56(2):182–9.
311. Diab M, Hamze M, Bonnet R, Saras E, Madec J-Y, Haenni M. OXA-48 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in raw milk in Lebanon: epidemic spread of dominant *Klebsiella pneumoniae* clones. *J Med Microbiol.* 2017 Nov;66(11):1688–91.
312. Köck R, Daniels-Haardt I, Becker K, Mellmann A, Friedrich AW, Mevius D, *et al.* Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Dec;24(12):1241–50.
313. Sugawara Y, Hagiya H, Akeda Y, Aye MM, Myo Win HP, Sakamoto N, *et al.* Dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* harbouring *bla*_{NDM} or *bla*_{IMI} in local market foods of Yangon, Myanmar. *Sci Rep.* 2019 Oct 8;9(1):14455.
314. Brouwer MSM, Rapallini M, Geurts Y, Harders F, Bossers A, Mevius DJ, *et al.* *Enterobacter cloacae* complex isolated from shrimps from Vietnam carrying *bla*_{IMI-1} resistant to carbapenems but not cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Jul;62(7).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

315. Brouwer MSM, Tehrani KHME, Rapallini M, Geurts Y, Kant A, Harders F, *et al.* Novel carbapenemases FLC-1 and IMI-2 encoded by an *Enterobacter cloacae* complex isolated from food products. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Jun;63(6).
316. Kutilova I, Valcek A, Papagiannitsis CC, Cejkova D, Masarikova M, Paskova V, *et al.* Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria from American crows in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Dec 16;65(1).
317. 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 Dec;255(Pt 1):113143.
318. Laurens C, Jean-Pierre H, Licznar-Fajardo P, Hantova S, Godreuil S, Martinez O, *et al.* Transmission of IMI-2 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from river water to human. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018 Dec;15:88–92.
319. Loucif L, Chelaghma W, Helis Y, Sebaa F, Baoune RD, Zaatout W, *et al.* First detection of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in community-acquired urinary tract infection in Algeria. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018 Mar;12:115–6.
320. Piedra-Carrasco N, Fàbrega A, Calero-Cáceres W, Cornejo-Sánchez T, Brown-Jaque M, Mir-Cros A, *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* recovered from a Spanish river ecosystem. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175246.
321. Trouillet PY. Les populations d'origine indienne hors de l'Inde : fabrique et enjeux d'une « diaspora ». Dossier Le monde Indien : populations et espaces. Géoconfluences. ENS Lyon. 2015.
322. Bulletin statistique du trafic aérien commercial. Année 2018. Direction générale de l'Aviation civile. https://www.ecologie.gouv.fr/sites/default/files/bulletin_stat_trafic_aerien_2018.pdf
323. Gay N, Belmonte O, Collard J-M, Halifa M, Issack MI, Mindjae S, *et al.* Review of antibiotic resistance in the Indian Ocean commission: A human and animal health issue. *Front Public Health.* 2017;5:162.
324. Belmonte O, Drouet D, Alba J, Moiton M-P, Kuli B, Lugagne-Delpon N, *et al.* [Evolution of *Enterobacteriaceae* resistance to antibiotics in Reunion Island: emergence of extended-spectrum beta-lactamases]. *Pathol Biol (Paris).* 2010 Feb;58(1):18–24.
325. Robin F, Beyrouthy R, Vaux S, Belmonte O, Picot S, Bonnet R. Épidémiologie des souches d'entérobactéries productrices de BLSE à La Réunion. Poster Congrès RICAI 2014. <https://www.ricai.fr/archives-2014>
326. Belmonte O, Pailhoriès H, Kempf M, Gaultier MP, Lotteau H, Legendre P, *et al.* Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération chez les animaux de compagnie sur l'île de La Réunion. Poster RICAI 2014. <https://www.ricai.fr/archives-2014>
327. Cabanes F, Lemant J, Picot S, Simac C, Cousty J, Jalin L, *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella* metallo-beta-lactamase (NDM-1) producers on Reunion Island. *J Clin Microbiol.* 2012 Nov;50(11):3812.
328. Holman AM, Allyn J, Miltgen G, Lugagne N, Traversier N, Picot S, *et al.* Surveillance of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the Indian Ocean Region between January 2010 and December 2015. *Med Mal Infect.* 2017 Sep;47(5):333–9.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

