



HAL
open science

Epidémiologie des bacilles à Gram négatif dans la communauté, l'environnement et la nourriture

Daniel Martak

► **To cite this version:**

Daniel Martak. Epidémiologie des bacilles à Gram négatif dans la communauté, l'environnement et la nourriture. Microbiologie et Parasitologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCE006 . tel-03698738

HAL Id: tel-03698738

<https://theses.hal.science/tel-03698738v1>

Submitted on 19 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.



Thèse de doctorat de l'établissement Université de Bourgogne Franche-Comté

Préparée au Laboratoire Chrono-environnement – UMR 6249 CNRS

Présentée par

Daniel MARTAK

Epidémiologie des bacilles à Gram négatif dans la communauté, l'environnement et la nourriture

Ecole doctorale n°554

Ecole doctorale Environnements – Santé

Doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée et soutenue le 18 juin 2021 à Besançon

Membres du jury

Dr. Marisa Haenni	Anses Lyon	Rapporteur
Dr. Christophe Merlin	Université de Lorraine	Rapporteur
Pr. Anne-Marie Rogues	Université de Bordeaux	Examinateur
Pr. Christophe Dagot	Université de Limoges	Examinateur
Pr. Didier Hocquet	Université de Bourgogne Franche-Comté	Directeur de thèse
Pr. Xavier Bertrand	Université de Bourgogne Franche-Comté	Directeur de thèse

**Epidémiologie des bacilles à Gram négatif dans la communauté,
l'environnement et la nourriture**

Daniel Martak

Remerciements

J'aimerais remercier le Dr. Marisa Haenni et le Dr. Christophe Merlin, rapporteurs de cette thèse, d'avoir pris le temps de juger mon travail. Je remercie également le Pr. Anne-Marie Rogues et le Pr. Christophe Dagot d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

En repensant à ces années de thèse et à ces années universitaires, énormément de souvenirs me viennent en tête... Aussi bien au labo qu'en dehors, vous êtes nombreux à avoir marqué ces années.

Tout d'abord, un grand merci à mes deux directeurs de thèse, le Pr. Didier Hocquet et le Pr. Xavier Bertrand. J'ai rejoint le service d'Hygiène Hospitalière pour mon stage de Master 1 et aujourd'hui, me voilà en train d'écrire les derniers mots de ma thèse. Merci donc de m'avoir fait confiance et de m'avoir confié ces projets. Didier, un grand merci pour ta disponibilité, tes conseils et ton aide durant toute la durée de la thèse. Et surtout, merci à vous deux pour tous ces bons moments au labo, des discussions culturelles, sportives et musicales aux jeux de mots, blagues, et anecdotes qui ont rythmé cette thèse dans la bonne humeur.

Un grand merci à mon frère, ma sœur et surtout à mes parents pour leur soutien tout au long de mes études et sans qui je n'aurais probablement pas atterri en thèse. Merci également à ma belle-famille, qui se demande toujours si je suis un chercheur qui trouve des trucs ou non...

J'aimerais remercier toutes les personnes qui m'ont aidé ou avec qui j'ai pu collaborer pendant ces années et qui ont rendu les choses plus faciles, plus enrichissantes et plus sympas. Alex M., pour ces heures de manip et de prélèvements dans les pâturages, les rivières, à raconter n'importe quoi les pieds dans la flotte. Benoit, pour ton aide et tes conseils en bioinfo. Je remercie également tous les collègues du laboratoire d'Hygiène Hospitalière et tous ceux des autres laboratoires : Marilou, Laurent, Alex T., Amélie, Pascal, Laurence, Marlène, Solène, Marion, Antonella, Lucas, Steffi, Guillaume, Julien, Audrey, Chantal, Charlotte, les Catherine, les Véro, les stagiaires... Je ne peux pas tous vous citer, vous êtes beaucoup trop, ou alors j'ai passé beaucoup de temps au café... Merci à tous pour ces moments de rire et toutes ces discussions autour d'un café, d'un repas, d'une bière.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont été là pendant toutes ces années. A commencer par toi Amélie, toujours débordante de joie pour pimenter chacune de mes journées. Je ne pourrai pas non plus citer tous les copains mais quelques-uns quand même : je pense aux collègues doctorants notamment, Camille, Charles, Philippe, que les soirées furent bonnes. A parler de science. Enfin au début... Mais également à ceux avec qui les années universitaires ont débuté : Lucas pour cette coloc de haut vol, Alex D. pour ces premiers semestres de grand n'importe quoi, puis tous les autres pour tous les moments incroyables : Jérémie (la Ub), Val, Trilhe, Quentin, Romain, Patou, Sam, Jean, Thomas, Raguin, Max, Kevin, Etienne... L'écriture de vos noms refait surgir une multitude de souvenirs à m'en faire rire devant mon document Word. Ceux qui me connaissent l'auront compris, j'aime m'amuser. Donc merci à tous de m'avoir permis de travailler et de mener cette thèse au bout tout en m'amusant.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES PUBLICATIONS.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS.....	12
LISTE DES FIGURES.....	14
LISTE DES TABLEAUX.....	17
1. INTRODUCTION.....	19
2. APPORTS DU SEQUENCAGE HAUT-DEBIT EN EPIDEMIOLOGIE BACTERIENNE.....	23
2.1 Introduction.....	23
2.1.1 Techniques moléculaires de typage bactérien.....	23
2.1.2 Séquençage de l'ADN et assemblage des données brutes.....	25
2.1.3 Analyses phylogénétiques.....	26
2.1.4 Applications cliniques.....	27
2.1.5 Autres applications.....	28
2.1.6 Limites du WGS.....	30
2.1.7 Objectifs de l'étude.....	31
2.2 Résultats.....	32
2.2.1 La comparaison du PFGE et du WGS confirme la précision du PFGE pour le typage des épidémies locales liées à <i>P. aeruginosa</i>	32
3. DIFFUSION DES ENTEROBACTERIES DANS LA COMMUNAUTE, L'ENVIRONNEMENT ET LA NOURRITURE.....	39
3.1 Introduction.....	39
3.1.1 Le concept <i>One Health</i>	39
3.1.2 Supports génétiques et transfert de la résistance.....	41
3.1.3 Les BLSE et leur dissémination.....	48
3.1.4 Généralités sur <i>E. coli</i>	50
3.1.5 Généralités sur <i>K. pneumoniae</i>	51
3.1.6 Epidémiologie hospitalière de <i>E. coli</i> et <i>K. pneumoniae</i>	53
3.1.7 Epidémiologie communautaire des EBLSE.....	54
3.1.8 Diffusion environnementale des bactéries pathogènes et résistantes.....	55
3.1.9 Diffusion des EBLSE chez les animaux de rente et dans la nourriture.....	59
3.1.10 Origine des EBLSE infectant ou colonisant l'humain.....	61
3.1.11 Objectifs des études.....	64

3.2	Résultats.....	66
3.2.1	Comparaison des populations d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE dans l'environnement pollué par l'homme et dans la nourriture : une étude multicentrique européenne	66
3.2.2	Diffusion d' <i>E. coli</i> dans les environnements peu anthropisés	82
4.	COLONISATION INTESTINALE DES RESIDENTS D'ETABLISSEMENTS DE LONG SEJOUR PAR <i>P. AERUGINOSA</i>	91
4.1	Introduction	91
4.1.1	Généralités sur <i>P. aeruginosa</i>	91
4.1.2	Mécanismes de résistance aux antibiotiques	92
4.1.3	Structure de la population	96
4.1.4	Succès des clones à haut risque.....	98
4.1.5	Epidémiologie hospitalière.....	99
4.1.6	Diffusion communautaire.....	101
4.1.7	Objectifs de l'étude	101
4.2	Résultats.....	102
4.2.1	Forte prévalence de portage de <i>P. aeruginosa</i> et grande diversité génétique chez les résidents de 20 établissements de long séjour français et allemands.	102
5.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	127
5.1	Epidémiologie bactérienne et WGS	127
5.1.1	Le WGS dans le paysage du typage bactérien	127
5.1.2	Choix du seuil et standardisation des méthodes.....	128
5.2	Diffusion des bacilles à Gram négatif	131
5.2.1	Diffusion dans la communauté.....	131
5.2.2	La diffusion des BLSE dans une approche <i>One Health</i>	135
5.2.3	Le concept <i>One Health</i> : l'importance d'une vue globale.....	144
6.	CONCLUSION.....	147
7.	MATERIEL ET METHODES.....	149
7.1	Design des études	149
7.1.1	Projet MODERN	149
7.1.2	Colonisation de résidents d'EHPADs par <i>P. aeruginosa</i>	149
7.1.3	Diffusion d' <i>E. coli</i> dans les environnements peu anthropisés	150
7.2	Echantillonnage et culture	152
7.2.1	Echantillons de selles	152
7.2.2	Echantillons de nourriture	152

7.2.3	Environnement pollué par l'Homme.....	152
7.2.4	Zones humides et rivières associées.....	154
7.2.5	Conservation des isolats.....	155
7.3	Recueil de données et analyse des facteurs de risque.....	155
7.4	Caractérisation phénotypique des souches.....	159
7.4.1	Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	159
7.4.2	Antibiogrammes.....	159
7.4.3	Tests de synergies.....	160
7.5	Techniques de biologie moléculaire.....	161
7.5.1	Extractions d'ADN.....	161
7.5.2	PCR et amorces.....	161
7.5.3	Détermination des phylogroupes <i>d'E. coli</i>	163
7.5.4	Identification des gènes <i>bla_{BLSE}</i>	163
7.5.5	Vérification et purification des produits PCR.....	163
7.5.6	Séquençage par la méthode de Sanger.....	163
7.5.7	Séquençage Illumina.....	164
7.6	Traitement des données de séquençage.....	164
7.6.1	Gènes associés à la résistance.....	164
7.6.2	MLST.....	165
7.6.3	Détermination des phylogroupes <i>d'E. coli in silico</i>	165
7.6.4	Assemblage <i>de novo</i>	165
7.6.5	Phylogénie.....	165
7.6.6	Plasmides.....	166
8.	TRAVAUX COMPLEMENTAIRES.....	169
8.1	Typage rapide de bacilles à Gram-négatif responsables d'épidémies hospitalières par spectroscopie FTIR.....	169
8.1.1	Résumé.....	169
8.2	Projet MODERN.....	180
8.2.1	Résumé et objectifs de l'étude.....	180
8.2.2	Acquisition et transmission d'EBLSE dans les foyers après la sortie de l'hôpital de patients index positifs à l'ESBL.....	180
8.3	Contamination des zones humides des plaines alluviales du Doubs, de la Loue et de l'Ain par <i>K. pneumoniae</i> et <i>E. coli</i> pathogènes ou résistants aux antibiotiques.....	190
9.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	205

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications principales

- **Martak D.**, Gbaguidi-Haoré H., Meunier A., Valot B., Conzelmann N., Eib M., Autenrieth I.B., Slekovec C., Tacconelli E., Bertrand X., Peter S., Hocquet D., Guther J. High prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* carriage in residents of French and German long-term care facilities. En attente de soumission.
- **Martak D.**, Guther J., Verschuuren T.D., Valot B., Conzelmann N., Bunk S., Riccio M.E., Salamanca E., Meunier A., Henriot C.P., Brossier C.P., Bertrand X, Cooper B.S., Harbarth S., Tacconelli E., Fluit A.C., Rodriguez-Baño J., Kluytmans J.A.J.W., Peter S., Hocquet D., on behalf of the MODERN WP3 study group. Populations of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are different in human-polluted environment and food items: A multicentre European study. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.07.022>
- **Martak, D.**, Henriot, C.P., Broussier, M., Couchoud, C., Valot, B., Richard, M., Couchot, J., Bornette, G., Hocquet, D., Bertrand, X., 2020. High Prevalence of Human-Associated *Escherichia coli* in Wetlands Located in Eastern France. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.552566>
- **Martak, D.**, Meunier, A., Sauget, M., Cholley, P., Thouverez, M., Bertrand, X., Valot, B., Hocquet, D., 2020. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and whole-genome-sequencing-based typing confirms the accuracy of pulsed-field gel electrophoresis for the investigation of local *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks. *Journal of Hospital Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.06.013>
- Riccio, M.E., Verschuuren, T., Conzelmann, N., **Martak, D.**, Meunier, A., Salamanca, E., Delgado, M., Guther, J., Peter, S., Paganini, J., Martischang, R., Sauser, J., de Kraker, M.E.A., Cherkaoui, A., Fluit, A.C., Cooper, B.S., Hocquet, D., Kluytmans, J.A.J.W., Tacconelli, E., Rodriguez-Baño, J., Harbarth, S., Brossier, C., von Dach, E., Renzi, G., Schrenzel, J., Bunk, S., Goepel, S., Hölzl, F., Eib, M., Autenrieth, I.B., Pascual, Á., Bertrand, X., Scharringa, J., Musicha, P., 2021. Household acquisition and transmission of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* after hospital discharge of ESBL-positive index patients. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.024>

Autres publications

- **Martak, D.**, Valot, B., Sauget, M., Cholley, P., Thouverez, M., Bertrand, X., Hocquet, D., 2019. Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy Can Quickly Type Gram-Negative Bacilli Responsible for Hospital Outbreaks. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01440>
- Henriot C.P., **Martak D.**, Dagot C., Petit F., Topp E., Bertrand X., Bornette G., Hocquet D., 2021. The fate of antibiotic-resistant bacteria in the environment. *Accepté pour publication dans le livre : Emerging Contaminants Vol. 1 - Occurrence and Impact*. Springer Nature. ISBN : 978-3-030-69078-6.
- Henriot, C.P., **Martak, D.**, Cuenot, Q., Loup, C., Masclaux, H., Gillet, F., Bertrand, X., Hocquet, D., Bornette, G., 2019. Occurrence and ecological determinants of the contamination of floodplain wetlands with *Klebsiella pneumoniae* and pathogenic or antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz097>
- Miltgen, G., Cholley, P., **Martak, D.**, Thouverez, M., Seraphin, P., Leclaire, A., Traversier, N., Roquebert, B., Jaffar-Bandjee, M.-C., Lugagne, N., Cimon, C.B., Ramiandrisoa, M., Picot, S., Lignereux, A., Masson, G., Allyn, J., Allou, N., Mavingui, P., Belmonte, O., Bertrand, X., Hocquet, D., 2020. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* circulating in the Reunion Island, a French territory in the Southwest Indian Ocean. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-0703-3>
- Miltgen, G., Bonnin, R.A., Avril, C., Benoit-Cattin, T., **Martak, D.**, Leclaire, A., Traversier, N., Roquebert, B., Jaffar-Bandjee, M.-C., Lugagne, N., Filleul, L., Subiros, M., de Montera, A.-M., Cholley, P., Thouverez, M., Dortet, L., Bertrand, X., Naas, T., Hocquet, D., Belmonte, O., 2018. Outbreak of IMI-1 carbapenemase-producing colistin-resistant *Enterobacter cloacae* on the French island of Mayotte (Indian Ocean). *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.05.015>
- Petitjean, M., **Martak, D.**, Silvant, A., Bertrand, X., Valot, B., Hocquet, D., 2017. Genomic characterization of a local epidemic *Pseudomonas aeruginosa* reveals specific features of the widespread clone ST395. *Microbial Genomics*. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000129>

LISTE DES ABREVIATIONS

AAC : Aminoside acétyltransférase
ADN : Acide désoxyribonucléique
ANT : Aminoside nucléotidyltransférase
APH : Aminoside phosphotransférase
BET : Bromure d'éthidium
BGN : Bacille à Gram négatif
BioNJ : Bio *neighbor joining*
BLAST : *Basic local alignment search tool*
BLSE : β -lactamase à spectre étendu
BMR : Bactérie multi-résistante
C3G : Céphalosporine de 3ème génération
cgMLST : Core genome MLST
CTX-M : Céfotaximase-Munich
ddNTP : Didésoxyribonucléotide triphosphate
dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate
DPMT : *Degenerate primer MOB typing*
EBLSE : Entérobactérie productrice de BLSE
Ec-BLSE : *Escherichia coli* producteur de BLSE
EEE : Espace économique européen
ENA : *European nucleotide archive*
EPC : Entérobactéries productrices de carbapénémases
GTR : *General time reversible*
HCCA : α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
HKY85 : Hasegawa-Kishino-Yano, 1985
ICE : *Integrative and conjugative element*
Inc : Incompatibilité
IPP : Inhibiteur de pompes à protons
IRL : *Inverted Repeat Left*
IRR : *Inverted Repeat Right*
IS : *Insertion sequence*
Kb : Kilobases
LPS : Lipopolysaccharide
MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*
MBL : Métallo- β -lactamase
McF : McFarland
MDR : *Multi-drug resistant*
MH : Mueller-Hinton
MLST : *Multi-Locus Sequence Typing*
Mpb : Million(s) de paires de bases
NY : New York
PacBio : Pacific Biosciences

pAmpC : AmpC plasmidique
Pb : paire de bases
PBRT : *PCR-based replicon typing*
PCR : *Polymerase chain reaction*
PCU : *Population correction unit*
RDD : Rapprochement de disques
RND : *Resistance-nodulation-division*
SARM : Staphylococcus aureus résistant à la mécilline
SHA : Solution hydroalcoolique
SNP : *Single nucleotide polymorphism*
SRA : *Sequence read archive*
ST : *Sequence type*
STEU : Station de traitement des eaux usées
THG : Transfert horizontal de gènes
UE : Union Européenne
UFC : Unités formant colonies
USA : *United States of America*
UV : Ultraviolet
wgMLST : *Whole genome MLST*
WGS : *Whole genome sequencing*
XDR : *Extensively drug-resistant*

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Nombre de publications mentionnant le PFGE ou le WGS entre 1990 et 2020.....	24
Figure 2. Représentation schématique des différentes étapes du séquençage Illumina	25
Figure 3. Principe du séquençage : de l'ADN jusqu'aux contigs.....	26
Figure 4. Arbre phylogénétique de 72 souches d' <i>Escherichia</i> représentant le genre dans son ensemble.....	30
Figure 5. Le concept <i>One Health</i>	39
Figure 6. Schéma simplifié des voies potentielles de dissémination des antibiotiques et de la résistance aux antibiotiques chez les humains, les animaux et dans l'environnement.....	40
Figure 7. Différents modes d'actions des antibiotiques	41
Figure 8. Mécanismes de transfert horizontal des gènes.....	44
Figure 9. Schéma d'une IS et d'un transposon.....	45
Figure 10. Structure d'un intégron	47
Figure 11. Schéma du cycle de vie d'un ICE	48
Figure 12. Pourcentage d'isolats de <i>E. coli</i> invasifs résistants aux C3G, par pays de UE/EEE, en 2009, 2015 et en 2019	52
Figure 13. Différents types de zones humides	57
Figure 14. Ventes totales d'antimicrobiens en médecine vétérinaire pour les animaux servant à produire des aliments, en mg/PCU, par pays, de 2010 à 2017.....	61
Figure 15. Prévalence des isolats de <i>E. coli</i> producteurs de BLSE et de pAmpC dans chaque source et probabilité d'exposition de la communauté à chaque source	63
Figure 16. Dépression du gène <i>ampC</i> liée à une mutation dans le gène <i>ampD</i>	94
Figure 17. Diagramme de la population de <i>P. aeruginosa</i> à partir des 2106 STs disponibles au 03/06/2015 sur la base de données PubMLST	96
Figure 18. Arbre phylogénétique de l'espèce <i>P. aeruginosa</i> divisée cinq groupes	97
Figure 19. Carte de la distribution mondiale (A) et Européenne (B) des clones à haut risque ST111, ST175 et ST235	99
Figure 20. Résumé des principales caractéristiques des clones à haut risque majeurs	100