329. Une pauvreté marquée dans les DOMs, notamment en Guyane et à Mayotte. Situation en 2017. INSEE Première. N°1804. Juillet 2020. https://www.insee.fr/fr/statistiques/fichier/version-html/4622377/IP_1804.pdf
330. Büdel T, Kuenzli E, Campos-Madueno EI, Mohammed AH, Hassan NK, Zinsstag J, *et al.* On the island of Zanzibar people in the community are frequently colonized with the same MDR Enterobacterales found in poultry and retailed chicken meat. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Sep 1;75(9):2432–41.
331. Bonnin RA, Poirel L, Benoit-Cattin T, Nordmann P. Ceftazidime-susceptible and imipenem-non-susceptible OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* from the Comoros archipelago. *Int J Antimicrob Agents.* 2013 Mar;41(3):297–8.
332. Miltgen G, Cardinale E, Traversier N, Marichal A, Jaffar-Bandjee MC, Meenowa D, *et al.* Prévalence des entérobactéries BLSE chez les animaux d'élevage sur plusieurs îles de l'Océan Indien. Poster Congrès RICAI 2014. <https://www.ricai.fr/archives-2014>
333. Jaubert J, Demotier S, Lamouret O, Aujoulat T, Simac C, Lugagne N, *et al.* Intestinal carriage of third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* in Reunion Island's community. Poster P-084. Congrès RICAI 2020. <https://www.ricai.fr/appel-a-communication>
334. Gay N, Lugagne N, Miltgen G, Belmonte O, Cardinale E. Reunion, a sentinel island for multidrug-resistant bacteria surveillance in South-western Indian ocean: a retrospective survey using hospitalised patients screening, 2015-2017. 2020 Oct 1;20(1):1488.
335. Gay N, Leclaire A, Laval M, Miltgen G, Jégo M, Stéphane R, *et al.* Risk factors of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* occurrence in farms in Reunion, Madagascar and Mayotte Islands, 2016-2017. *Vet Sci.* 2018 Feb 23;5(1).
336. L'observatoire des importations des produits agricoles sur La Réunion. Bilan de 5 années d'importation. Agreste La Réunion n°88. DAAF de La Réunion. 2013 Nov. https://daaf.reunion.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Observatoire_Import_cle86f96d-1.pdf
337. 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.
338. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, *et al.* Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Aug;45(8):2269–75.
339. Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, *et al.* Distribution of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Dec;46(12):3739–43.
340. Mabilat C, Courvalin P. Development of 'oligotyping' for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Nov;34(11):2210–6.
341. Talon D, Dupont MJ, Lesne J, Thouverez M, Michel-Briand Y. Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila*. *J Appl Bacteriol.* 1996 Mar;80(3):277–82.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

342. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 2006 Jun;60(5):1136–51.
343. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):4178–82.
344. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One.* 2013;8(6):e66358.
345. Lacher DW, Steinsland H, Blank TE, Sonnenberg MS, Whittam TS. Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. *J Bacteriol.* 2007 Jan;189(2):342–50.
346. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233–9.
347. Kent WJ. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* 2002 Apr;12(4):656–64.
348. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Dec 1;75(12):3491–500.
349. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012 May;19(5):455–77.
350. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genomics.* 2018 Jul;4(7).
351. Roer L, Tchesnokova V, Allesøe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, *et al.* Development of a web tool for *Escherichia coli* subtyping based on fimH alleles. *J Clin Microbiol.* 2017 Aug;55(8):2538–43.
352. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul 2;47(W1):W256–9.
353. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Apr;24(4):350–4.
354. Arredondo-Alonso S, Rogers MRC, Braat JC, Verschuuren TD, Top J, Corander J, *et al.* mlplasmids: a user-friendly tool to predict plasmid- and chromosome-derived sequences for single species. *Microb Genomics.* 2018 Nov;4(11).
355. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol.* 2019 May;37(5):540–6.
356. Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, *et al.* Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One.* 2014;9(11):e112963.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

357. Santé Publique France. Surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques en soins de ville et en établissements pour personnes âgées dépendante. Mission Primo. Résultats préliminaires 2019. 2020. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques/documents/rapport-synthese/surveillance-de-la-resistance-bacterienne-aux-antibiotiques-en-soins-de-ville-et-en-etablissements-pour-personnes-agees-dependantes.-mission-primo>
358. L'assainissement des eaux usées domestiques. Schéma d'Aménagement et de Gestion des Eaux Ouest. Territoire Côte-Ouest de La Réunion. SAFEGE. 2014. <https://www.tco.re/wp-content/uploads/2014/06/Assainissement-des-eaux-us%C3%A9es-domestiques.pdf>
359. Loftie-Eaton W, Bashford K, Quinn H, Dong K, Millstein J, Hunter S, *et al.* Compensatory mutations improve general permissiveness to antibiotic resistance plasmids. *Nat Ecol Evol.* 2017 Sep;1(9):1354–63.
360. Büdel T, Kuenzli E, Clément M, Bernasconi OJ, Fehr J, Mohammed AH, *et al.* Polyclonal gut colonization with extended-spectrum cephalosporin- and/or colistin-resistant *Enterobacteriaceae*: a normal status for hotel employees on the island of Zanzibar, Tanzania. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Oct 1;74(10):2880–90.
361. Gay N. *One Health* approach of Extended Spectrum Beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in human, animal and drinking water in small breeder households, Madagascar 2018. Communication affichée. 59th ITM Colloquium: Antibiotic Resistance from Research To Action, Phnom Penh, Cambodge. 2018.
362. Börjesson S, Ny S, Egervärn M, Bergström J, Rosengren Å, Englund S, *et al.* Limited dissemination of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid-encoded AmpC-producing *Escherichia coli* from food and farm animals, Sweden. *Emerg Infect Dis.* 2016 Apr;22(4):634–40.
363. Paul M, Pulia M, Pulcini C. Antibiotic stewardship in the emergency department: not to be overlooked. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Feb;27(2):172–4.
364. Ouyang J, Sun F, Zhou D, Feng J, Zhan Z, Xiong Z, *et al.* Comparative genomics of five different resistance plasmids coexisting in a clinical multi-drug resistant *Citrobacter freundii* isolate. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1447–60.
365. Santé Publique France. Episodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénèmes (EPC) en France, de 2004 à 2015. Situation épidémiologique au 31 décembre 2015. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwig0MG2qOnvAhWoz4UKHft6CT8QFjACegQIBxAD&url=https%3A%2F%2Fwww.santepubliquefrance.fr%2Fcontent%2Fdownload%2F51332%2F1112040&usg=AOvVaw1UkUHPTFY7GIVMOidomDPn>
366. Walsh TR, Toleman MA. The new medical challenge: why NDM-1? Why Indian? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011 Feb;9(2):137–41.