Figure 21. Composition globale du microbiote.....	134
Figure 22. Distribution des STs et des gènes de résistance par réservoir et par ville	139
Figure 23. Projets menés au cours du doctorat.....	151
Figure 24. Emplacement des trois points de prélèvements de l'environnement à Besançon (France) pour le projet MODERN.....	153
Figure 25. Emplacement des 16 zones humides de l'étude.....	154
Figure 26. Principe de l'acquisition des spectres par spectrométrie de masse MALDI-TOF..	159

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principales classes d'antibiotiques, modes d'action, cibles et mécanismes de résistance les plus fréquents	42
Tableau 2. Classification des β -lactamases selon la classification d'Ambler.....	49
Tableau 3. Principaux gènes appartenant au <i>core genome</i> dont les mutations sont responsables d'une augmentation de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i>	95
Tableau 4. Caractéristiques des 18 EHPADs de la cohorte I.	156
Tableau 5. Caractéristiques des 262 résidents de la cohorte I en fonction de leur statut de porteur digestif de <i>P. aeruginosa</i>	157
Tableau 6. Caractéristiques des trois EHPADs de la cohorte II.....	157
Tableau 7. Caractéristiques des 167 résidents de la cohorte II en fonction de leur statut de porteur digestif de <i>P. aeruginosa</i>	158
Tableau 8. Liste des différents antibiotiques testés sur les trois espèces bactériennes	160
Tableau 9. Liste des amorces utilisées lors des différents projets.....	162

1. INTRODUCTION

Les bactéries sont omniprésentes dans le monde et dans tous les écosystèmes, qu'ils soient aquatiques, terrestres ou encore associés à des hôtes. On estime aujourd'hui à plus de mille milliards le nombre d'espèces bactériennes présentes sur Terre¹. Un nombre important d'espèces bactériennes cohabitent et interagissent donc au sein des différents écosystèmes. Cette omniprésence des bactéries s'accompagne depuis toujours d'infections des différentes espèces animales et végétales peuplant la planète. Ces infections bactériennes ont d'ailleurs pendant longtemps été la première cause de décès chez les humains^{2,3}. La durée de vie des Hommes a ainsi considérablement augmenté depuis que les infections bactériennes sont traitées par les antibiotiques. L'accès à la pénicilline dans les années 1940 a drastiquement réduit la morbidité et la mortalité des maladies infectieuses bactériennes. De nombreuses molécules antibiotiques ont progressivement été découvertes, jusqu'aux années 1970 où le nombre de nouvelles molécules a commencé à diminuer⁴. Parallèlement à l'utilisation massive des antibiotiques, la résistance aux antimicrobiens a émergé et s'est rapidement développée pour devenir aujourd'hui un problème de santé publique majeur. Il a été estimé que dans l'Union Européenne (UE), entre 2007 et 2015, le nombre d'infections liées aux bactéries résistantes aux antibiotiques avait augmenté, passant d'environ 240 000 à 603 000⁵.

Une bactérie est dite résistante à un antibiotique lorsqu'elle peut se développer et se multiplier en présence de cet antibiotique. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques existent en revanche depuis toujours⁶. La compétition entre espèces existe dans tous les écosystèmes et la majorité des agents antimicrobiens sont produits naturellement par des micro-organismes. Certaines espèces bactériennes ont donc développé des mécanismes de résistance pour échapper à la destruction par certaines molécules toxiques⁷. Ces mécanismes consistent souvent à empêcher l'entrée du composé toxique dans la cellule ou à produire une enzyme pour le dégrader⁷. En médecine humaine, la résistance bactérienne a fortement augmenté du fait de la pression de sélection engendrée par des décennies d'utilisation massive des antibiotiques⁸. Celle-ci se caractérise par la sélection, le plus souvent par un antibiotique, d'une sous-population bactérienne ayant développé un mécanisme de résistance et pour laquelle la molécule n'aura aucun effet. Une bactérie peut développer des mécanismes de résistance via l'apparition de mutations ou par l'acquisition de nouveaux gènes. Dans les deux cas, ces événements lui confèrent un avantage sélectif. Les mécanismes de résistance les plus fréquemment observés sont la production d'une enzyme dégradant l'antibiotique, la modification de la cible de l'antibiotique et la réduction de la concentration cytoplasmique de

l'antibiotique (liée à une réduction de la perméabilité membranaire ou à la surproduction des pompes d'efflux)⁹.

Dans les établissements de santé, les infections nosocomiales sont fréquentes. L'enquête de prévalence des infections nosocomiales réalisée en France en 2017 montrait que 5% des patients hospitalisés avaient une infection nosocomiale active¹⁰. En France, les cinq espèces bactériennes les plus fréquemment responsables d'infections nosocomiales sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*¹⁰. Ces espèces bactériennes peuvent résister à un large panel d'antibiotiques, rendant le traitement des patients plus difficile. Les cas les plus extrêmes peuvent mener à une impasse thérapeutique, où plus aucune molécule ne permet de traiter efficacement l'infection du patient^{11,12}. Bien que largement décrites dans les systèmes de soins, les bactéries multi-résistantes (BMR) diffusent aussi largement dans la communauté¹³. Depuis quelques années, cette diffusion communautaire fait l'objet d'une investigation rigoureuse, visant à identifier les voies de transmission entre les humains, les animaux, la nourriture et l'environnement. Le concept *One Health* ('une seule santé', en français) soutient l'idée que les populations bactériennes des différents réservoirs sont interconnectées¹⁴. Parmi les bactéries les plus préoccupantes, les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), notamment *E. coli* et *K. pneumoniae*, ont largement diffusé ces dernières années, à la fois chez l'Homme mais aussi chez les animaux et dans l'environnement. Le nombre d'infections liées aux entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE) a explosé dans les années 2000 et a continué d'augmenter après 2010¹⁵. D'après le réseau de surveillance européen de la résistance aux antimicrobiens, le pourcentage moyen d'*E. coli* résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) (majoritairement due aux BLSE) rapporté à la population est passé de 11,8% en 2012 à 14,9% en 2017. Cette hausse de la résistance aux C3G a conduit à une plus forte utilisation des carbapénèmes, antibiotiques souvent considérés comme molécules de dernier recours¹².

Certains aliments, notamment la viande provenant des animaux de rente, sont souvent contaminés par des EBLSE et ont été suggérés comme une possible voie d'acquisition majeure par les humains. La compréhension des voies d'acquisition des EBLSE mais également d'autres bacilles à Gram négatif (BGN) pathogènes et souvent résistants comme *P. aeruginosa* est essentielle pour endiguer l'augmentation de la résistance aux antibiotiques. Par exemple, les personnes âgées sont plus à risque de développer des bactériémies à *P. aeruginosa*¹⁶ mais l'origine de la contamination n'est pas forcément hospitalière et n'est pour l'instant pas connue.

Les techniques de séquençage haut-débit rendent désormais possible l'analyse fine des génomes bactériens par le séquençage des génomes complets (WGS). Les données de séquençage permettent notamment de caractériser les populations bactériennes, les gènes de résistance ou encore les plasmides¹⁷ et ainsi de mieux comprendre les voies d'acquisition et les dynamiques de transmission d'isolats bactériens dans un réservoir (d'humain à humain) ou entre des réservoirs (de la nourriture aux humains).

Dans ce manuscrit, nous aborderons tout d'abord l'apport du WGS en épidémiologie bactérienne. Nous détaillerons ensuite différents projets visant à comprendre l'épidémiologie de trois BGN : *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*.

La première partie de ce manuscrit comparera le typage bactérien par WGS avec l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) pour la caractérisation d'isolats de *P. aeruginosa* épidémiques. La seconde partie, basée sur le concept *One Health*, (i) caractérisera les isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE (Ec-BLSE) et de *K. pneumoniae* producteurs de BLSE (Kp-BLSE) collectés dans l'environnement pollué par l'Homme et dans la nourriture afin de définir si la nourriture est une source d'acquisition d'EBLSE pour l'Homme et (ii) définira l'origine d'isolats d'*E. coli* collectés dans des zones peu anthropisées. Enfin, une troisième partie s'intéressera à la prévalence de portage digestif et à la structure de la population d'isolats de *P. aeruginosa* provenant du microbiote de personnes âgées séjournant dans des établissements de long séjour.

2. APPORTS DU SEQUENCAGE HAUT-DEBIT EN EPIDEMIOLOGIE BACTERIENNE

2.1 Introduction

Le typage bactérien est utilisé depuis de nombreuses années en épidémiologie pour comprendre les liens entre les isolats bactériens, la diffusion des épidémies ou encore la structure des populations bactériennes. Le séquençage de génome complet (WGS) est aujourd'hui devenu la méthode de référence pour le typage bactérien car il possède le niveau de finesse le plus fin pour la comparaison des génomes bactériens.

2.1.1 Techniques moléculaires de typage bactérien

Il existe beaucoup de techniques de typage bactérien. Nous traiterons ici uniquement les techniques moléculaires les plus utilisées pour typer les BGN : le sérotypage, le typage par *multi-locus sequence typing* (MLST), l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et le *whole genome sequencing* (WGS).

La MLST examine les variations des séquences nucléotidiques de gènes de ménage qui encodent des fonctions bactériennes conservées. La technique consiste à déterminer les allèles de généralement sept (cinq à dix en fonction des espèces) gènes de ménage, définis en fonction de l'espèce bactérienne étudiée. Un numéro est associé à chaque allèle pour chacun des sept gènes. La combinaison d'allèles permet ensuite d'obtenir le ST¹⁸.

L'électrophorèse en champ pulsé ou PFGE produit des profils de restriction de l'ADN bactérien. L'ADN de chaque bactérie est digéré par des enzymes de restriction puis déposé sur gel. La migration de l'ADN bactérien par électrophorèse sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. La comparaison des profils de restriction obtenus définit alors le degré de proximité entre les isolats bactériens¹⁹. Des critères de *clustering* basés sur les profils de restrictions des génomes bactériens ont été définis en 1995. On considère ainsi que deux isolats dont les génomes ont des profils de restriction ≤ 3 bandes de différences appartiennent au même pulsotype²⁰. Bien que très discriminante, cette technique est chronophage, laborieuse et sa reproductibilité inter-laboratoire est généralement mauvaise.

Dans ce contexte, le WGS a pu s'imposer facilement comme méthode de référence. Le WGS offre en effet des avantages évidents comparé aux autres méthodes de typage. Plutôt que d'analyser uniquement sept gènes comme en MLST, on peut s'intéresser à la totalité des gènes

composant le génome bactérien. De plus, les données produites sont facilement stockables et échangeables, facilitant ainsi l'analyse de quantités importantes de données par n'importe quel laboratoire. Ces échanges de données permettent de traquer certains pathogènes à travers les villes, les régions et même le monde. La comparaison des données inter-laboratoire est facilitée par l'exportabilité des données, ce qui constitue un avantage majeur par rapport au PFGE. Logiquement, le nombre de publications scientifiques mentionnant le WGS a augmenté au cours des dernières années tandis que celles mentionnant le PFGE a largement diminué depuis 2010 (Figure 1).

Le WGS possède un second avantage majeur par rapport aux autres méthodes de typage. Les données de séquençage permettent également d'identifier les gènes de résistance aux antibiotiques intrinsèques ou acquis, les gènes de virulence ou encore les réplicons plasmidiques¹⁷.

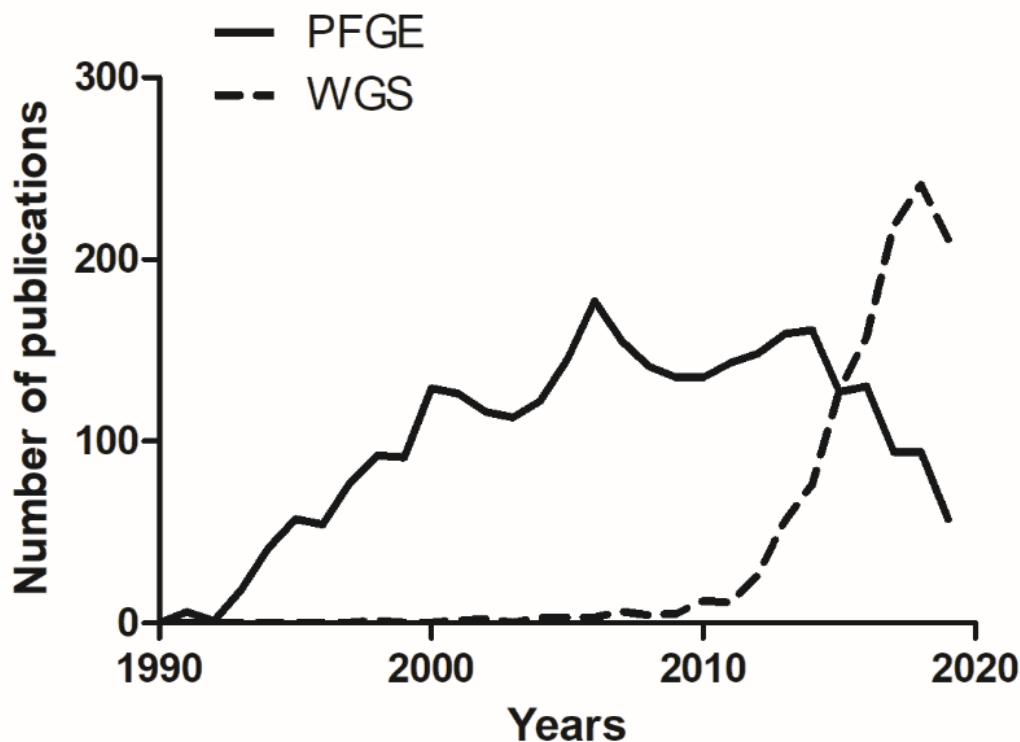


Figure 1. Nombre de publications mentionnant le PFGE ou le WGS entre 1990 et 2020. Données extraites de PubMed en recherchant les publications publiées entre 1990 et 2020 et avec les termes "whole genome sequencing outbreak bacteria" (lignes pointillées) ; ou avec les termes "pulsed-field gel electrophoresis outbreak bacteria" (ligne noire).

2.1.2 Séquençage de l'ADN et assemblage des données brutes

Les techniques de séquençage ont rapidement évolué ces dernières années. Aujourd'hui, les plateformes de séquençage les plus connues et les plus utilisées sont les plateformes Illumina, la plateforme Pacific Biosciences (PacBio) et les technologies Oxford Nanopore. Le séquençage PacBio et le séquençage nanopore sont des techniques qui synthétisent des brins d'ADN de tailles importantes sans amplification préalable par PCR mais qui introduisent plus d'erreurs que la technologie Illumina. Les techniques PacBio et Oxford Nanopore ont pour avantage de faciliter la reconstitution des génomes entiers^{21,22}. Le séquençage Illumina est aujourd'hui la technique la plus utilisée¹⁷. Pour séquencer le génome d'un isolat bactérien, l'ADN génomique est extrait puis fragmenté. Des adaptateurs sont ensuite fixés aux fragments d'ADN leur permettant d'être fixés sur une plaque. Une fois fixés, les fragments d'ADN vont être amplifiés pour générer des clusters de fragments d'ADN identiques. S'en suit alors une étape de séquençage avec des nucléotides marqués qui émettent une fluorescence spécifique lorsqu'ils sont incorporés. Les différentes étapes de la technique Illumina sont illustrées sur la Figure 2.

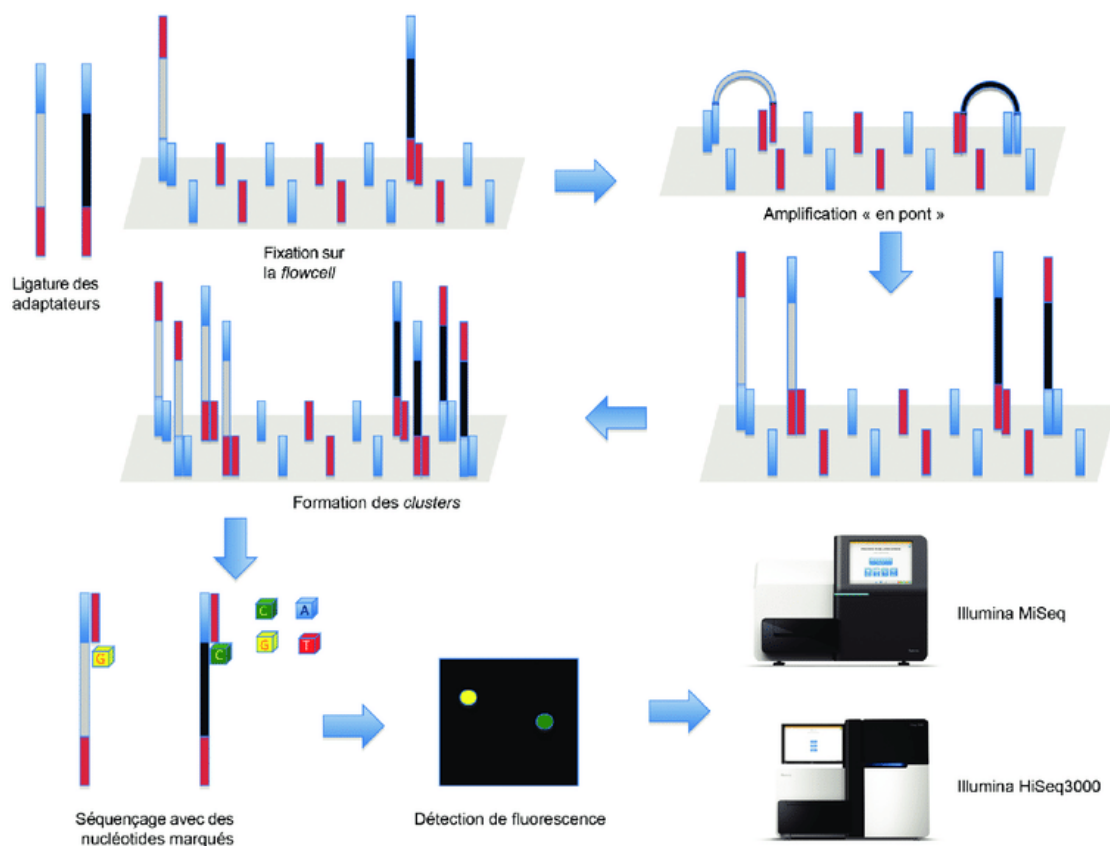


Figure 2. Représentation schématique des différentes étapes du séquençage Illumina. D'après Bonnin *et al*²³.

Le séquençage Illumina génère des séquences courtes de quelques centaines de pb (*reads*) pouvant être directement analysées. Beaucoup d'analyses nécessitent néanmoins d'assembler les données brutes en séquences plus longues appelées *contigs*. Il existe différents programmes d'assemblage des séquences d'ADN, comme par exemple SPAdes²⁴. Les différentes étapes de l'assemblage des séquences brutes sont résumées sur la Figure 3.

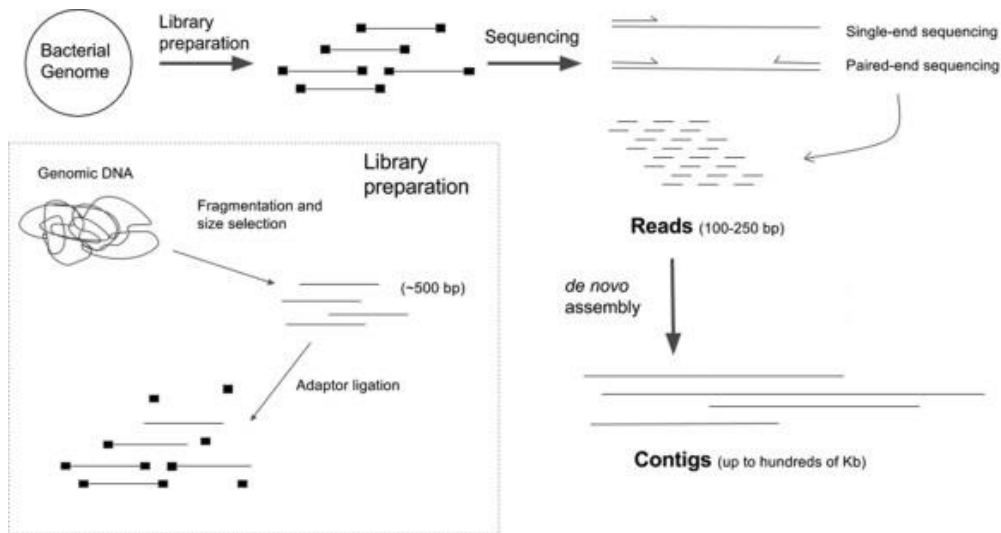


Figure 3. Principe du séquençage : de l'ADN jusqu'aux contigs. D'après Carrico *et al.*²⁵. L'ADN génomique est extrait puis les librairies sont créées en accord avec la méthode utilisée. Lors de l'étape de séquençage, l'ADN va être lu soit dans un seul sens (*single-end reads*) soit dans les deux sens (*paired-end reads*). Les séquences générées (*reads*) vont ensuite être assemblées pour générer des séquences de plusieurs milliers de pb (*contigs*).

2.1.3 Analyses phylogénétiques

En épidémiologie bactérienne, la diversité génétique des génomes bactériens est généralement explorée par des approches phylogénétiques basées soit sur le génome entier, soit sur le *core genome*.

Le *core genome* est défini comme l'ensemble de gènes communs au sein d'une espèce bactérienne ou d'une collection de génomes bactériens²⁶. Il s'oppose au génome accessoire, qui définit l'ensemble des gènes ne faisant pas partie du *core genome* pour un isolat ou une collection d'isolats donnée. Le terme *pan génome* désigne quant à lui tous les gènes existants pour une espèce bactérienne (*core genomes* et génomes accessoires de toute l'espèce). Les données de séquençage vont détecter les variations nucléotidiques entre les génomes bactériens. Ces variations sont apportées par différents événements tels que les mutations ponctuelles (remplacement d'un nucléotide par un autre, insertion ou délétion) ou les recombinaisons homologues qui vont créer de la diversité²⁷.

Les méthodes les plus utilisées en épidémiologie bactérienne pour comprendre les relations entre les génomes bactériens sont souvent basées sur des méthodes de mesure des distances génétiques couplées à une visualisation sur des arbres phylogénétiques. Les distances génétiques sont généralement déterminées par des analyses de mutations (ou SNPs) ou par des méthodes de comparaison gène par gène du *core genome* (cgMLST) ou du génome complet (wgMLST)²⁶.

Les SNPs sont généralement détectés par l'alignement des *reads* d'une souche d'intérêt contre un génome de référence (grâce aux outils Bowtie ou BWA^{28,29}), suivi de la détection des variations de séquences (avec FreeBayes, NASP ou SAMTOOLS^{25,30}).

Les analyses basées sur une approche allélique, de cgMLST ou de wgMLST constituent une alternative aux analyses de SNPs. Plutôt que de comparer quelques gènes comme en MLST, des milliers de gènes sont comparés entre les génomes bactériens. On peut alors choisir de comparer uniquement les gènes du *core genome* (cgMLST), tous les gènes (wgMLST) ou alors uniquement les gènes du génome accessoire. Les approches gène par gène comparent donc les allèles des gènes entre les différents génomes, contrairement aux analyses de SNPs qui comparent toutes les variations nucléotidiques. La détection des événements de recombinaison va être différente entre les analyses de cgMLST et de SNPs. Les différences liées aux recombinaisons sont minimisées en cgMLST^{26,31}. Alors qu'avec une analyse de SNPs, une recombinaison se traduira par une grande quantité de SNPs ; en cgMLST, la même recombinaison n'impactera que quelques allèles. Les analyses de cgMLST s'étant répandues, des schémas de *core genome* ont été définis et publiés pour les pathogènes les plus étudiés et rendent les analyses interlaboratoires plus reproductibles³¹. Les analyses de cgMLST peuvent être réalisées à l'aide de programmes comme celui développé dans notre laboratoire (pyMLST ; <https://github.com/bvalot/pyMLST>) ou de logiciels comme BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) et SeqSphere+ (Ridom, Münster, Germany). Des arbres phylogénétiques sont ensuite construits à partir des analyses de SNPs/cgMLST.

2.1.4 Applications cliniques

Dans un laboratoire de bactériologie clinique, le WGS apporte une information complémentaire aux tests phénotypiques. Pour l'instant, le WGS ne remplace pas l'antibiogramme qui mesure la sensibilité d'une bactérie aux antibiotiques, bien que le WGS puisse identifier les gènes responsables des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Même si de bonnes prédictions de tests de sensibilités aux antibiotiques ont été obtenus en se basant sur les données de WGS,

l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance (bien que ces cas soient rares) et la rapidité de rendu du résultat justifient l'utilité de l'antibiogramme³².

Le WGS offre en revanche la possibilité de caractériser les isolats bactériens avec une meilleure résolution que les autres méthodes de typage¹⁷. En combinaison avec les données épidémiologiques et cliniques, il est le meilleur outil de surveillance et de compréhension des épidémies hospitalières^{17,33}. De nombreuses études ont démontré son efficacité pour comprendre la diffusion de pathogènes comme les EBLSE ou *P. aeruginosa* dans les systèmes hospitaliers³⁴⁻³⁸. Les événements de transmissions sont souvent recherchés par des analyses phylogénétiques (via des analyses de SNPs ou de cgMLST) pour mesurer la proximité génétique entre les souches et reconstruire la chronologie des événements de l'épidémie³⁵.

Par exemple, à l'hôpital universitaire de Cambridge, le WGS a permis d'identifier la source d'une épidémie de *S. aureus* résistant à la méticilline dans un service de néonatalogie. Plusieurs enfants ainsi que leurs mères étaient colonisés par le même clone. Le dépistage du personnel du service a identifié un membre du personnel comme porteur et comme source de l'épidémie³⁹. Plusieurs études ont utilisé le WGS pour caractériser des épidémies liées à *P. aeruginosa*, où l'environnement était une source de contamination des patients ou un réservoir de souches résistantes aux antibiotiques^{38,40}.

Le WGS se révèle également efficace pour surveiller et comprendre la diffusion de certains pathogènes résistants aux antibiotiques. Par exemple, les infections avec des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) sont associées à un niveau de mortalité élevé^{41,42}. Le séquençage d'isolats de *K. pneumoniae* résistants aux carbapénèmes provenant de 244 hôpitaux de 32 pays a montré que seulement quelques clones diffusaient plus que les autres à travers l'Europe et que la diffusion de ces isolats de *K. pneumoniae* était majoritairement nosocomiale^{42,43}.

2.1.5 Autres applications

Le WGS est un outil puissant, il est désormais utilisé pour caractériser les populations bactériennes présentes dans tous les types d'écosystèmes. Un nombre élevé d'isolats séquencés sont aujourd'hui mis à disposition de la communauté scientifique sur des bases de données comme *Sequence Read Archive* (SRA) ou *European Nucleotide Archive* (ENA). La quantité de données déposées sur ces bases ne cesse de croître. En 2010, la taille de la base SRA était d'environ 10 terabases (1 terabase = 10^{12} pb) et dépasse les 20000 terabases en 2021 (<https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>). La structure de la population de certaines espèces

bactériennes a pu être clarifiée grâce à ces bases de données offrant un accès à de grandes quantités de données de séquençage. Par exemple, une étude a sélectionné des souches séquencées en WGS pour créer un arbre représentant au mieux la diversité phylogénétique du genre *Escherichia* composé des espèces *E. coli*, *Escherichia albertii* et *Escherichia fergusonii* (Figure 4). Ce type de reconstruction génétique permet de saisir l'émergence des lignées pathogènes et virulentes de *E. coli* au cours du temps⁴⁴. Ainsi, les événements génétiques qui ont mené à l'apparition de souches virulentes ont été identifiés grâce à l'ensemble des études dans lesquelles des génomes d'*E. coli* sont disponibles. En continuant de séquencer de nouveaux génomes d'*E. coli*, la structure de cette espèce pourra constamment être affinée.

Les données de Freschi *et al.* illustrent également l'intérêt du WGS dans la compréhension de la structure des espèces bactériennes. A partir d'une collection de 1311 génomes de *P. aeruginosa*, les auteurs ont mis en évidence deux nouveaux groupes d'isolats présentant des différences génétiques et montrent que la variation de la distribution des gènes liés à la résistance aux antimicrobiens et à la virulence entre les isolats était en partie associée à ces différents groupes d'isolats⁴⁵. La structure de la population de *P. aeruginosa* sera abordée plus en détails dans la partie 4.1.3.

Dans de nombreuses études 'One Health', le WGS a été utilisé pour caractériser la diffusion de différents pathogènes et des gènes associés à la résistance aux antibiotiques dans la communauté, chez les animaux, dans la nourriture et dans l'environnement⁴⁶⁻⁴⁹. Par exemple, une étude a comparé les isolats d'Ec-BLSE impliqués dans des bactériémies à ceux collectés à partir d'échantillons de nourriture et d'animaux d'élevage. Les auteurs ont utilisé le séquençage Illumina pour comparer des STs, le *core genome* et la distribution des gènes associés à la résistance aux antibiotiques des isolats d'Ec-BLSE, et du séquençage Oxford Nanopore pour reconstituer les plasmides et ainsi caractériser les éléments génétiques mobiles des isolats collectés dans les différents réservoirs⁴⁶. Les données montraient que les gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que leurs supports génétiques étaient différents en fonction du réservoir. Les résultats de l'analyse de cgMLST révélaient une forte diversité génétique entre le *core genome* des isolats humains et ceux provenant du bétail et de la nourriture. Dans cette étude, une caractérisation fine des isolats bactériens par WGS a démontré l'absence de lien entre les isolats humains et les isolats provenant du bétail et de la nourriture. D'autres études *One Health* seront détaillées dans la partie 3.

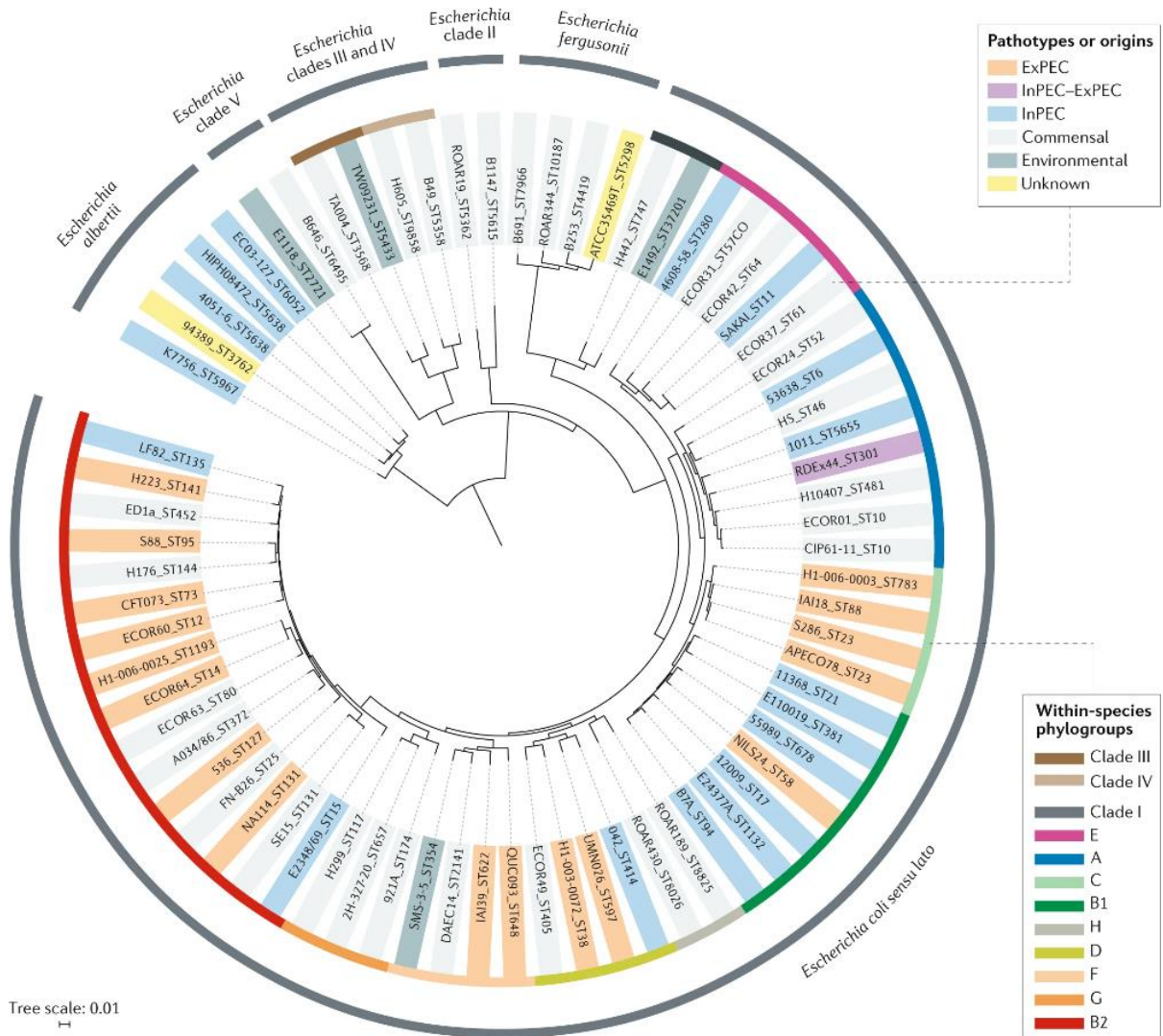


Figure 4. Arbre phylogénétique de 72 souches d'*Escherichia* représentant le genre dans son ensemble. L'arbre phylogénétique a été construit à partir des SNPs ($n = 374678$) des gènes du *core genome*. Les souches sont identifiées par leur ID suivis de leur ST (selon le schéma de l'Université de Warwick⁵⁰). Les souches sont colorées en fonction de leur pathotype et/ou de leur origine. Le cercle extérieur correspond aux différentes espèces représentant le genre *Escherichia*. Le cercle intérieur représente les phylogroupes. D'après Denamur *et al*⁴⁴.

2.1.6 Limites du WGS

Malgré les nombreux avantages du WGS, la technique présente un certain nombre de limites. L'investissement financier pour mettre en place le WGS dans les laboratoires est important. En effet, en plus du coût de la machine (~50 000\$ à 260 000\$ en fonction du modèle) viennent s'ajouter d'autres coûts comme ceux des réactifs, du matériel informatique pour le traitement des données, de la maintenance et du personnel qualifié^{17,51}. De nombreux laboratoires préfèrent donc sous-traiter le séquençage de leurs génomes auprès d'entreprises spécialisées qui proposent des prix souvent attractifs⁵².

Les procédures d'analyse des données de WGS ont besoin d'être standardisées¹⁷. Les protocoles et les applications utilisées pour le traitement des données de séquençage varient considérablement en fonction des laboratoires. Ces variations dans le choix des outils augmentent diminuent la reproductibilité inter-laboratoire¹⁷. Peu d'études comparent les résultats d'analyses de données WGS en fonction des outils utilisés. Définir des seuils standardisés pour la discrimination des isolats bactériens et la création de clusters sera donc impossible tant que les problèmes de reproductibilité ne seront pas résolus.

Bien que le partage des données soit plus simple que pour d'autres méthodes de typage, celui-ci reste pour le moment trop disparate, notamment en raison des réglementations autour des données relatives à des patients, qui diffèrent en fonction des pays. Les procédures de partage de données devraient être simplifiées pour permettre d'analyser des collections de données plus larges et ainsi avoir un meilleur aperçu des pathogènes qui circulent régionalement ou nationalement¹⁷.

2.1.7 Objectifs de l'étude

Dans l'étude présentée dans ce manuscrit, nous avons comparé le typage par WGS au typage par PFGE afin de voir si le PFGE, ancien *gold standard* du typage bactérien, était capable de créer les mêmes groupes d'isolats que ceux obtenus à partir des données de WGS. Pour répondre à cette question, nous avons sélectionné 65 isolats de *P. aeruginosa* qui ont été typés par PFGE et dont les génomes ont été séquencés par WGS. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Hospital Infection*.