ANNEXES

Annexe 1

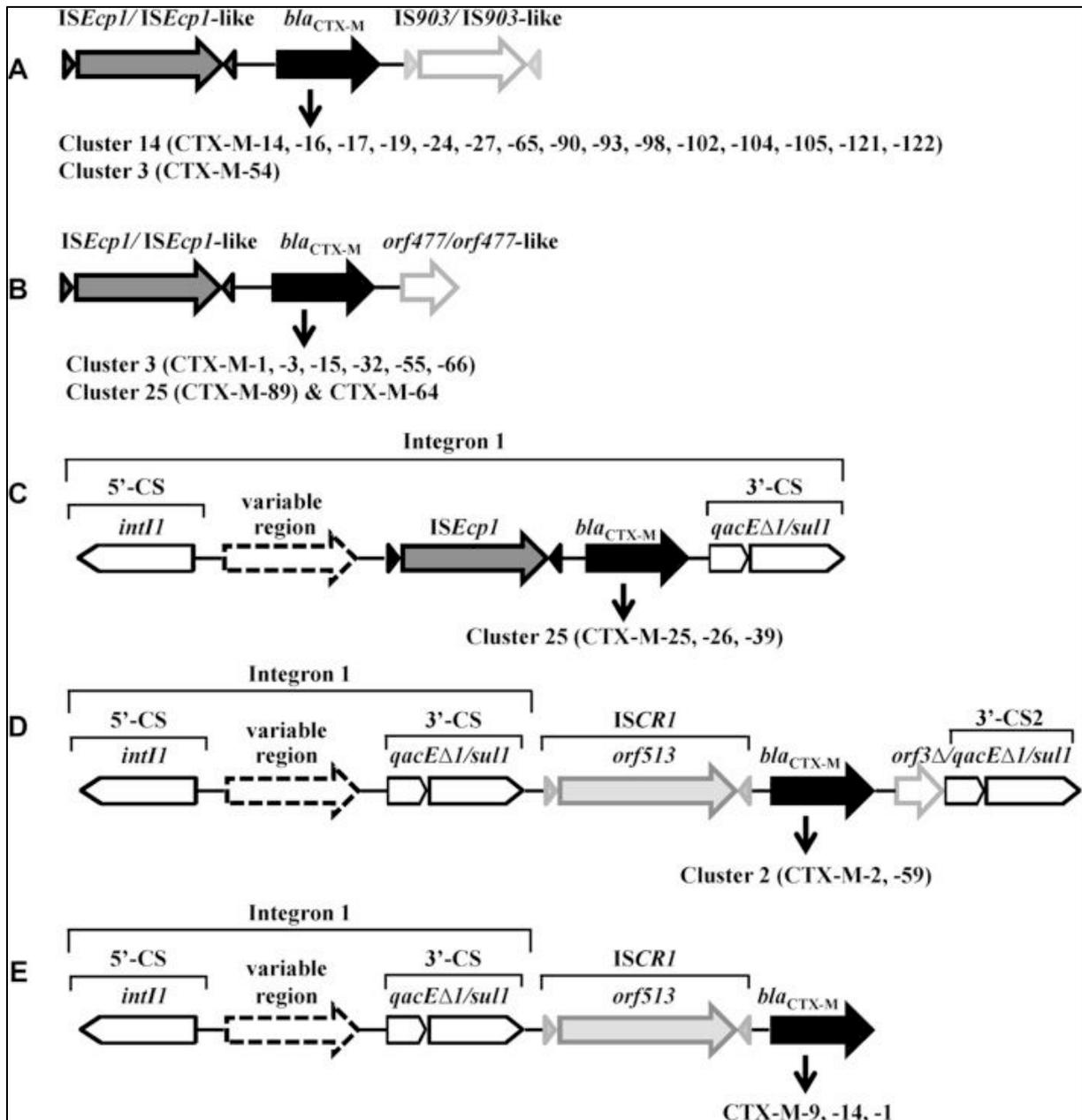
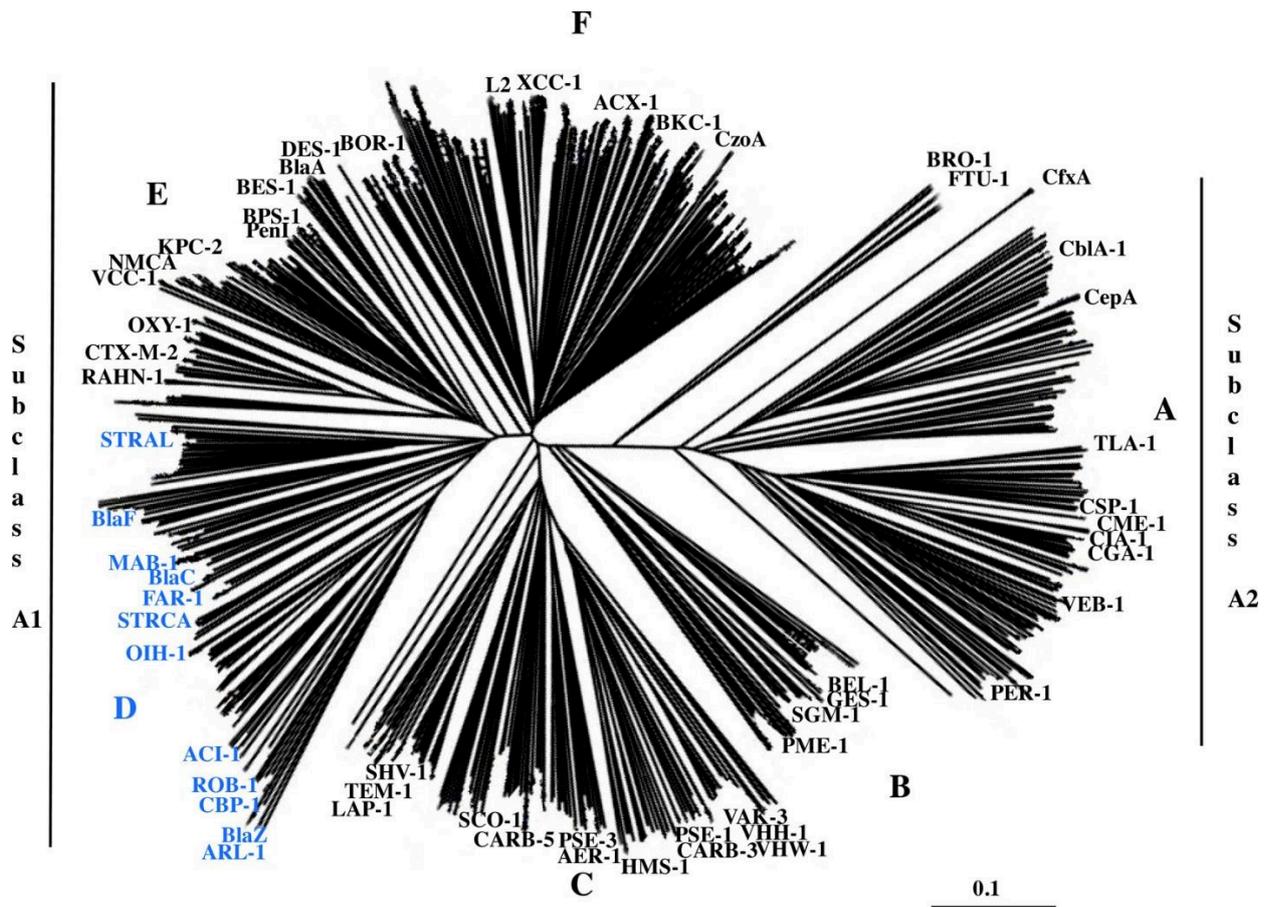


Figure détaillant les plateformes génétiques typiques des enzymes CTX-M.