2.2 Résultats

2.2.1 La comparaison du PFGE et du WGS confirme la précision du PFGE pour le typage des épidémies locales liées à *P. aeruginosa*

Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and whole-genome-sequencing-based typing confirms the accuracy of pulsed-field gel electrophoresis for the investigation of local *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks

D. Martak, A. Meunier, M. Sauget, P. Cholley, M. Thouverez, X. Bertrand, B. Valot, D. Hocquet

Résumé

Le typage par PFGE a été progressivement remplacé par le WGS qui est devenu le nouveau *gold standard* du typage bactérien. L'objectif de cette étude était de déterminer si le PFGE reconnaissait avec précision les isolats appartenant aux clusters définis par le WGS. Nous avons sélectionné 65 isolats de *P. aeruginosa* ST395 isolés dans sept hôpitaux européens entre 1998 et 2012. Les isolats ont été typés par PFGE et séquencés par WGS. Une analyse cgMLST basée sur 3831 gènes a été réalisée avec un pipeline développé au laboratoire. Le PFGE identifiait huit pulsotypes et l'analyse cgMLST créait neuf clusters et neuf singletons. Cinq pulsotypes et clusters cgMLST (31/65 isolats) coïncidaient parfaitement. Les isolats sans liens épidémiologiques évidents regroupés par le PFGE étaient séparés par la cgMLST (16/65 isolats) différenciant les villes, suggérant que le PFGE devrait être réservé à l'investigation des épidémies locales. Il est important de noter que des isolats hypermutateurs partageaient le même pulsotype que leurs parents (16/65 isolats), alors qu'ils n'étaient pas reconnus par cgMLST, montrant que le PFGE est moins affecté que le WGS par la dérive génétique accélérée qui se produit dans certains *P. aeruginosa* épidémiques. Bien que le typage basé sur le WGS soit logiquement devenu la nouvelle référence pour le typage bactérien, nos résultats montrent que le PFGE peut être utilisé avec confiance pour l'investigation des épidémies locales causées par *P. aeruginosa*.



Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and whole-genome-sequencing-based typing confirms the accuracy of pulsed-field gel electrophoresis for the investigation of local *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks

D. Martak^{a,b,*}, A. Meunier^{a,b}, M. Sauget^{a,b,c}, P. Cholley^{a,b}, M. Thouverez^{a,b}, X. Bertrand^{a,b}, B. Valot^b, D. Hocquet^{a,b,c}

^aHygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France

^bUMR 6249, Laboratoire Chrono-environnement, CNRS-Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

^cCentre de Ressources Biologiques – Filière Microbiologique de Besançon, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2020

Accepted 8 June 2020

Available online 22 June 2020

Keywords:

Pulsed-field gel electrophoresis

Whole-genome sequencing

cgMLST

Bacterial typing

Pseudomonas aeruginosa

Outbreaks



SUMMARY

Aim: To determine whether pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) accurately recognizes isolates belonging to clusters defined by techniques based on whole-genome sequencing (WGS) using *Pseudomonas aeruginosa* as a model.

Methods: We selected 65 isolates of ST395 *P. aeruginosa* isolated in seven European hospitals between 1998 and 2012. Isolates were typed by PFGE and sequenced by WGS. A core genome multi-locus sequence typing (cgMLST) analysis based on 3831 genes was performed with a homemade pipeline.

Findings: PFGE identified eight pulsotypes and cgMLST differentiated nine clusters and nine singletons. Five cgMLST clusters and pulsotypes (31/65 isolates) coincided perfectly. Isolates without evident epidemiological links grouped by PFGE were separated by cgMLST (16/65 isolates) differentiating cities, suggesting that PFGE should be kept for the investigation of local outbreaks. Importantly, hypermutator isolates still shared the pulsotype with their parents (16/65 isolates), whereas they were not recognized by cgMLST. This shows that PFGE was less affected than WGS-based typing by the accelerated genetic drift that occurs in epidemic *P. aeruginosa*.

Conclusions: although WGS-based typing has logically become the new reference standard, we show here that the PFGE can be used with confidence for the investigation of local outbreaks caused by *P. aeruginosa*.

© 2020 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Address: Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Régional Universitaire, 3 Boulevard Fleming, Besançon, Cedex 25030, France. Tel.: +33 3 7063 2134; fax: +33 3 7063 2127.

E-mail address: dmartak@chu-besancon.fr (D. Martak).

Introduction

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has been used over the last three decades to decipher epidemiological links between bacterial isolates or between fungal isolates to identify reservoirs and routes of transmission. This technique has been steadily replaced by typing based on whole-genome sequencing (WGS), which provides highly supported phylogenetic trees and has become the new reference standard for bacterial typing. Previous studies have revealed its accuracy not only for epidemiological investigations in hospital settings [1,2] but also in wider settings, including isolates from different sources (e.g., environmental, food, or livestock) [3]. The recent implementation of WGS in clinical laboratories, easier access to the technique, and the growing number of publications using WGS-based typing have cast doubt on the utility of PFGE, now considered to be outdated.

The criteria for the clustering of epidemiologically linked isolates based on their PFGE patterns was defined in 1995 and validated by numerous studies [4,5]. In contrast, the thresholds that cluster epidemiologically linked isolates are harder to set with WGS-based typing and depend on the method used and on the strain collection. Molecular epidemiology often relies on single nucleotide polymorphism (SNP)-based analysis and on core genome multi-locus sequence typing (cgMLST) which consists of a gene-by-gene comparison of the core genome of the species [6]. The success of cgMLST spurred the definition of schemes for major pathogens in order to standardize the method [6].

A good accordance between WGS-based typing and PFGE was found in studies involving major pathogenic species such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, or *Pseudomonas aeruginosa* [7–9]. Here, we further tested whether PFGE accurately differentiates *P. aeruginosa* isolates belonging to the same sequence type (ST) but from different outbreaks. ST395 is responsible for nosocomial outbreaks and was a good model. We purposely analysed a collection of isolates belonging to the same ST in order to challenge PFGE. A collection of *P. aeruginosa* was first typed using PFGE in which clustering was compared with that of cgMLST. This study aimed to show that PFGE effectively types isolates in local epidemiological surveys and that WGS is not always needed for bacterial typing.

Materials and methods

Bacterial isolates. We used a collection of 65 well-characterized clinical ($N = 59$) and environmental ($N = 6$) isolates of *P. aeruginosa* collected between 1998 and 2012 in the seven hospitals of Besançon (France), Birmingham (UK), Bordeaux (France), Lyon (France), Montpellier (France), and Lariboisière and Garches (Paris, France). We selected isolates belonging to ST395 and collected during various studies. A first study collected isolates from patients hospitalized in the intensive care units of six French hospitals in 2009. A second study was conducted in 2012 in Birmingham where *P. aeruginosa* were found in patients hospitalized in burns care units. A third study collected isolates of an epidemic strain retrieved in the University Hospital of Besançon between 1998 and 2012 [1,10–12].

Isolates were stored at the Centre de Ressources Biologiques – Filière Microbiologique at the University Hospital of Besançon (Supplementary Table S1). All isolates were identified as *P. aeruginosa* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), with a log value ≥ 2 according to the manufacturer's recommendations. The ST of the 65 isolates was determined by MLST using a previously developed scheme [13] and all isolates were identified as ST395.

PFGE. We genotyped all the isolates by determining the macrorestriction profile of their total DNA (hereafter called pulsotype) by PFGE (CHEF DRIII, Bio-Rad) after restriction with *DraI* (Roche Diagnostics), according to a technique previously validated in the laboratory [14]. The software Bionumerics (Applied Math, Kortrijk, Belgium) built a DNA similitude matrix based on calculating the Dice coefficient for pairwise isolate comparisons. The dendrogram was built using the UPGMA (unweighted pair group using arithmetic averages) hierarchical algorithm. We used the *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 strain as a reference to allow comparison between gels. The pulsotypes were defined using a similarity coefficient of 80%, as described in a previous study [15].

WGS. Bacterial DNA was isolated from an overnight culture on Mueller–Hinton agar (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) and extracted with a QIAmp DNA Minikit (Qiagen). DNA was sequenced on an Illumina NextSeq, which generates 150-bp paired-end reads with a mean coverage of 80X. Reads were assembled using SPAdes v.3.13.0. We determined the cgMLST with the homemade pipeline pyMLST (<https://github.com/bvalot/pyMLST>) using a core genome of 3831 previously defined genes [16]. A minimum spanning tree (MST) was built with GrapeTree [17] using distances calculated from genes present in all strains ($N = 3491$). Isolates for which the genomes had ≤ 20 alleles of difference were considered to be epidemiologically linked.

Identification of hypermutators. Hypermutators are defined by a high rate of mutation, often due to a defective mismatch repair (MMR) system. We identified hypermutator candidates *in silico* by searching for non-synonymous mutations, insertions, or deletions in the MMR genes (*mutS*, *mutL*, or *uvrD*) relative to the PAO1 reference strain genome (NCBI accession number NC_002516). We confirmed that isolates defective in the MMR system were hypermutators by comparing their mutation frequencies with those of close isolates with an intact MMR system and that of the PAO1 reference strain using a previously described procedure [18]. We used Student's unpaired *t*-tests to determine the statistical significance of comparisons of the emergence frequencies of mutants resistant to rifampicin between ST395 isolates and the reference strain PAO1.

Results and discussion

The clusters defined by PFGE and cgMLST are presented in Figure 1. PFGE identified eight pulsotypes (A–H) and cgMLST distributed the isolates in nine clusters and nine singletons when using a threshold of 20 alleles.

Six pulsotypes (A, B, D, E, G, and F) were each specific to a single hospital, whereas pulsotypes C and H grouped isolates from four hospitals (Table I). Five pulsotypes (B, E, F, G, and H)

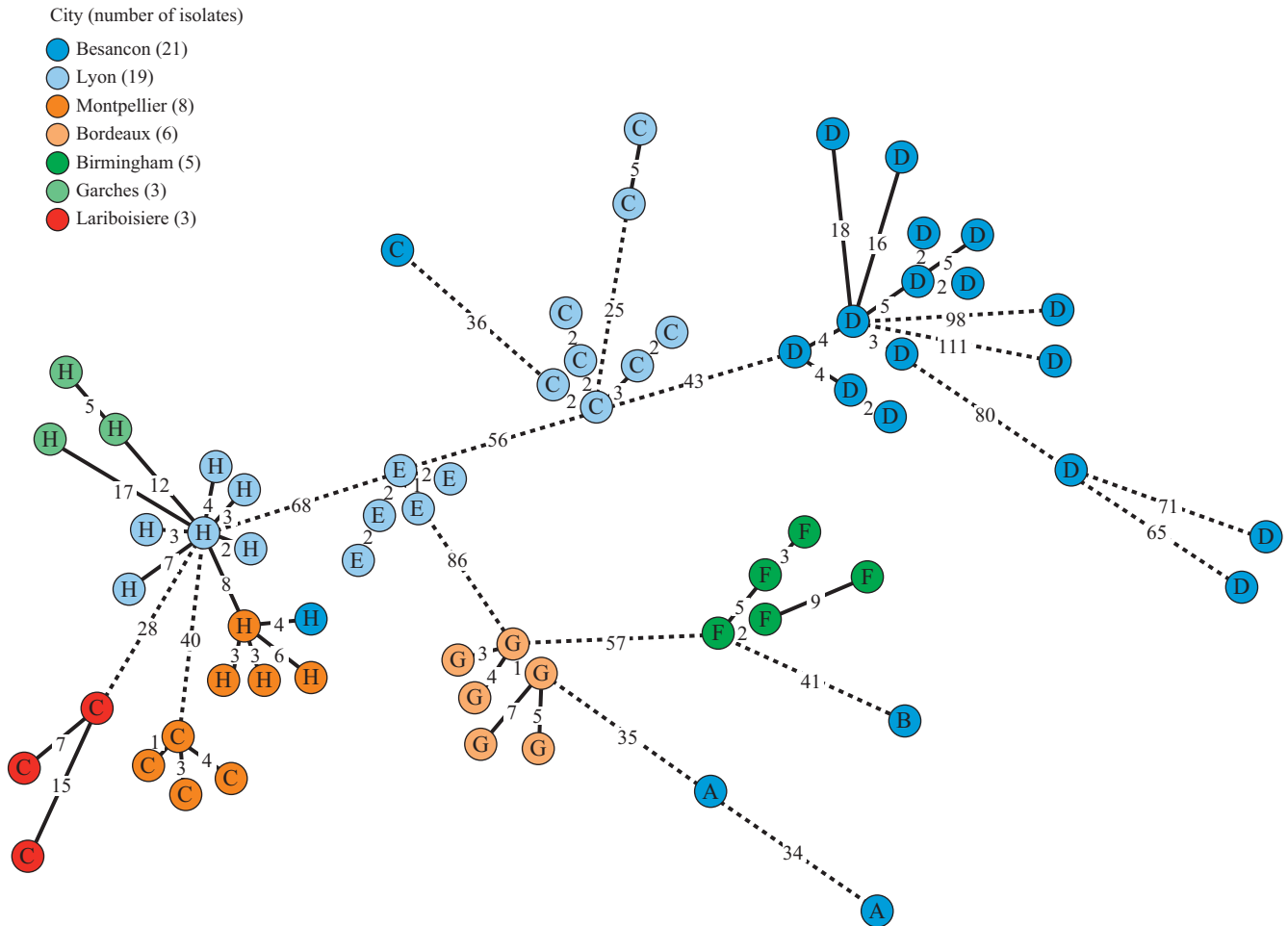


Figure 1. Minimum spanning tree based on the core genome multi-locus sequence typing analysis of 65 *Pseudomonas aeruginosa* ST395 isolates. The colours designate the hospitals from which the strains were isolated. Pulsotypes A–H are named inside the circles. Isolates with ≤ 20 different alleles are linked by black lines, whereas isolates with ≥ 20 different alleles are linked by dotted lines.

Table I

Distribution and epidemiological data of pulsotypes and core genome multi-locus sequence typing (cgMLST) clusters of 65 *P. aeruginosa* ST395 isolates

Pulso-types	Number of isolates	Number of cgMLST clusters/singletons	Hospital(s)	Wards	Period of isolation
A	2	0/2	Besançon	ICU	June 2009
B	1	0/1	Besançon	ICU	March 2009
C	16	4/1	Besançon, Lyon, Montpellier, Lariboisière	ICU	June 2009 to January 2010
D	16	1/5	Besançon	ICU, vascular surgery, neurology	January 1998 to April 2011
E	5	1/0	Lyon	ICU	April 2009 to May 2009
F	5	1/0	Birmingham	BCU	2012
G	6	1/0	Bordeaux	ICU	May 2009 to July 2009
H	14	1/0	Montpellier, Besançon, Lyon, Garches	ICU	April 2009 to October 2009

BCU, burns care unit; ICU, intensive care unit.

perfectly coincided with the cgMLST clusters (31/65 isolates). The two pulsotype A isolates were separated in cgMLST as singletons with 34 alleles of difference. The 16 isolates of

pulsotype C were separated into four cgMLST clusters (of six, four, three and two isolates) and one singleton. Each cluster discriminated the hospital of isolation except for the isolates of

Lyon which were separated in two clusters with at least 25 alleles of difference. The 16 isolates of pulsotype D were distributed in one cgMLST cluster (11 isolates) and five genetically distant singletons with >80 alleles of difference.

Previous studies have reported a good correlation between SNP-based typing and PFGE for the species *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, and *E. coli* [8,9,19,20]. SNP-based and PFGE analysis used to discriminate close isolates of *P. aeruginosa* retrieved from intensive care units revealed perfect congruence between the two methods [7], showing the ability of PFGE to decipher the links between epidemiologically related isolates. However, the stability of PFGE typing could not be tested by Parcell *et al.*, as they compared isolates collected in a single hospital [7]. We deliberately included isolates of the same ST of *P. aeruginosa* to test the ability of PFGE to differentiate isolates of the same clonal group that are not epidemiologically linked and test the stability of the method. Here, the accuracy of PFGE is illustrated by the five cgMLST clusters matching those found with PFGE and by the fact that PFGE correctly differentiated genetically distant isolates collected in the same ICU over the same time period (Table 1) in the Lyon and Montpellier Hospitals (pulsotypes C, E and H).

The genetic distance between the genomes of the isolates belonging to pulsotypes A and D led us to test whether they were hypermutators. Hypermutators are characterized by a defective MMR system, which involves the genes *mutL*, *mutS*, and *uvrD* [21]. We then compared the nucleotide sequences of these three genes of all the genomes of our dataset ($N = 65$) with that of the reference strain *P. aeruginosa* PAO1 and found that the five genetically distant isolates of pulsotype D (but not the two pulsotype A isolates, data not shown) specifically harboured a defective MMR system. Pulsotype D isolates were collected throughout a 13-year outbreak at the University Hospital of Besancon [11]. The isolate DHS15 was retrieved in February 2002 and had a non-synonymous mutation in *mutS*, leading to an amino acid substitution in the protein MutS (Y433D). The four other isolates (210690101, 210690111, 210690101, B168) were retrieved in May 2009 and had the same mutation in *mutL*, creating a stop codon in MutL (R535X). We compared the mutation frequency of the five MMR-defective isolates with that of two isolates of pulsotype D with a wild-type MMR system and the reference strain PAO1 to confirm the phenotypic consequence of these mutations (Supplementary Figure S1). Our data confirmed that, while the pulsotype D isolates with an intact MMR system had a mutation frequency similar to that of PAO1, the mutation frequency of the five MMR-defective isolates was significantly higher ($P < 0.05$) than that of PAO1 (Supplementary Figure S1). The hypermutability of the MMR-defective isolates most probably accounted for the genetic distances revealed by cgMLST. PFGE appears to be less affected than WGS-based typing by accelerated genetic drift that occurs in epidemic *P. aeruginosa*, depending or not on the MMR system.

Despite a good correlation between the two typing methods, PFGE can group isolates of different geographical origins. Hence, ST395 *P. aeruginosa* isolates from four distant hospitals were separated by cgMLST but aggregated in pulsotype C (16/65 isolates). This confirms a previous study showing that PFGE may cluster temporally and geographically unrelated isolates, as well as isolates belonging to unrelated STs [20]. Pulsotype H

was also consistent with the cgMLST clustering but grouped isolates of four different hospitals (Figure 1). Although these results presumably reflect inter-hospital transmission events, we did not have access to the patient records that could have shown a transfer between hospitals. Data with pulsotypes C and H confirmed that PFGE should not be used for inter-hospital investigations without an obvious epidemiological link, as it could lead to uncertain clustering. It suggests that PFGE should only be used to compare isolates in a well-defined spatio-temporal context (i.e. for local outbreak investigations). More broadly, these observations stress the need for a systematic confrontation of bacterial typing results with epidemiological data. Overall, our results show that pulsotypes B, D, E, F and G were consistent with cgMLST clustering, confirming that local outbreaks caused by *P. aeruginosa* can be investigated with confidence with PFGE.

PFGE results are easily interpreted because pulsotype clustering is based on the similitude coefficient [15]. The interpretation of cgMLST data is more complicated, for which the number of differences depends on the species, with no threshold defined for *P. aeruginosa*. Here, we set the threshold to 20 alleles of difference to delimit cgMLST clusters. A previous study chose a threshold of 14 alleles of difference for *P. aeruginosa* [16]. However, this threshold was not suitable for our study as it would have created too many clusters, especially for pulsotype D (data not shown). Indeed, it has been suggested that epidemiological data (e.g., the duration of the outbreak) need to be considered for the choice of a suitable threshold [6].

The criteria for pulsotype clustering directly depend on the mutation rate of the pathogen tested. The good results obtained with PFGE for the investigation of local *P. aeruginosa* outbreaks in this study suggest that it should be suitable for other clones of *P. aeruginosa*, as well as other pathogens with a comparable mutation rate, such as certain clones of *K. pneumoniae* or *Staphylococcus aureus* [22].

Over the last decade, WGS-based typing has challenged the PFGE. WGS-based typing sharply discriminates clonal populations [1,7] and the sequencing data allows the identification of resistance determinants, the deciphering of genome plasticity, the dating of the most recent common ancestor, the identification of plasmids, protein prediction, and the portability of the data [2,9,23]. Recombination events are less likely to modify the WGS-based clustering, whereas they can readily modify the PFGE pattern [24]. Despite its cost, WGS-based typing will overtake other typing methods. However, we confirmed here that PFGE is still appropriate for the investigation of local outbreaks. Finally, one may also ask whether there is not enough or too much WGS for outbreak investigations. Indeed, perhaps less data would be sufficient for this purpose.

Our study has some limitations. We used a single ST to challenge the PFGE typing, but consequently explored a small part of the *P. aeruginosa* diversity. Further experiments with a higher number of isolates, belonging to other clones which disseminate locally or globally could consolidate the evaluation of the PFGE performances.

In conclusion, although WGS-based typing has logically become the new reference standard, we show here that the PFGE can be used with confidence for local outbreak investigations.

Acknowledgements

We thank Dr Beryl Oppenheim from the Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, UK, for the gift of ST395 isolates.

Author contributions

D.M., M.S., B.V., X.B. and D.H. conceived of and designed the experiments. D.M., A.M., P.C. and M.T. carried out the experiments. D.M., A.M. and B.V. analysed the data. D.M., B.V., X.B. and D.H. wrote the manuscript.

Conflict of interest statement

None.

Funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.06.013>.

References

- [1] Quick J, Cumley N, Wearn CM, Niebel M, Constantinidou C, Thomas CM, et al. Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. *BMJ Open* 2014;4.
- [2] Buhl M, Kästle C, Geyer A, Autenrieth IB, Peter S, Willmann M. Molecular evolution of extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients and hospital environment in a prolonged outbreak. *Front Microbiol* 2019;10:1742.
- [3] Ludden C, Raven KE, Jamrozny 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;10:e02693–718.
- [4] 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.
- [5] Neoh H-M, Tan X-E, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol* 2019;74:103935.
- [6] 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;24:350–4.
- [7] Parcell BJ, Oravcova K, Pinheiro M, Holden MTG, Phillips G, Turton JF, et al. *Pseudomonas aeruginosa* intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing. *J Hosp Infect* 2018;98:282–8.
- [8] Rumore J, Tschetter L, Kearney A, Kandar R, McCormick R, Walker M, et al. Evaluation of whole-genome sequencing for outbreak detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from the Canadian perspective. *BMC Genomics* 2018;19:870.
- [9] Fida M, Cunningham SA, Murphy MP, Bonomo RA, Hujer KM, Hujer AM, et al. Core genome MLST and resistome analysis of *Klebsiella pneumoniae* using a clinically-amenable workflow. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020;97:114996.
- [10] Bertrand X, Bailly P, Blasco G, Balvay P, Boillot A, Talon D. Large outbreak in a surgical intensive care unit of colonization or infection with *Pseudomonas aeruginosa* that overexpressed an active efflux pump. *Clin Infect Dis* 2000;31:e9–14.
- [11] Petitjean M, Martak D, Silvant A, Bertrand X, Valot B, Hocquet D. Genomic characterization of a local epidemic *Pseudomonas aeruginosa* reveals specific features of the widespread clone ST395. *Microb Genom* 2017;3:e000129.
- [12] Venier A-G, Leroyer C, Slekovec C, Talon D, Bertrand X, Parer S, et al. Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in intensive care units: a prospective multicentre study. *J Hosp Infect* 2014;88:103–8.
- [13] Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004;42:5644–9.
- [14] Talon D, Cailleaux V, Thouverez M, Michel-Briand Y. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect* 1996;32:135–45.
- [15] McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol* 2003;41:5113–20.
- [16] Mellmann A, Bletz S, Böking T, Kipp F, Becker K, Schultes A, et al. Real-time genome sequencing of resistant bacteria provides precision infection control in an institutional setting. *J Clin Microbiol* 2016;54:2874–81.
- [17] Zhou Z, Alikhan N-F, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res* 2018;28:1395–404.
- [18] Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000;288:1251–4.
- [19] Hammerum AM, Hansen F, Skov MN, Stegger M, Andersen PS, Holm A, et al. Investigation of a possible outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Odense, Denmark using PFGE, MLST and whole-genome-based SNPs. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1965–8.
- [20] Pinholt M, Larner-Svensson H, Littauer P, Moser CE, Pedersen M, Lemming LE, et al. Multiple hospital outbreaks of vanA *Enterococcus faecium* in Denmark, 2012–13, investigated by WGS, MLST and PFGE. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2474–82.
- [21] Oliver A, Baquero F, Blázquez J. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Molec Microbiol* 2002;43:1641–50.
- [22] Duchêne S, Holt KE, Weill F-X, Le Hello S, Hawkey J, Edwards DJ, et al. Genome-scale rates of evolutionary change in bacteria. *Microb Genom* 2016;2:e000094.
- [23] Ludden C, Moradigaravand D, Jamrozny 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;70:219–26.
- [24] Bogaty C, Mataseje L, Gray A, Lefebvre B, Lévesque S, Mulvey M, et al. Investigation of a Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* outbreak using whole genome sequencing versus a standard epidemiologic investigation. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018;7:140.

3. DIFFUSION DES ENTEROBACTERIES DANS LA COMMUNAUTE, L'ENVIRONNEMENT ET LA NOURRITURE

3.1 Introduction

3.1.1 Le concept *One Health*

Le concept *One Health* est une approche globale de la santé apparue dans les années 2000⁵³. Cette approche est multisectorielle et considère que la santé humaine, la santé animale et la qualité de l'environnement sont liées (Figure 5).

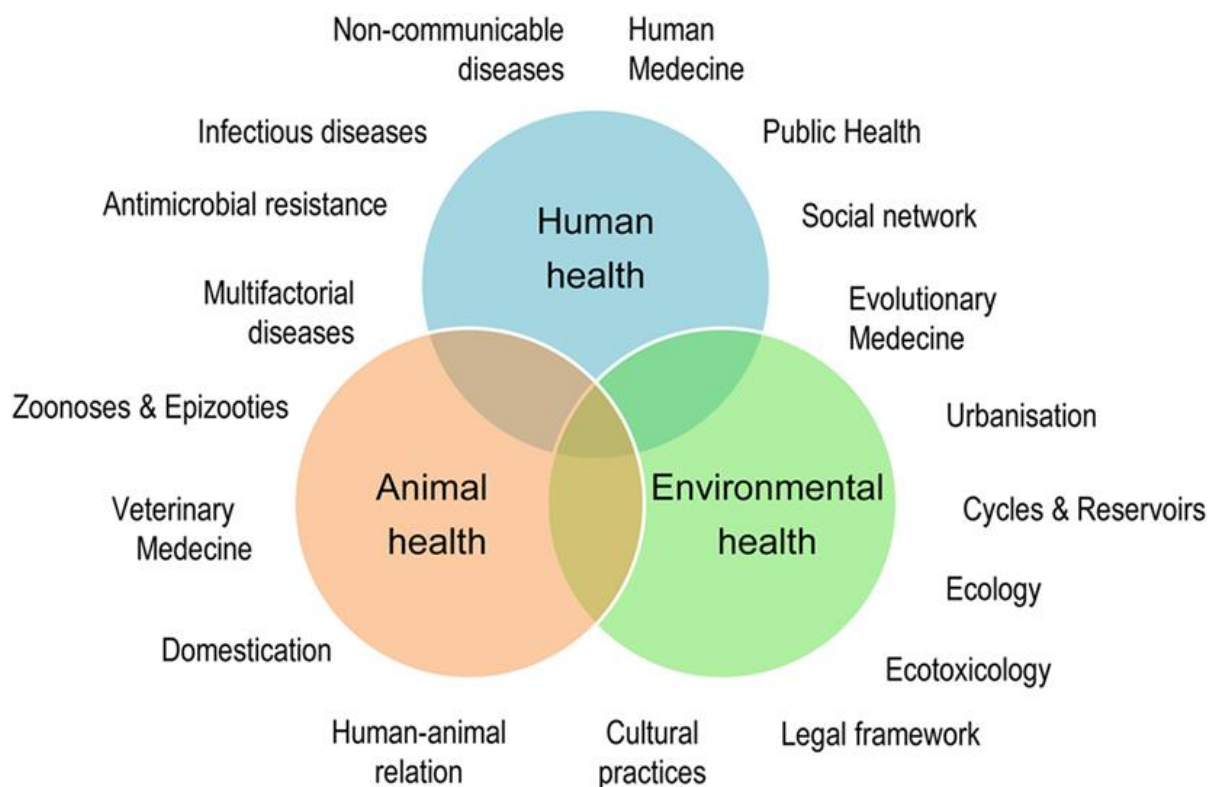


Figure 5. Le concept *One Health*. Ce concept transdisciplinaire promeut une approche unifiée de la santé humaine, animale et environnementale. D'après Destoumieux-Garzón *et al.*⁵⁴.

Le monde bactérien est diversifié et complexe. Bien qu'il existe des espèces bactériennes adaptées et retrouvées uniquement dans certains réservoirs, beaucoup sont communes aux humains, aux animaux et à l'environnement ; par exemple *E. coli* est le pathogène le plus fréquemment isolé dans les infections humaines mais il colonise également l'intestin des mammifères et est présent dans l'environnement⁵⁵. Les antibiotiques utilisés en santé humaine et animale se recouvrent donc partiellement⁵⁶. Ces dernières années, la résistance aux

antibiotiques a considérablement augmenté, au point de devenir un problème de santé publique majeur⁵. Le mésusage des antibiotiques, aussi bien en santé publique qu'en santé vétérinaire, est largement responsable de cette augmentation de la résistance aux antibiotiques⁸. L'approche globale proposée par le concept *One Health* vise donc à comprendre la dissémination des antibiotiques et de la résistance aux antibiotiques entre l'Homme, les animaux et l'environnement¹⁴. Les voies potentielles de la dissémination des antibiotiques et de la résistance aux antibiotiques sont présentées sur la Figure 6.

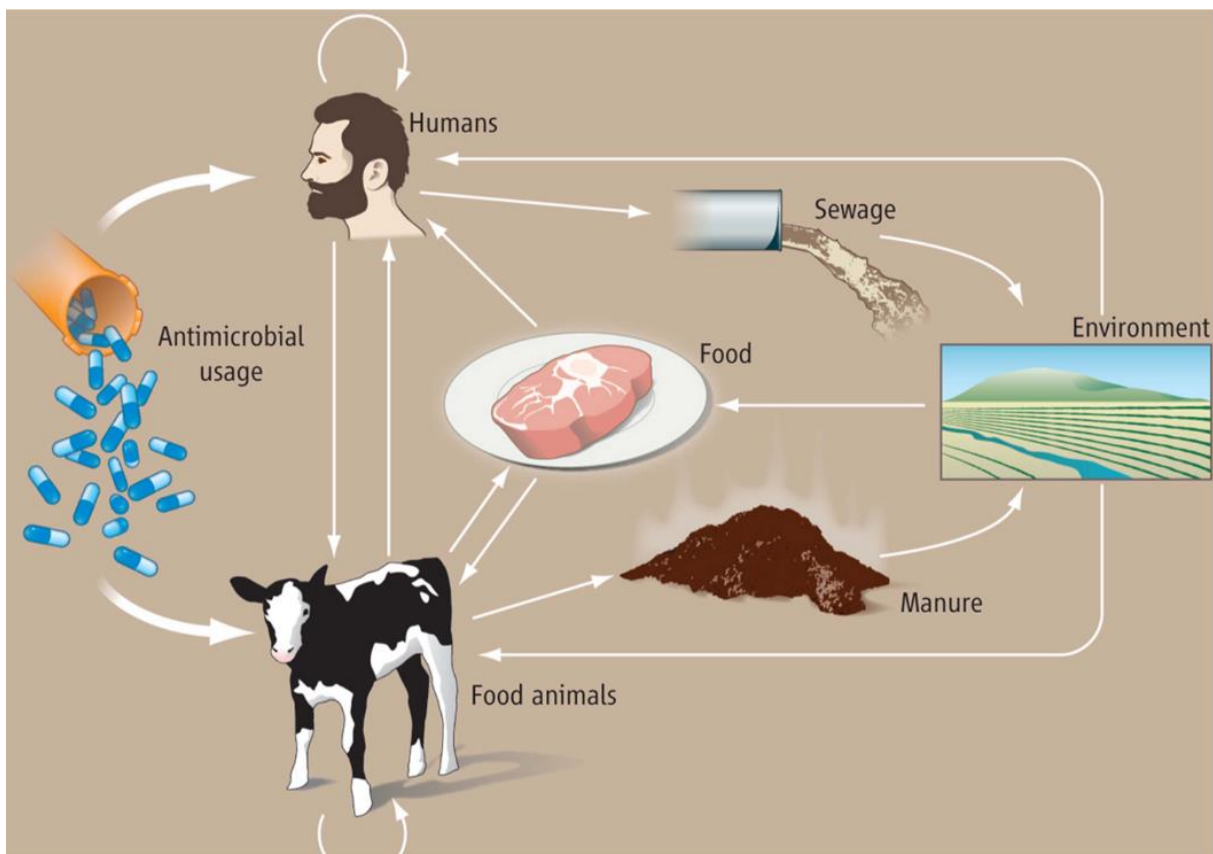


Figure 6. Schéma simplifié des voies potentielles de dissémination des antibiotiques et de la résistance aux antibiotiques chez les humains, les animaux et dans l'environnement. D'après McEwen et Collignon⁵⁷.

La résistance aux antibiotiques peut disséminer directement via la diffusion des souches résistantes aux antibiotiques à travers les différents réservoirs ou par la dissémination des gènes associés à la résistance portés par différents supports génétiques⁵⁸. Les supports génétiques de la résistance et ses mécanismes de transfert seront détaillés dans la partie 3.1.2.

Depuis 2000, la diffusion des EBLSE est devenue particulièrement préoccupante, notamment pour les espèces *E. coli* et *K. pneumoniae*^{47,59}. En effet, les données du réseau de surveillance Européen de la résistance aux antimicrobiens montrent que la résistance aux céphalosporines de troisième génération chez *E. coli* est passée de 9,5% en 2010 à 14,9% en 2017. Pour

K. pneumoniae, le pourcentage est passé de 22,8% en 2010 à 31,2% en 2017. En revanche, de fortes disparités existent entre les pays du Nord de l'Europe, comme la Norvège ou l'Islande, où les taux de résistance sont plus faibles que dans les pays du Sud de l'Europe comme la Grèce ou l'Italie⁶⁰. Depuis, les EBLSE, et surtout *E. coli*, ont fait l'objet d'un nombre important d'études ayant pour objectif de caractériser les populations bactériennes présentes dans les différents réservoirs afin de comprendre si les souches bactériennes et les gènes de résistance circulant dans les différents réservoirs sont identiques^{47,48,59,61,62}.

3.1.2 Supports génétiques et transfert de la résistance

3.1.2.1 Antibiotiques et développement de la résistance

Les principales classes d'antibiotiques utilisées dans le monde pour traiter les infections dans la communauté et à l'hôpital sont les β -lactamines, les fluoroquinolones, les macrolides, les aminosides, les glycopeptides ou encore les sulfamides⁶³. Ces antibiotiques ont différents mécanismes d'action et agissent soit en inhibant (1) la synthèse de la paroi bactérienne, (2) la synthèse des protéines, (3) la synthèse de l'ADN, (4) la synthèse de la membrane cytoplasmique ou (5) en bloquant la synthèse de l'acide folique (Figure 7)⁹.

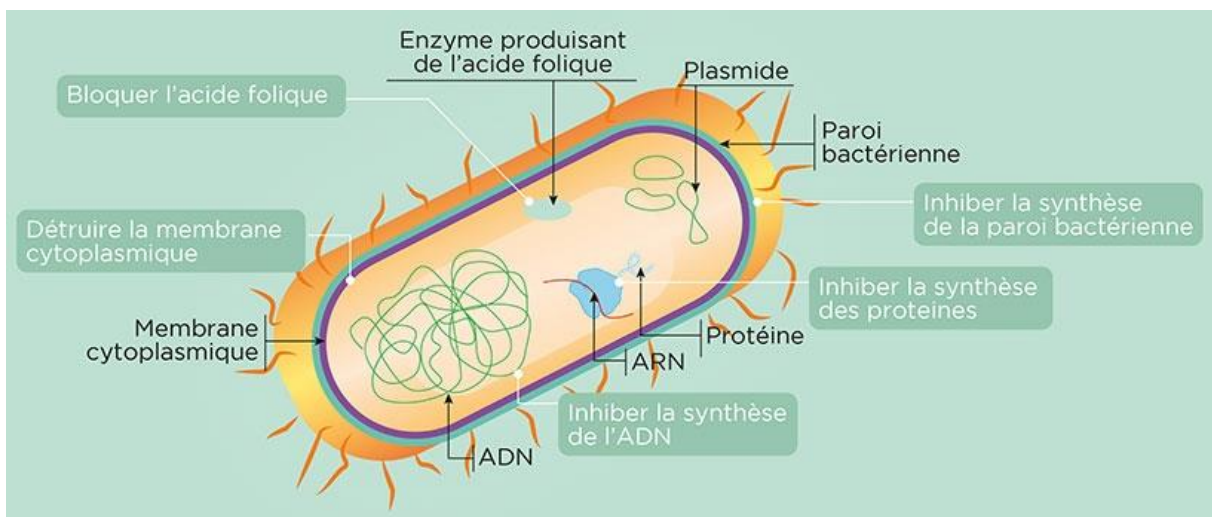


Figure 7. Différents modes d'actions des antibiotiques. Illustration de Frédérique Koulikoff – Inserm, dossier d'information sur la résistance aux antibiotiques.

Certaines espèces bactériennes peuvent être naturellement résistantes à certaines molécules, c'est-à-dire qu'un antibiotique n'aura aucun effet sur cette espèce car elle possède un mécanisme de résistance intrinsèque, par exemple la β -lactamase AmpC de *P. aeruginosa*, dont le gène est chromosomique, hydrolyse les β -lactamines⁶⁴. Des bactéries initialement sensibles

peuvent devenir résistantes en développant des mécanismes qui permettent de devenir insensibles aux différentes molécules existantes, on parle alors de résistance acquise. Les mécanismes les plus fréquents sont (1) la modification de la cible de l'antibiotique, (2) la surproduction des pompes d'efflux, (3) la réduction de la perméabilité membranaire, (4) l'inactivation de l'antibiotique par une enzyme et (5) la protection de la cible de l'antibiotique⁶⁵. Les différentes classes d'antibiotiques, leurs cibles et les mécanismes de résistance les plus fréquents sont présentés dans le Tableau 1.