A et B : les cassettes de gènes *bla*_{CTX-M} entre parenthèses en amont par ISEcp1/ISEcp1-like et en aval par IS903/IS903-like (A) ou *orf477/orf477*-like (B) ; C : gènes *bla*_{CTX-M} associés à l'intégron de classe 1-ISEcp1 ; D et E : gènes *bla*_{CTX-M} associés au complexe intégron de classe 1-ISCR1.

CS, segment conservé ; *intI1*, gène de l'intégrase ; *qacEΔ1*, gène de résistance aux ammoniums quaternaires ; *sul1*, gène de résistance aux sulfamides ; 3'-CS2, la deuxième copie du segment conservé 3'.

Annexe 2



Phylogramme non enraciné pour 700 bêta-lactamases de classe A.

Plusieurs enzymes représentatives sont présentées. Les enzymes putatives sont indiquées par un numéro d'accès UniProt ou GenBank (GI ou WP), mais la plupart contiennent les motifs ou résidus conservés suivants, communs aux bêta-lactamases de classe A : S70XXK, S130DN, E166 et K234TG. ClustalO a été utilisé pour aligner les séquences et l'arbre a été construit par la méthode de jonction des voisins. La figure a été créée avec Seaview.



Santé
publique
France

Étude exploratoire en milieu hospitalier



Cas de colonisations et infections à *Enterobacter cloacae* résistant aux carbapénèmes par production de carbapénémases type IMI-1

Questionnaire d'investigation

Numéro du cas : ___

Données administratives

1. Patient

Initiales Nom / Prénom : ___ / ___

Sexe : M F

DDN : ___ / ___ / ___

Adresse :

Village et Commune de résidence :

Numéro de téléphone : _____

2. Médecin traitant

Nom :

Adresse :

Ou Centre de référence du CHM habituellement visité :

Dzaoudzi (Petite Terre)

Dzoumogne

Kahani

Mramadoudou

Dispensaire périphérique :

Prélèvement clinique ou dépistage positif à *Enterobacter cloacae* IMI-1

3. Conditions de détection de l'EPC IMI-1

Prélèvement clinique

→ Date de prélèvement positif : ___ / ___ / ___

OU

Dépistage BHRé

→ Type de dépistage : ECBU

Prélèvement rectal

Autres :

→ Date de prélèvement positif : ___ / ___ / ___

→ Raison du dépistage : Systématique dans le service

Autre :

4. Souches envoyées au CNR de la résistance aux antibiotiques : Oui Non

5. Contact avec un cas connu porteur d'EPC IMI-1 : Oui Non
 Numéro du cas contact connu : ____

6. Mesures mises en place lors de la découverte du cas EPC : Oui Non
 Date de mise en œuvre : __/__/____

Parcours d'hospitalisation du patient dans le cadre de la découverte d'une EPC IMI-1

7. Découverte d'une EPC IMI-1 au cours d'une hospitalisation au Centre Hospitalier de Mayotte
Notifier l'ensemble des services si mouvements

Service 1 :
 Dates d'entrée et de sortie du service : __/__/____ - __/__/____
 N° chambre : ____
 Motif hospitalisation :

Service 2 :
 Dates d'entrée et de sortie du service : __/__/____ - __/__/____
 N° chambre : ____
 Motif hospitalisation :

Service 3 :
 Dates d'entrée et de sortie du service : __/__/____ - __/__/____
 N° chambre : ____
 Motif hospitalisation :

Antécédents médicaux du patient

8. Antécédents médicaux (maladies chroniques, chirurgies)
 Oui Non
 Préciser :

9. Traitement antibiotique dans les 6 mois précédant le prélèvement positif
 Oui Non
 Préciser :

10. Hospitalisation au Centre Hospitalier de Mayotte ou dans les centres de référence du CHM dans l'année précédant le prélèvement positif
 Oui Non
 Service :
 Dates d'entrée et de sortie du service : __/__/____ - __/__/____
 Motif hospitalisation :

11. Recours aux soins de professionnels de santé libéraux (médecin, sage-femme, infirmier...)
 Oui Non
 Préciser :

Lien avec un pays étranger

12. Voyage, séjour, visite de la famille à l'étranger (ou retour au pays) :
 Oui Non
 Pays/Ville :
 Dates de séjour : __/__/____ - __/__/____
 Maladies au retour : Oui Non