Classe d'antibiotiques	Exemple(s)	Cible	Mécanisme(s) de résistance
β-Lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, monobactames)	Amoxicilline, céfotaxime, méropénème, imipénème	Synthèse du peptidoglycane	Hydrolyse, efflux, altération de la cible
Aminosides	Gentamicine, streptomycine	Ribosome	Phosphorylation, acétylation, nucléotidylation, efflux, altération de la cible
Glycopeptides	Vancomycine	Synthèse du peptidoglycane	Reprogrammation de la synthèse du peptidoglycane
Tétracyclines	Minocycline, tigécycline	Ribosome	Efflux, altération de la cible
Macrolides	Erythromycine, azithromicine	Ribosome	Hydrolyse, glycosylation, efflux, phosphorylation, altération de la cible
Lincosamides	Clindamycine	Ribosome	Nucléotidylation, efflux, altération de la cible
Phénicolés	Chloramphénicol	Ribosome	Acétylation, efflux, altération de la cible
Quinolones	Ciprofloxacine	Réplication de l'ADN	Acétylation, efflux, altération de la cible
Pyrimidines	Triméthoprim	Inhibition de la synthèse l'acide folique	Efflux, altération de la cible
Sulfonamides	Sulfaméthoxazole	Inhibition de la synthèse l'acide folique	Efflux, altération de la cible
Rifamycines	Rifampicine	Transcription	ADP-ribosylation, efflux, altération de la cible

Tableau 1. Principales classes d'antibiotiques, modes d'action, cibles et mécanismes de résistance les plus fréquents. Adapté de Davies et Davies⁸.

Deux types d'événements génétiques vont permettre à une bactérie de résister à un antibiotique : les mutations de l'ADN et l'acquisition de matériel génétique étranger par transfert horizontal de gènes (THG). Ces événements vont parfois conférer un avantage sélectif à la bactérie. La localisation des mutations de l'ADN est aléatoire mais celles-ci peuvent avoir un effet phénotypique lorsqu'elles modifient la séquence d'un gène ou de son promoteur, modifiant ainsi la séquence en acide aminés de la protéine encodée ou son niveau de production, respectivement⁶⁵.

Un génome bactérien peut acquérir du matériel génétique par THG. Les mécanismes permettant le transfert horizontal sont la transformation, la transduction et la conjugaison. Les gènes transférés par THG et associés à la résistance aux antibiotiques peuvent être contenus par différents éléments génétiques : les transposons, les plasmides, les intégrons ou les éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs)⁶⁶.

3.1.2.2 Les mécanismes de transfert horizontal de gènes

Chez les procaryotes, le mouvement intercellulaire de l'ADN peut s'effectuer selon trois mécanismes : la transformation, la transduction et la conjugaison (Figure 8)⁵⁸.

La transformation bactérienne est un mécanisme permettant à une bactérie receveuse d'intégrer un ADN exogène à partir de l'environnement (Figure 8a)⁶⁷. Pour recevoir de l'ADN, une bactérie doit être dans un état de compétence. La compétence génétique est un état physiologique transitoire caractérisé par la production de certaines protéines^{68,69}. Lors du processus de transformation, les protéines codées par les gènes *pil*, impliquées dans les systèmes de sécrétions de type II ou dans l'assemblage des pili de type IV semblent jouer un rôle important dans la capture et le transport de l'ADN exogène⁶⁹. Les protéines DprA et RecA jouent un rôle majeur dans la recombinaison homologue entre l'ADN exogène et le chromosome. En effet, DprA participe à la prise en charge de l'ADN simple brin lors de son entrée dans la cellule et la protéine RecA est impliquée dans la recherche d'homologie de séquences entre le brin d'ADN et le chromosome pour permettre la recombinaison homologue⁶⁸⁻⁷⁰.

La transduction est un mécanisme par lequel un fragment d'ADN est transféré d'une bactérie à une autre par un bactériophage. Lors d'un cycle infectieux normal, appelé cycle lytique, le bactériophage peut incorporer un fragment d'ADN du génome de l'hôte (erreur d'empaquetage) qu'il a infecté lorsqu'il s'excise de celui-ci (Figure 8b)⁶⁷. Lors d'un cycle lysogénique, le bactériophage s'intègre au génome de son hôte à l'état latent, sans le détruire. Le fragment d'ADN précédemment incorporé sera alors intégré au génome de la bactérie receveuse^{67,71}.

La conjugaison bactérienne est un mécanisme d'échange d'ADN qui requiert un contact entre une cellule donneuse et une cellule receveuse (Figure 8c)⁶⁷. Elle fait intervenir une machinerie complexe composée de protéines codées par des gènes portés par des plasmides conjugatifs ou par des ICEs⁷². La conjugaison nécessite un contact direct entre les deux cellules bactériennes qui est établi grâce à la formation du pilus, par lequel transitera l'ADN. La conjugaison est un

mécanisme qui peut avoir lieu entre deux bactéries de la même espèce ou entre espèces bactériennes différentes⁷².

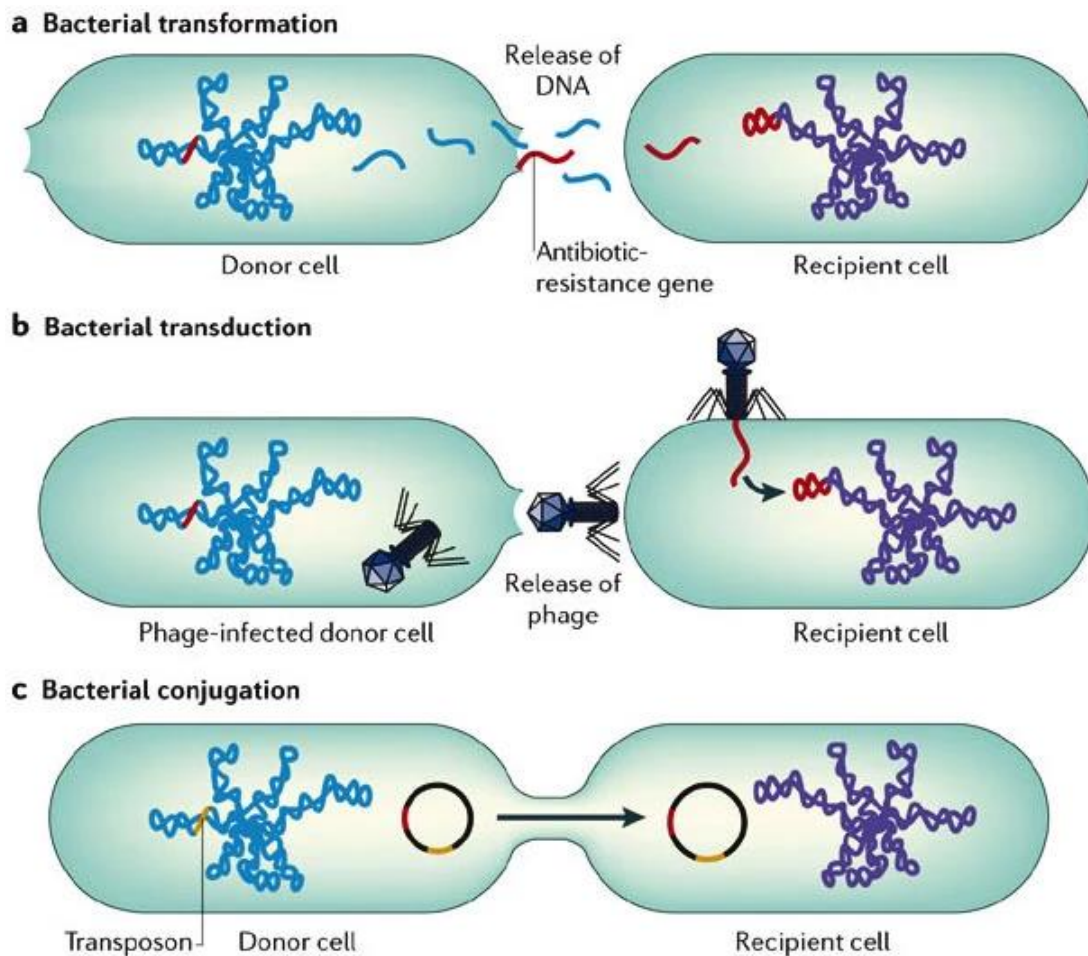


Figure 8. Mécanismes de transfert horizontal des gènes. a. transformation naturelle : une cellule receveuse compétente peut intégrer un fragment d'ADN exogène provenant du milieu extérieur. b. transduction : un bactériophage infectant une cellule peut emporter une partie de son génome qui pourra être intégré dans le génome d'une nouvelle cellule dans le cas d'un cycle lysogénique. c. conjugaison : une cellule donneuse peut transférer une copie d'un réplicon à une cellule receveuse. D'après Furuya *et al.*⁷¹.

3.1.2.3 Les éléments génétiques mobiles

3.1.2.3.1 Les séquences d'insertion

Les séquences d'insertion (IS) constituent l'élément génétique mobile le plus simple. Ce sont des éléments génétiques courts dont la taille varie généralement de 0,7 kb à 2,5 kb. Elles sont composées d'un gène codant pour une transposase et sont flanquées par des séquences inversées

répétées (Figure 9A). Les IS sont capables de s'exciser et de s'insérer au sein d'un génome grâce à l'activité de la transposase⁷³.

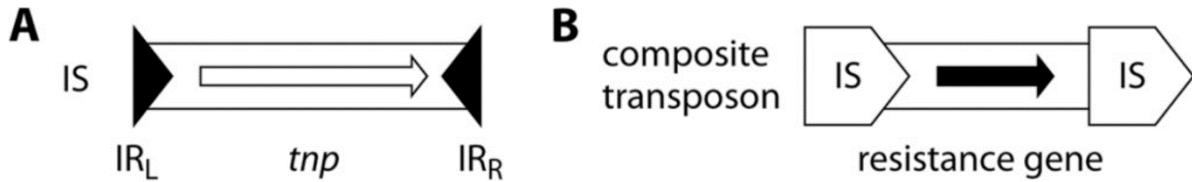


Figure 9. Schéma d'une IS et d'un transposon. A. IS. B. transposon composite. IR_L : *inverted repeat left* ; IR_R : *inverted repeat right* ; *tnp* : transposase. D'après Partridge *et al.*⁶⁶.

3.1.2.3.2 Les transposons

Il existe deux types de transposons : les transposons composites et les transposons non composites. Les transposons composites sont composés de deux IS, qui lorsqu'elles sont assez proches, peuvent être mobilisées en même temps et s'exciser en emportant toute la région qu'elles encadrent (Figure 9B)⁷⁴. La région mobilisée est donc comprise entre l'IR_L d'une IS et l'IR_R de l'autre. Les réactions d'excision et d'insertion sont catalysées par la transposase⁷⁴. Les transposons non composites sont caractérisés par l'absence d'IS à leurs extrémités qui sont flanquées par des répétitions inversées. Les transposons peuvent servir de véhicule aux gènes de résistance aux antibiotiques. Par exemple, certains transposons sont associés avec des gènes de résistance aux β -lactamines comme *bla*_{TEM-1} ou *bla*_{KPC} ou encore avec le gène *vanA* (résistance à la vancomycine)⁶⁶.

Ces deux types de transposons peuvent promouvoir leur transfert au sein de la cellule, d'un endroit à un autre du chromosome ou du plasmide ou encore d'un réplicon à un autre (chromosome ou plasmides). Il existe deux types de transposition : la transposition conservative ('couper-coller' : le transposon se déplace d'un endroit à un autre sans être conservé à l'endroit initial) et la transposition répllicative ('copier-coller' : une copie du transposon est conservée à l'endroit initial)⁶⁶.

3.1.2.3.3 Les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire, circulaires et extra-chromosomiques de tailles variables pouvant aller de 1 à 1000 kb. Ils possèdent leur propre origine de réplication (*ori*) et possèdent toute la machinerie pour se répliquer de manière autonome, indépendamment du chromosome⁷⁵. Ces gènes impliqués dans la réplication et le transfert du plasmide

constituent en quelque sorte son *core genome*. Le génome accessoire peut être plus varié, avec notamment des gènes de virulence, de métabolisme, des gènes de résistance aux métaux lourds et des gènes de résistance aux antibiotiques. Les plasmides transportant des résistances ont généralement des tailles supérieures à 50 kb et sont souvent associés à d'autres éléments génétiques mobiles comme les IS, les transposons et les intégrons^{66,76}. Avant le développement du WGS, la caractérisation des plasmides s'appuyait principalement sur deux méthodes : le typage PBRT et le typage DPMT. Ces méthodes consistent à amplifier des séquences impliquées dans la réplication ou la mobilité du plasmide, respectivement⁷⁷⁻⁷⁹. Parmi ces deux méthodes, le typage PBRT est le plus utilisé. Cette méthode de typage classe les plasmides selon des groupes d'incompatibilité (Inc) définis à partir des origines de répliquions des plasmides^{78,79}. L'incompatibilité est définie comme l'incapacité des plasmides partageant le même système de réplication à se propager de manière stable dans la même lignée cellulaire hôte⁷⁵. Le séquençage de plasmides par WGS est maintenant devenu accessible. Les techniques de séquençage de *reads* longs (Oxford Nanopore) permettent de reconstituer les séquences plasmidiques et ainsi d'identifier les structures génétiques liées aux gènes de résistance, facilitant la compréhension de la diffusion et de l'évolution des plasmides.

De nombreux groupes Inc sont rencontrés chez les entérobactéries comme les groupes IncA/C, IncF, IncG, IncHI, IncI, IncI2, IncK, IncN, IncX⁶⁶. Les plasmides IncF portent souvent des gènes *bla*_{CTX-M}, en particulier *bla*_{CTX-M-15} et *bla*_{CTX-M-27}. Les gènes *bla*_{CTX-M} sont également souvent associés aux plasmides IncA/C, IncI1, IncI2, IncK, IncX, IncN⁷⁶.

3.1.2.3.4 Les intégrons

Les intégrons sont des éléments génétiques caractérisés par la présence d'un gène *intI* codant pour une intégrase, un site de recombinaison *attI* et un promoteur⁸⁰. L'intégrase est une enzyme qui catalyse une réaction de recombinaison entre le site *attI* de l'intégron et le site *attC* d'une cassette de gène (Figure 10)⁸⁰. Les cassettes de gènes sont des petits éléments mobiles, généralement inférieurs à 1000 pb, composées d'un seul gène dépourvu de promoteur. Les cassettes de gènes peuvent exister à l'état libre sous forme circulaire mais sont plus souvent intégrées dans les intégrons⁸¹.

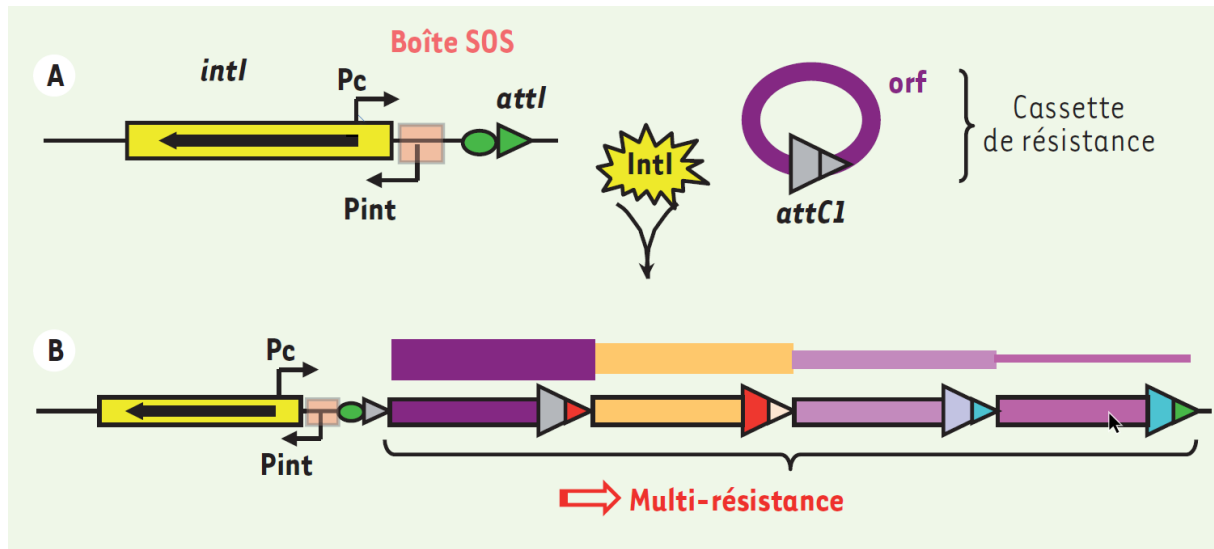


Figure 10. Structure d'un intégron. A. Intégron vide et cassette de gène à l'état libre ; *intI* : gène codant pour l'intégrase ; *P_{int}* : promoteur de l'intégrase ; *P_c* : promoteur des cassettes de gène ; *attI* et *attC* : sites de recombinaison spécifique ; Boîte SOS : site de liaison de l'inhibiteur LexA ; *orf* : cadre de lecture ouvert. B. Intégron contenant plusieurs gènes conférant des résistances aux antibiotiques. Plus une cassette est proche du promoteur *P_c*, plus elle est exprimée⁸². D'après Da Re et Ploy⁸³.

Dans un intégron, chaque nouvelle cassette s'intègre au niveau du site *attI*. Un stress causant des dommages à l'ADN va déclencher la réponse SOS. Cette réponse va induire l'expression de gènes dont l'intégrase, ce qui va engendrer une réorganisation des cassettes. Les cassettes les plus proches du promoteur étant celles qui sont le plus exprimées (Figure 10), la réorganisation la plus adaptée au stress sera sélectionnée, via l'adaptation à celui-ci. Les cassettes de gènes contiennent souvent des gènes associés à la résistance ou à la virulence des bactéries. Les cassettes peuvent contenir des gènes de résistance aux C3G ou aux carbapénèmes^{80,82,84}.

3.1.2.3.5 Les éléments intégratifs et conjugatifs

Les éléments intégratifs et conjugatifs sont des éléments génétiques possédant toute l'information génétique pour s'exciser de leur réplikon, se circulariser et se transférer par conjugaison d'une cellule donneuse à une cellule receveuse (Figure 11). La taille des ICEs est très variable allant de moins de 20 kb à plusieurs centaines de kb. Les ICEs sont caractérisés par la présence d'un gène codant pour une intégrase, utile à l'intégration et à l'excision de l'élément génétique et d'une relaxase impliquée dans le transfert de l'ICE^{85,86}.