13. Contact avec une/des personnes (mère, père, fratrie, amis, etc....) ayant voyagé à l'étranger
 Oui Non
 Pays/Ville :

Dates de séjour : __/__/____ - __/__/____

14. Antécédent d'hospitalisation dans un établissement de santé à l'étranger dans l'année précédant le prélèvement positif

Oui Non

Service :

Dates d'entrée et de sortie du service : __/__/____ - __/__/____

Motif hospitalisation :

Mode de vie

15. Profession

Sans profession / Femme ou Homme au foyer

Employé au CHM ou dans un centre de soin

→ Préciser :

Eleveur

Agriculteur

Jardinier

Pêcheur

Commerçant

Autre :

Lieu d'exercice de cette profession (Village et Commune) :

Profession impliquant un contact rapproché et régulier avec des animaux :

Oui Non

→ Préciser :

Profession impliquant un contact rapproché et régulier avec l'eau :

Oui Non

→ Préciser :

16. Habitat

Maison en tôle ou en terre

Maison en dur

17. Accès à l'eau pour les usages domestiques (boisson, lessive, baignade...)

Eau du réseau au domicile

Eau d'un bassin ou d'une rivière

→ Nom ou localisation du bassin ou de la rivière :

18. Contact étroit avec des animaux au domicile

Poules, volailles

Chats

Chiens

Chèvres

Zébus

Rats

Poissons

Crustacés

Autre :

19. Activités / loisirs pratiqués régulièrement

Oui Non

Type :

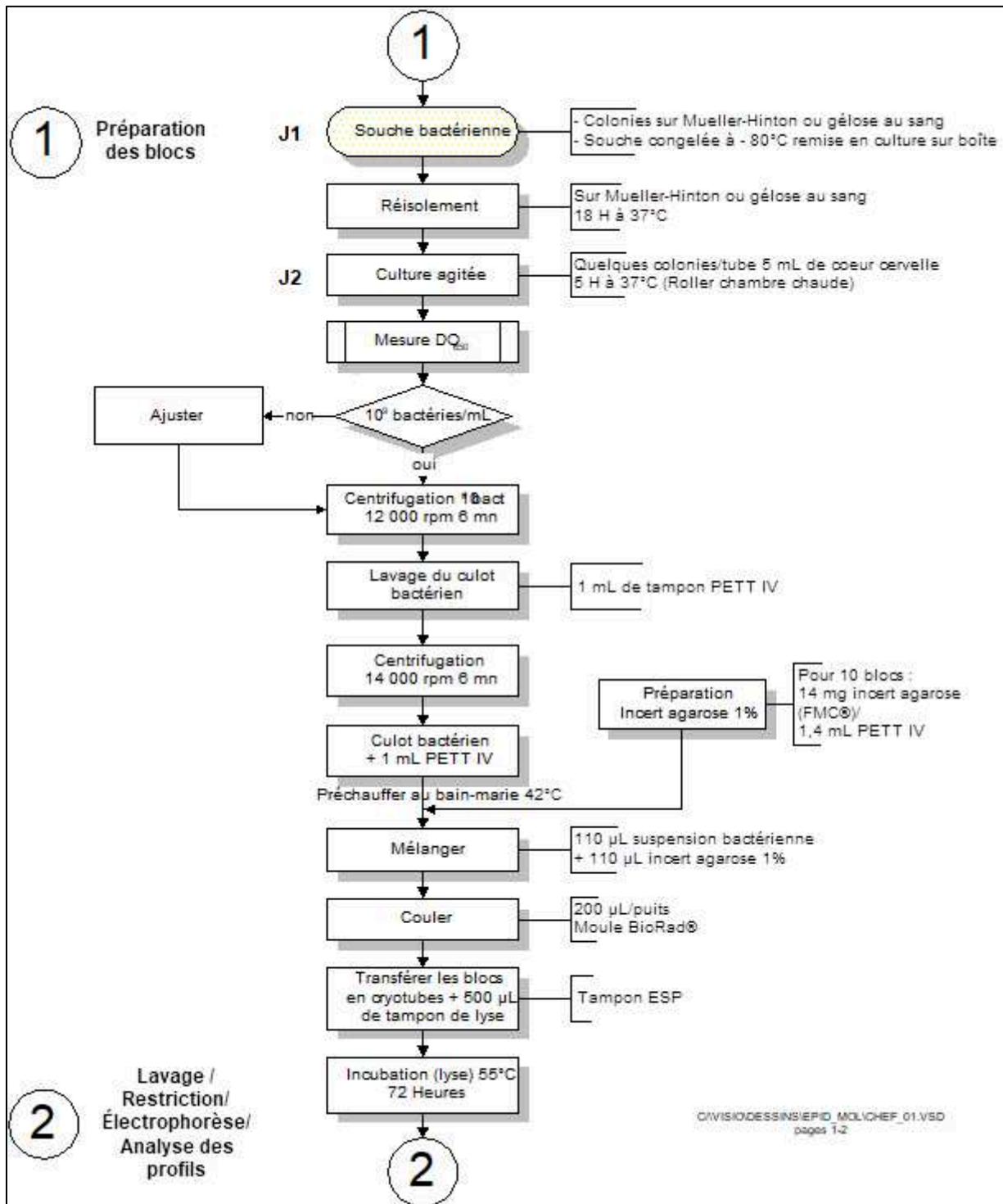
Lieu :