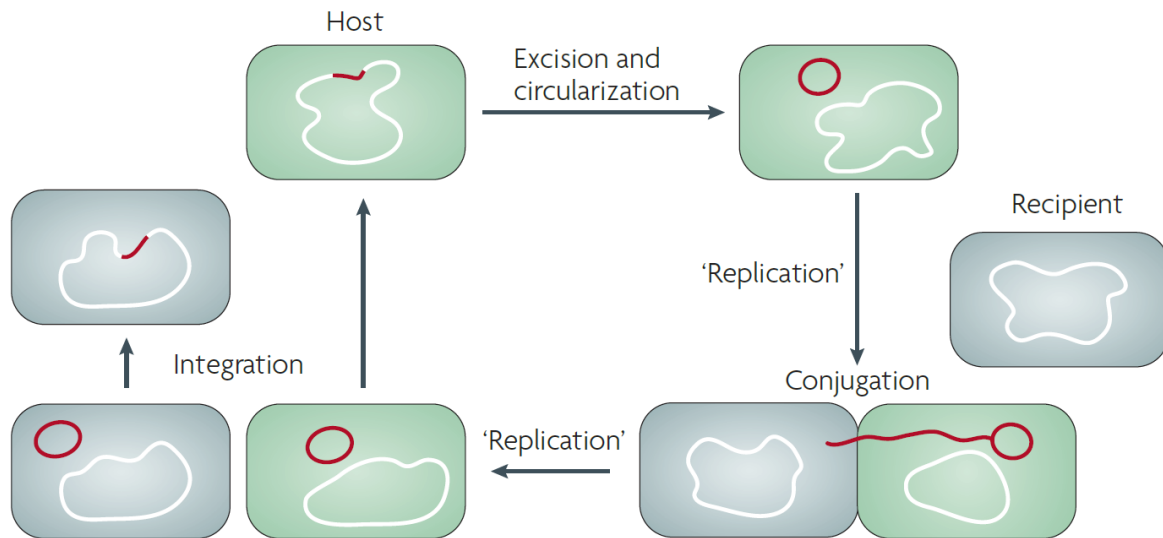


Figure 11. Schéma du cycle de vie d'un ICE. D'après Wozniak *et al.*⁸⁵.

3.1.3 Les BLSE et leur dissémination

Les BLSE sont les enzymes principalement responsables de la résistance aux C3G chez les entérobactéries. Elles ont diffusé parmi les espèces pathogènes dans les années 1990, principalement à la suite de l'usage massif des céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) mais l'acquisition de résistance aux fluoroquinolones par certains clones a également facilité leur diffusion⁸⁷. Leur prévalence n'a cessé d'augmenter dans les décennies suivantes. En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié une liste des pathogènes prioritaires sur lesquels les différents acteurs de la recherche devaient se mobiliser. Sur cette liste, les EBLSE (mais également *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* résistants aux carbapénèmes) sont classés comme étant la première priorité⁸⁸.

La classification d'Ambler répartit les β -lactamases en quatre classes en fonction de leurs séquences en acides aminés (classes A, B, C, et D). Les β -lactamases des classes A, C et D ont un site actif qui contient une sérine tandis que les enzymes de classe B sont des métallob- β -lactamases (MBL) qui utilisent l'ion zinc comme cofacteur^{89,90}. Au sein de chaque classe de β -lactamases, on distingue différentes familles d'enzymes (Tableau 2). Les BLSE sont des β -lactamases de classe A, à l'exception des oxacillinasés qui appartiennent à la classe D. Elles hydrolysent toutes les β -lactamines, excepté les carbapénèmes et les céphamycines. Les BLSE de classe A sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique, contrairement à celles de classe D^{91,92}.

Classe (classification d'Ambler)	Substrat privilégié	Enzymes
A (sérine pénicillinases)	Pénicillines	PC1 de <i>S. aureus</i>
	Pénicillines, céphalosporines à large spectre	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	Pénicillines, céphalosporines à large et à spectre étendu	SHV-2 to SHV-6, TEM-3 to TEM-26, CTX-Ms, BEL-1, VEB-1, PER-1
	Pénicillines	TEM-30, SHV-72, SHV-19
	Pénicillines, carbénicilline	PSE-1
	Céphalosporines à spectre étendu	FEC-1, CepA
	Pénicillines, cephalosporins, carbapénèmes	KPC-2, SME-1, NMC-A
B (MBLs)	La plupart des β -lactamines y compris les carbapénèmes	IMP-1, VIM-1, NDM-1, CcrA and BcII, CphA, L1
C (céphalosporinases)	Céphalosporines	AmpC, CMY-2, ACT-1
D (oxacillinases)	Pénicillines, cloxacilline	OXA-1, OXA-10
	Céphalosporines à spectre étendu	OXA-11, OXA-15
	Carbapénèmes	OXA-23, OXA-48

Tableau 2. Classification des β -lactamases selon la classification d'Ambler. Adapté de Wilson et Török⁹³.

Jusqu'à la fin des années 1990, les isolats producteurs de BLSE hébergeaient majoritairement des dérivés des β -lactamases TEM-1, TEM-2 ou SHV-1⁹⁴. En effet, des mutations ponctuelles modifiant la protéine au niveau du site actif ont permis d'élargir le spectre d'activité de ces enzymes⁹⁴. Les gènes codant pour les enzymes de la famille des CTX-M ont ensuite commencé à disséminer et prédominent désormais à travers le globe⁹⁵⁻⁹⁷.

Les CTX-M sont classées en cinq groupes basés sur l'identité des séquences en acide aminés : CTX-M groupe 1, CTX-M groupe 2, CTX-M groupe 8, CTX-M groupe 9 et CTX-M groupe 25. Certaines espèces bactériennes environnementales du genre *Kluyvera* possèdent des gènes CTX-M chromosomiques et ont été identifiées comme progénitrices des CTX-M associées à des plasmides retrouvés chez les espèces pathogènes comme *E. coli* ou *K. pneumoniae*⁹⁸. La mobilisation et la transposition des CTX-M ont notamment été rendues possibles grâce à deux IS : l'*ISEcp1* pour les CTX-M des groupes 1, 2, 9 et 25 ou l'*ISCR1* pour le groupe 2 et le groupe 9^{93,99}. La coexistence de l'*ISEcp1* et des gènes *bla*_{CTX-M} est bien documentée⁶⁶. Cette IS est capable de mobiliser le gène *bla*_{CTX-M} se trouvant en aval et de lui fournir un promoteur pour son expression¹⁰⁰. Les gènes *bla*_{CTX-M} sont souvent associés aux mêmes plasmides, notamment aux groupes IncF, IncI, IncN, IncHI2, IncL/M et IncK. Le gène *bla*_{CTX-M-15} a majoritairement été identifié sur des plasmides IncF¹⁰¹. Chez l'Homme, l'enzyme CTX-M-15 du groupe 1 est la plus représentée à travers le monde¹⁰⁰.

Plus globalement, la prévalence des EBLSE, aussi bien en portage intestinal que dans les infections n'a cessé d'augmenter au cours des deux dernières décennies et ce dans le monde

entier^{91,102}. Cette augmentation a fortement inquiété les instances de santé publique car les infections graves à bactéries productrices de BLSE nécessitent souvent un traitement par carbapénèmes, une des classes de molécules de dernier recours avant l'impasse thérapeutique¹². Cependant, les efforts menés pour limiter la consommation des antibiotiques aussi bien en santé humaine qu'en santé vétérinaire ont permis d'amorcer une diminution de la proportion d'isolats producteurs de BLSE dans certains pays, notamment en France^{60,103} (Figure 12).

3.1.4 Généralités sur *E. coli*

E. coli est un bacille à Gram négatif présent dans de nombreux écosystèmes et commensal du microbiote humain. Bien que cent à mille fois moins représenté en nombre que les espèces anaérobies, *E. coli* est la bactérie aérobie prédominante du microbiote humain⁵⁵. En effet, c'est une des premières espèces bactériennes à coloniser l'intestin, avant l'installation des bactéries anaérobies⁵⁵. Cependant, *E. coli* est également un pathogène opportuniste responsable d'infections extra- (ExPEC) et intra-intestinales (InPEC)⁴⁴. Les souches ExPEC sont fréquemment impliquées dans les infections urinaires et peuvent être associées à une mortalité élevée en cas de bactériémies⁴⁴. Au sein des *E. coli* ExPEC et InPEC, les souches sont classées selon des pathotypes dont le nom est souvent relatif aux types ou aux sites d'infections¹⁰⁴. Au sein des ExPEC, on distingue les UPEC (*uropathogenic E. coli*) responsables d'infections urinaires, les NMEC (*newborn meningitis E. coli*) responsables de méningites. Les ExPEC appartiennent généralement aux phylogroupes B2 et D. Au sein des InPEC, on distingue par exemple les STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*), les EPEC (*enteropathogenic E. coli*) ou encore les AIEC (*adherent-invasive E. coli*)^{44,104,105}.

Selon la dernière enquête de prévalence des infections nosocomiales en France en 2017, *E. coli* était le pathogène le plus fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales avec une prévalence de 23,59%¹⁰.

La structure phylogénétique de l'espèce *E. coli* se divise en huit phylogroupes : A, B1, B2, C, D, E, F et G^{106,107}. L'attribution des isolats aux différents phylogroupes permet de structurer génétiquement l'espèce *E. coli* et de comprendre son évolution. Parmi ces phylogroupes, on distingue deux clusters, un premier contenant les souches appartenant aux phylogroupes B2, D, F et G et le second contenant les souches appartenant aux phylogroupes A, B1, C et E (voir Figure 4, partie 2.5)^{44,106,107}. Certains phylogroupes semblent adaptés à certains hôtes ou souvent responsables d'infections spécifiques. Par exemple, les souches des phylogroupes A et B2 prédominent chez les humains, alors que le phylogroupe B1 domine chez les animaux⁵⁵.

Les souches du phylogroupe B2 sont les plus virulentes et celles des phylogroupes B2 et D sont fréquemment impliquées dans les infections extra-intestinales¹⁰⁸⁻¹¹⁰. La taille du génome de *E. coli* peut varier de 4,5 à 6 Mpb ; les souches associées aux phylogroupes A et B1 possèdent généralement les plus petits génomes tandis que celles appartenant au phylogroupe E possèdent les plus gros génomes⁴⁴.

Un des représentants majeur du phylogroupe B2 est le clone ST131 dont les sous-clones C1 et C2, producteurs de CTX-M, ont diffusé à travers toute la planète^{111,112}. On observe donc une surreprésentation du clone ST131 parmi les souches productrices de BLSE, qui est fréquemment impliqué dans les infections extra-intestinales. ST131 est fréquemment associé avec l'enzyme CTX-M-15, généralement codée par un plasmide du groupe IncF ou IncI^{111,113}. Les souches ST131 sont généralement résistantes aux fluoroquinolones grâce à des mutations dans les gènes *gyrA* et *parC*. De manière plus générale, *E. coli* héberge en moyenne deux à quatre plasmides qui appartiennent à des groupes Inc qui varient en fonction du type de souches. Néanmoins, les groupes IncF et IncI sont les plus fréquemment associés aux souches d'Ec-BLSE¹¹⁴⁻¹¹⁶.

3.1.5 Généralités sur *K. pneumoniae*

K. pneumoniae est un bacille à Gram négatif capable de survivre dans l'eau, le sol, les plantes ou encore associés à des hôtes comme les oiseaux, les insectes et les mammifères y compris les humains chez qui cette espèce peut être commensale, pathogène opportuniste ou pathogène¹¹⁷. Selon la dernière enquête de prévalence en France en 2017, *K. pneumoniae* était le 5^{ème} pathogène le plus fréquemment isolé dans les infections nosocomiales, avec une prévalence de 5,6%¹⁰. Cette bactérie est fréquemment responsable d'infections pulmonaires, d'infections urinaires ou encore de bactériémies^{10,118}.

Le génome de *K. pneumoniae* a une taille d'environ 5 – 6 Mpb et son *core genome* est constitué d'environ 1700 gènes¹¹⁹. Certains clones (ST11, ST15, ST101, ST258, ST512, ST307) ont largement diffusé à travers la planète. Les différents clones de *K. pneumoniae* peuvent être différenciés par leur génome accessoire. En effet, les recombinaisons chromosomiques et les échanges de plasmides par conjugaison ont permis à certains clones de s'adapter à leur niche. *K. pneumoniae* est également caractérisée par son habilité à héberger un grand nombre de plasmides^{119,120}. La majorité des plasmides retrouvés chez *K. pneumoniae* appartiennent aux groupes IncFII, IncN, IncR et IncX3.

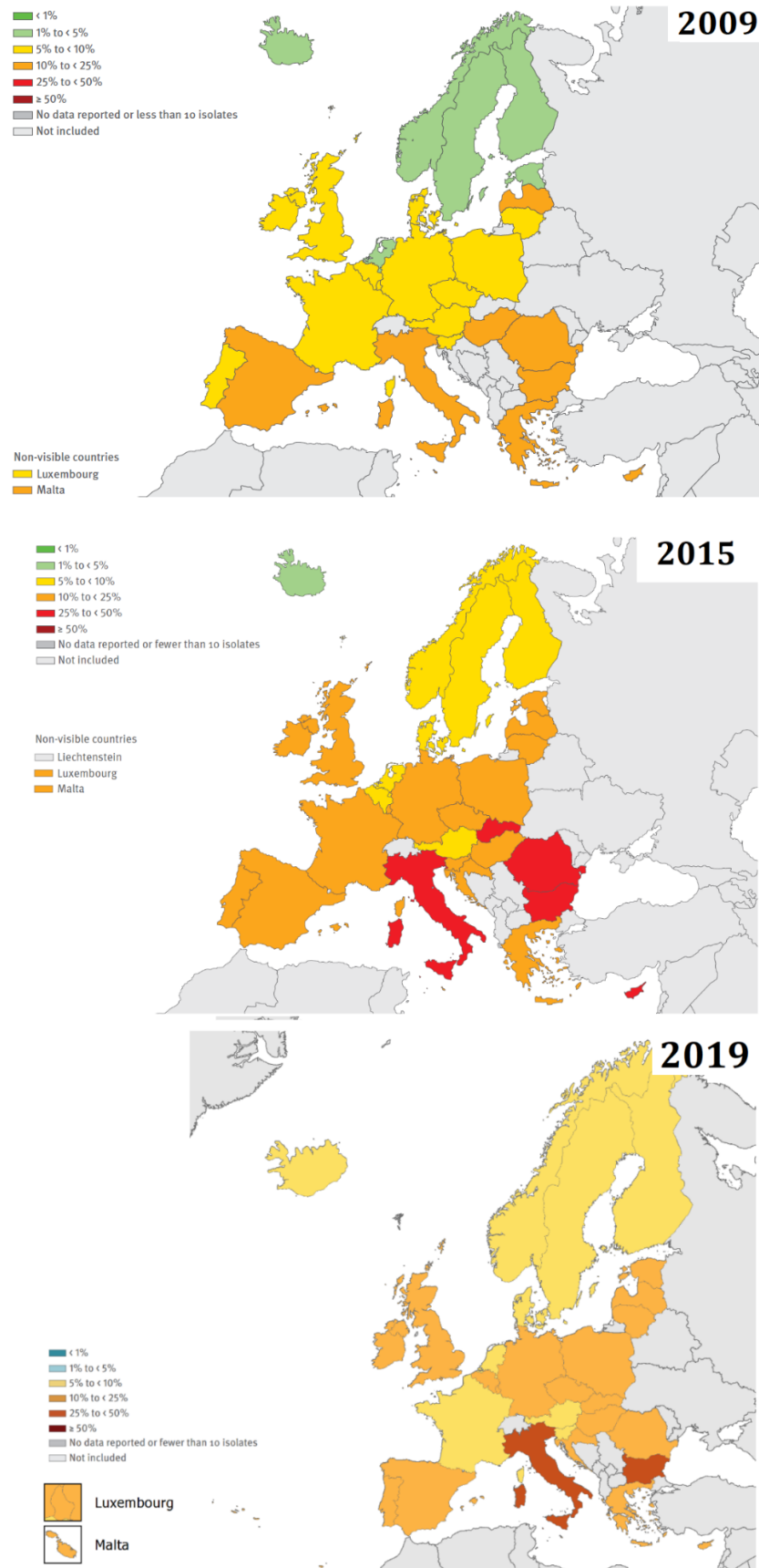


Figure 12. Pourcentage d'isolats de *E. coli* invasifs résistants aux C3G, par pays de UE/EEE, en 2009, 2015 et en 2019. D'après le réseau de surveillance européen de la résistance aux antimicrobiens (EARS-Net)⁶⁰.

Cette acquisition fréquente de matériel génétique par THG est par ailleurs largement responsable de la diffusion de la résistance chez *K. pneumoniae*¹²¹. Comme chez *E. coli*, les enzymes de type CTX-M dominant parmi les souches productrices de BLSE¹²². Les souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases ont également largement diffusé à travers le monde notamment grâce à l'enzyme KPC souvent associée aux clones ST11 et ST258⁹³.

3.1.6 Epidémiologie hospitalière de *E. coli* et *K. pneumoniae*

Comme décrit dans les parties précédentes, *E. coli* et *K. pneumoniae* sont deux pathogènes fréquemment impliqués dans les infections nosocomiales. Les infections liées à des isolats producteurs de BLSE peuvent être problématiques en raison du temps nécessaire à mettre en place une antibiothérapie efficace. En effet, les Ec-BLSE et Kp-BLSE sont souvent résistants à d'autres antimicrobiens comme les fluoroquinolones, les aminosides et les tétracyclines¹²³.

Dans les années 1980, les enzymes de type SHV et TEM étaient les plus fréquemment identifiées dans les infections nosocomiales liées à des EBLSE. Autour des années 2000, les enzymes de type CTX-M ont émergé et les infections à EBLSE produisant les enzymes de type CTX-M ont dépassé celles liées aux autres enzymes et sont aujourd'hui devenues largement prédominantes^{92,124}. La diffusion des gènes *bla*_{CTX-M} a été largement facilitée par des éléments génétiques mobiles comme les transposons et les intégrons¹²⁵. En 2012 – 2013, en Europe et en Amérique du Nord, la prévalence dans les services de soins d'Ec-BLSE était d'environ 15% et la prévalence de Kp-BLSE était d'environ 30%¹²⁶. Les isolats d'Ec-BLSE produisent majoritairement des CTX-M (>90%) parmi lesquels >60% sont des CTX-M-15. Pour les isolats de Kp-BLSE, CTX-M-15 est la BLSE majoritaire en Europe (>85%) tandis qu'aux Etats-Unis, SHV-12 est prédominante (>60%)¹²⁶. Une autre étude a montré qu'entre 2010 et 2014, la proportion d'Ec-BLSE responsables d'infections urinaires dans les hôpitaux était passée de 9,4% à 27,7% aux Etats-Unis¹²⁷. La situation est encore plus alarmante dans le sud et le sud-est de l'Asie où la prévalence d'Ec-BLSE dans les infections nosocomiales variait de 15% à 60%¹²⁸. Le gène *bla*_{CTX-M-15} est le gène *bla*_{BLSE} dominant dans la majeure partie du monde. D'autres gènes, comme *bla*_{CTX-M-14} et *bla*_{CTX-M-27} sont également bien représentés dans certaines parties du monde, *bla*_{CTX-M-14} étant par exemple dominant en Chine¹²⁵. Notons l'importance du clone ST131 chez *E. coli*, qui serait impliqué dans 20% à 72% des bactériémies à Ec-BLSE¹¹³.