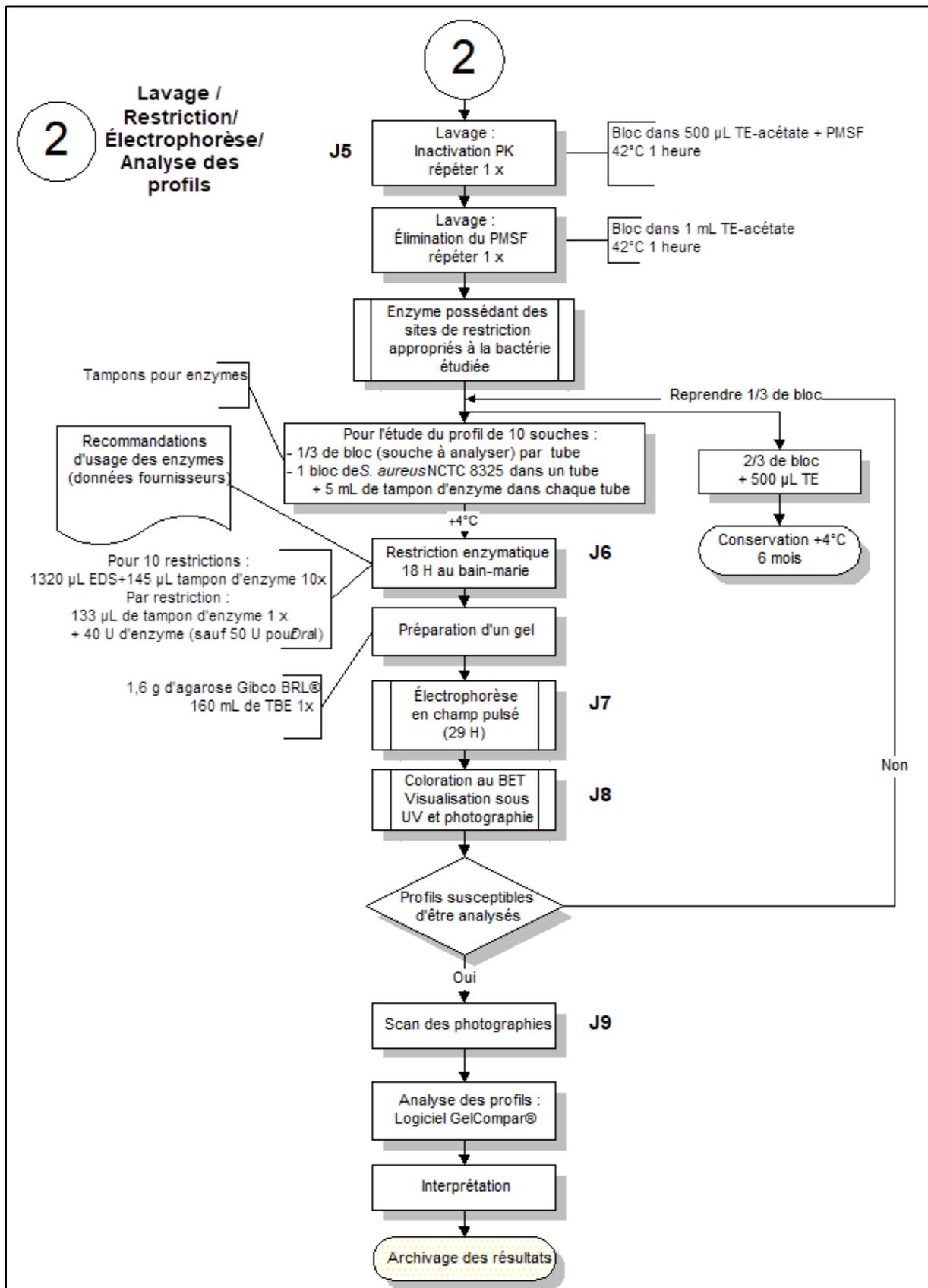
Date :

20. Habitudes alimentaires

Légumes	<input type="checkbox"/> Frais	<input type="checkbox"/> Mayotte	<input type="checkbox"/> Jumbo score
	<input type="checkbox"/> Surgelé	<input type="checkbox"/> Etranger	<input type="checkbox"/> Douka Be (Sodifram, Sodicash...)
		Préciser pays :	<input type="checkbox"/> Marché Mamoudzou
			<input type="checkbox"/> Marché autre :
			Préciser village
		
			<input type="checkbox"/> Production personnelle
			<input type="checkbox"/> Jumbo score
			<input type="checkbox"/> Douka Be (Sodifram, Sodicash...)
			<input type="checkbox"/> Marché Mamoudzou
			<input type="checkbox"/> Marché autre :
			Préciser village
		
			<input type="checkbox"/> Production personnelle
			<input type="checkbox"/> Jumbo score
			<input type="checkbox"/> Douka Be (Sodifram, Sodicash...)
			<input type="checkbox"/> Marché Mamoudzou
			<input type="checkbox"/> Marché autre :
			Préciser village
		
			<input type="checkbox"/> Production personnelle
			<input type="checkbox"/> Jumbo score
			<input type="checkbox"/> Douka Be (Sodifram, Sodicash...)
			<input type="checkbox"/> Marché Mamoudzou
			<input type="checkbox"/> Marché autre :
			Préciser village
		
			<input type="checkbox"/> Production personnelle
			<input type="checkbox"/> Jumbo score
			<input type="checkbox"/> Douka Be (Sodifram, Sodicash...)
			<input type="checkbox"/> Marché Mamoudzou
			<input type="checkbox"/> Marché autre :
			Préciser village
		
			<input type="checkbox"/> Production personnelle
			<input type="checkbox"/> Jumbo score
			<input type="checkbox"/> Douka Be (Sodifram, Sodicash...)
			<input type="checkbox"/> Marché Mamoudzou
			<input type="checkbox"/> Marché autre :
			Préciser village
			<input type="checkbox"/> Production personnelle

Annexe 4





Nom – Prénom : MILTGEN Guillaume
Thèse soutenue le : 3 juin 2021

Titre de la thèse :

Émergence et dynamique de diffusion des entérobactéries résistantes aux antibiotiques dans les DOM du Sud-Ouest de l’Océan Indien dans une approche *One Health*.

Résumé :

Les particularités biogéographiques et sanitaires des îles du Sud-Ouest l’Océan Indien représentent à la fois un défi pour la mise en place de politiques de Santé Publique et un contexte favorable à l’étude des émergences et diffusions comme celle des Bactéries Multi-Résistantes (BMR) ou des Bactéries Hautement Résistantes (BHR). À La Réunion, les souches d’Entérobactéries productrices de Bêta-Lactamase à Spectre Étendu (EBLSE) ou de Carbapénèmase (EPC) sont dépistées et surveillées dans le milieu hospitalier. Cependant, au début de ce travail, aucune donnée n’existait sur la diffusion de ces entérobactéries dans le milieu communautaire, ainsi que les interactions possibles entre les sphères environnementale, animale et humaine. De plus, les échanges commerciaux et les mouvements de populations importants entre La Réunion et les autres îles de l’Océan Indien (et notamment Mayotte), où ce phénomène d’antibiorésistance semble encore plus développé, expose l’île à des importations de ces bactéries.

Pour mieux appréhender l’émergence et la dynamique de diffusion des bactéries multi- ou hautement-résistantes, nous avons réalisé une étude *One Health* Homme-animal-environnement pour évaluer les échanges des souches de *Escherichia coli* productrices de BLSE entre ces différents compartiments.

Nous avons ainsi déterminé que les animaux de rente n’étaient pas un réservoir de transmission prépondérant de *E. coli* BLSE pour l’Homme à La Réunion, et que l’essentiel de ces transmissions était très probablement issu d’échanges inter-humains. Nous avons également réalisé un bilan des EPC en décrivant les modalités d’importation de ces BHR sur le territoire réunionnais. Nous avons enfin décrit certaines émergences comme une épidémie de *E. cloacae* IMI-1 à Mayotte qui s’est secondairement étendue à La Réunion. Nos résultats démontrent que le territoire réunionnais est un DOM où la prévalence des EPC est importante, notamment en raison d’une forte pression d’importation. Pour limiter ce phénomène, il est ainsi nécessaire d’établir une politique régionale coordonnée de lutte contre l’antibiorésistance dans cette zone géographique du Sud-Ouest de l’Océan Indien.

Mots clés : diffusion, entérobactéries, antibiorésistance, Réunion, Mayotte, *One Health*.