3.1.7 Epidémiologie communautaire des EBLSE

E. coli est un pathogène commun des infections communautaires, il est la cause majeure des infections urinaires et est isolé dans ~80% de celles-ci¹²⁹. A l'inverse, *K. pneumoniae* est un pathogène qui semble mieux diffuser dans les hôpitaux que dans la communauté¹³⁰⁻¹³². Bien que décrit comme plus transmissible à l'hôpital, *K. pneumoniae* colonise moins facilement le microbiote humain que *E. coli*^{132,133}.

En Europe et en Amérique du Nord, la prévalence de colonisation fécale par EBLSE dans la communauté est d'environ 10% alors qu'elle se situe autour des 14% dans le monde¹³. Des prévalences plus élevées ont été relevées dans les établissements de long séjour, notamment dans certains pays comme l'Italie ou l'Irlande où les taux de prévalence étaient supérieurs à 50%¹³⁴. Comme dans les établissements de soins, le gène *bla*_{CTX-M-15} est prédominant dans les souches communautaires. Ce gène est d'ailleurs fortement associé au clone de *E. coli* ST131, qui représente une part importante des infections liées à des EBLSE dans la communauté^{135,136}. Certaines études se sont également intéressées à la durée de portage de Kp-BLSE et de Ec-BLSE dans la population générale. Il a été montré, à partir d'une collection de 1896 échantillons collectés de 325 participants aux Pays-Bas, que 32,9% des participants positifs au début de l'étude restent positifs pendant les 242 jours (~8 mois) de l'étude et 12,4% des participants négatifs au départ deviennent positif durant cette même période¹³⁷. Pour les isolats de Ec-BLSE, les clones les plus fréquemment isolés étaient le ST131, le ST10, le ST38 et le ST69. Les gènes *bla* les plus fréquents étaient *bla*_{CTX-M-15} (41,1%), *bla*_{CTX-M-14} (18,7%) et *bla*_{CTX-M-1} (12,1%). Le groupe plasmidique IncF était le plus commun et fortement associé aux gènes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14} et *bla*_{CTX-M-27} et au ST131¹³⁷.

Peu d'études se sont intéressées à la diffusion intrafamiliale des EBLSE. L'une d'elles a calculé un taux d'incidence de 1,56 à 2,03/1000 personnes événements de transmission par semaine parmi 180 personnes initialement non colonisées par des EBLSE¹³⁸. Globalement, le portage d'EBLSE est plus élevé chez les membres de foyers hébergeant un porteur connu de EBLSE. Ainsi, le taux de portage intestinal d'Ec-BLSE dans la communauté était situé entre 2% et 7%, en France et en Espagne, mais le taux était de 14% à 27% chez les membres de foyers dans lesquels un individu était colonisé¹³⁸. Le taux de portage de Kp-BLSE dans la communauté semble plus faible que pour *E. coli*. Une étude norvégienne a par exemple relevé des taux de portage intestinal d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE de respectivement 4,9% et 0,3% sur une cohorte de 284 personnes saines¹³⁹.

La durée du portage digestif de Kp-BLSE ou Ec-BLSE après une acquisition à l'hôpital est également mal connue. Le suivi de 51 nouveau-nés après une épidémie de Kp-BLSE *bla*_{CTX-M-15} dans une unité de soins intensifs d'un hôpital norvégien a montré que le temps médian de portage était de 12,5 mois¹⁴⁰. Une transmission aux membres du foyer a été observée dans deux tiers des foyers inclus dans l'étude^{140,141}. Ces études mettent en avant un taux de transmission plus élevé pour Kp-BLSE (deux tiers des foyers = 66%) que pour Ec-BLSE (14 à 27%).

Notons que la présence d'EBLSE est également documentée chez les animaux de compagnie. Plusieurs études montrent la présence d'isolats d'Ec-BLSE ST131, d'Ec-BLSE porteurs des gènes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-14} et *bla*_{CTX-M-27} et de Kp-BLSE porteurs du gène *bla*_{CTX-M-15}¹⁴²⁻¹⁴⁵. Des transferts de clones entre les humains et les animaux ont été suggérés par certaines études. Les clones ST11 et ST15 responsables d'infections humaines et disséminés à travers la planète ont également été identifiés chez les animaux comme les chiens, les chats ou encore les chevaux¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

La communauté est donc un réservoir majeur d'EBLSE et les transmissions interhumaines constituent une voie de diffusion efficace. En dehors des contaminations interhumaines, la colonisation intestinale par EBLSE des animaux destinés à produire de la viande et les fortes prévalences d'EBLSE observées dans la nourriture ou dans l'environnement questionnent aujourd'hui sur leur implication dans la contamination humaine.

3.1.8 Diffusion environnementale des bactéries pathogènes et résistantes

3.1.8.1 Eaux usées

Dans les pays développés comme en France, la majorité des habitations sont connectées au réseau de traitement des eaux usées (~85% en France), limitant ainsi la dissémination des pathogènes humains directement dans l'environnement¹⁴⁸. Les effluents communautaires et hospitaliers sont donc collectés et traités par les stations de traitement des eaux usées (STEU). Il a été montré que les effluents communautaires sont généralement plus chargés en bactéries d'origines fécales que les effluents hospitaliers¹⁴⁹. En revanche, la concentration de bactéries productrices de BLSE ou de carbapénémases est plus élevée dans les effluents hospitaliers, probablement en raison de la fréquence des porteurs et de la consommation d'antibiotiques élevée en milieu hospitalier¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Cependant, les eaux usées hospitalières représentent une faible proportion des eaux usées totales, limitant ainsi leur impact sur la diffusion des bactéries résistantes¹⁵².

3.1.8.2 Les stations de traitement des eaux usées

Les STEU reçoivent les eaux usées brutes de la communauté, des hôpitaux, de l'industrie mais aussi les eaux de ruissellement qui sont traitées avant d'être rejetées dans le milieu récepteur (rivière, lac, littoral).

Les eaux usées arrivant dans la STEU sont traitées en plusieurs étapes. Une première étape de dégrillage permet d'éliminer les gros déchets qui sont ensuite évacués. S'en suit une étape de dessablage et de déshuilage visant à éliminer le sable, les graviers et les graisses. Une étape de décantation primaire permet ensuite la formation des boues primaires qui sont raclées puis épaissies. L'eau subit ensuite un traitement biologique permettant de dégrader les matières organiques notamment grâce à des bactéries. Un clarificateur permet ensuite de séparer l'eau des boues par décantation qui sont épaissies et séchées¹⁵³.

Les STEU réduisent considérablement la concentration bactérienne dans l'eau. Plus de 90% des *E. coli* totaux et des Ec-BLSE présents dans les eaux en entrée de STEU sont éliminés¹⁴⁹. Des données publiées montrent que les proportions d'isolats résistants aux antibiotiques sont généralement élevées dans les eaux de STEU^{154,155}. *E. coli* est utilisé comme indicateur de la pollution fécale pour évaluer la qualité de l'eau^{156,157}. Etudier les variations de quantités d'isolats résistants dans les effluents humains constitue ainsi un bon indicateur de contamination de la population par bactéries résistantes aux antibiotiques^{155,158}.

Dans les eaux usées, la population d'isolats d'Ec-BLSE est généralement similaire à celle observée chez les humains. Par exemple, l'enzyme CTX-M-15 et le clone ST131 sont très bien représentés dans les eaux usées de STEU^{48,159,160}. Ces données soulignent l'importance des rejets de STEU dans la contamination de l'environnement⁴⁹.

Dans le cas de *K. pneumoniae*, les isolats retrouvés dans les eaux usées sont souvent associés à l'enzyme CTX-M-15^{159,160}. Une étude anglaise comparant les isolats de Kp-BLSE issues de selles ou d'eaux usées a montré que le gène *bla*_{CTX-M-15} était largement majoritaire⁴⁷. Bien que les STs et les plasmides étaient différents entre les collections issues des eaux usées et des selles, la majorité des isolats partageaient une région de 13,4 kb contenant des gènes de résistance aux antibiotiques, y compris *bla*_{CTX-M-15}⁴⁷.

Globalement, les STEU éliminent une grande quantité des bactéries d'origine humaine présentes dans les eaux usées mais constituent tout de même la source majeure de dissémination de bactéries pathogènes ou résistantes aux antibiotiques dans l'environnement¹⁶¹. En plus des bactéries, les STEU relarguent également des antibiotiques dans l'environnement qui favorisent la pression de sélection¹⁶².

3.1.8.3 Eaux de surface

Les eaux de surface sont largement contaminées par les bactéries pathogènes et/ou multi-résistantes. La présence d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE a été documentée dans pratiquement tous les types d'eaux dont les rivières, les lacs, les étangs, les eaux marines ou encore les zones humides¹⁵²⁻¹⁵⁶. Les zones humides sont des zones qui sont recouvertes d'eau en permanence ou seulement pendant certaines périodes de l'année. Ce sont souvent des mares, des bras morts de rivières, des zones marécageuses ou encore des forêts alluviales (Figure 13). En 2018, la superficie mondiale des zones humides a été estimée à 12,1 millions de km² (à titre d'exemple, la superficie du Canada est de 9,985 millions de km²)¹⁶⁸. En France métropolitaine, les zones humides recensées occupent une superficie d'environ 9000 km² (1,4% de la surface du pays)¹⁶⁹. L'eau présente dans les zones humides peut avoir pour origine les précipitations ou être apportée par un cours d'eau affluent ou une source souterraine. Les zones humides constituent souvent un milieu tampon en stockant l'eau qui peut ensuite servir à alimenter une rivière, un lac ou une nappe souterraine¹⁶⁸.

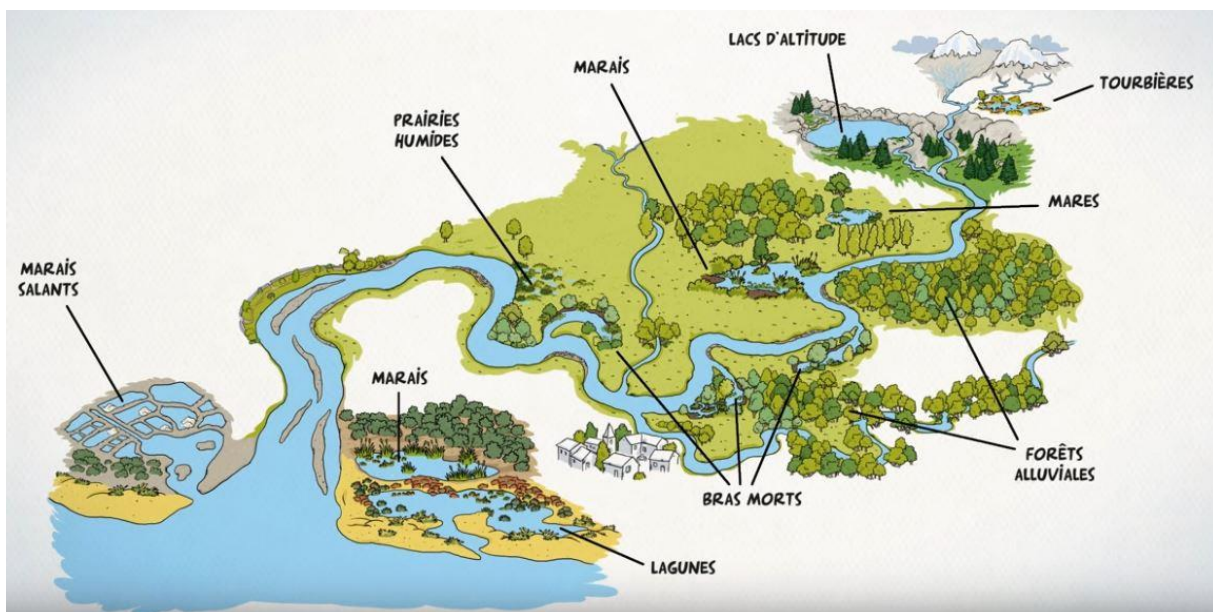


Figure 13. Différents types de zones humides. Extrait de 'Zones humides, zones utiles' – AERMC, 2016.

Les rivières sont particulièrement contaminées par différents pathogènes car elles reçoivent souvent les rejets de STEU. Le niveau de contamination des eaux de surface est donc logiquement corrélé au niveau d'anthropisation avec des concentrations en BMR plus importantes en aval qu'en amont des STEU¹⁷⁰.

Ainsi, on retrouve fréquemment des BMR et des gènes de résistance associés à la colonisation ou aux infections humaines dans les eaux de surface. Par exemple, la majorité des gènes *bla* liés à *E. coli* ou *K. pneumoniae* diffusant chez les humains ou chez les animaux ont également été identifiés dans les eaux de surface^{159,171}. Dans une étude réalisée aux Pays-Bas, *bla*_{CTX-M-15} et *bla*_{CTX-M-1} étaient les deux gènes les plus fréquemment observés chez les Ec-BLSE¹⁷². Une autre étude néerlandaise qui a rassemblé les résultats de projets portant sur les Ec-BLSE dans les différents réservoirs a montré que *bla*_{CTX-M-15} est le gène majoritaire pour les Ec-BLSE isolés dans l'eau et qu'il existe une concordance entre les isolats humains, des eaux usées et des eaux de surface, confirmant ainsi le rôle des STEU dans la dissémination des BMR⁴⁹. Une autre étude a montré que *bla*_{CTX-M-15} était majoritaire dans les Ec-BLSE et les Kp-BLSE collectés tout le long du Danube (en Allemagne, Autriche, Bulgarie, Croatie, Hongrie, Serbie, Roumanie)¹⁷³. Une étude française a montré que la prévalence des Ec-BLSE augmente près des zones de rejets des STEU¹⁷⁴. Parmi les clones isolés, on retrouve les clones fréquemment isolés d'infections humaines comme ST131 ou ST15, respectivement chez *E. coli* et *K. pneumoniae*. On notera également que la concentration de BMR peut être plus élevée en cas de fortes précipitations. Les déversoirs d'orage sont des bassins servant à stocker les eaux à traiter par la STEU lorsque le débit est trop élevé. En cas de trop fortes précipitations, la quantité d'eau entrante peut dépasser la capacité maximale des déversoirs d'orage et les eaux en surplus vont être relarguées dans le milieu récepteur sans être traitées^{175,176}. Des contaminations des eaux de surface peuvent également survenir si les législations concernant l'épandage des boues de STEU ne sont pas respectées. Il est en effet interdit d'épandre lorsque les sols sont gelés, enneigés ou pendant de fortes précipitations car l'eau peut se contaminer via les boues et ruisseler jusqu'à la rivière¹⁷⁷.

3.1.8.4 Animaux sauvages

La présence d'EBLSE a également été rapportée chez les animaux sauvages et notamment chez un nombre important d'espèces d'oiseaux. Les gènes *bla* identifiés sont variés et les gènes *bla*_{CTX-M-1} et *bla*_{CTX-M-15} sont les deux gènes prédominants chez les animaux sauvages. De plus, il est intéressant de constater que des clones comme *E. coli* ST131 et *K. pneumoniae* ST11 ont été identifiés chez les animaux sauvages¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Les animaux sauvages vivant près des humains ou qui ont tendance à chercher leur nourriture dans les villes ont plus de chances d'être porteurs de bactéries résistantes aux antibiotiques¹⁷⁸.

3.1.9 Diffusion des EBLSE chez les animaux de rente et dans la nourriture

La présence d'EBLSE chez les animaux de rente (bovins, porcs, poulets) et dans la viande issue de ces élevages est fréquente. La nourriture contaminée pourrait constituer une voie d'acquisition d'EBLSE pour les consommateurs^{181,182}.

Dans le réservoir animal, les gènes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM-52} et *bla*_{SHV-12} prédominent¹⁸³⁻¹⁸⁵. Ces gènes codant pour des BLSE sont souvent plasmidiques. Chez *E. coli*, les groupes IncF, IncI1, IncN et IncHI1 sont décrits comme prédominants dans les isolats d'origine animale ou de nourriture^{183,184,186,187}. Toujours chez *E. coli*, il a également été montré que certains groupes Inc sont plus fréquemment associés à certains clones et certains gènes *bla*. Par exemple, des études européennes sur les poulets et la viande de poulet ont montré que les plasmides du groupe IncI1 associés aux clones ST3 et ST7 sont associés au gène *bla*_{CTX-M-1} alors que les clones ST5 et ST36 sont respectivement associés aux gènes *bla*_{SHV-12} et *bla*_{TEM-52}¹⁸⁵. Une étude a montré qu'au Liban, l'enzyme CTX-M-15 était prédominante (64,5%) parmi des isolats d'Ec-BLSE collectés chez des bovins¹⁸⁸. Aux Pays-Bas, la contamination des animaux d'élevage par des isolats de *E. coli* producteurs de BLSE/AmpC a été surveillée entre 2007 et 2017. Les analyses de fèces de poulets, de bovins, de porcs, de dindes, de canards et de veaux ont permis de collecter 2087 isolats de *E. coli* possédant des gènes codant pour des BLSE/AmpC. L'identification de ces gènes a montré que *bla*_{CTX-M-1} était prédominant et détecté dans 43,7% des isolats, suivi de *bla*_{CMY-2} (14,4%), *bla*_{TEM-52} et ses variants (9,7%), *bla*_{SHV-12} (7,6%) et *bla*_{CTX-M-15} (5,6%). Il est intéressant de noter que la combinaison du gène *bla*_{CTX-M-1} avec le groupe IncI1 était la plus fréquemment observée¹⁸⁹. Une autre étude a déterminé la contamination de veaux par Ec-BLSE et a montré que le gène *bla*_{CTX-M-1} était identifié dans >80% des isolats d'Ec-BLSE¹⁹⁰.

Les études comparant les isolats de *E. coli* producteurs de BLSE collectés à partir d'humains et d'animaux destinés à produire de la viande sont désormais nombreuses. Le constat est souvent le même : le ST131 est principalement associé aux humains mais d'autres STs et gènes *bla*_{BLSE} sont communs aux deux sources¹⁹¹. Ces liens concernent souvent les mêmes STs et les mêmes gènes de résistance. Par exemple, dans certains pays asiatiques comme la Chine, le Japon, l'enzyme CTX-M-14 est trouvée dans les isolats de *E. coli* collectés à partir d'animaux de compagnie, de volaille et à partir de selles humaines, indiquant une possible contamination croisée entre les animaux et les humains¹⁸².

En Europe, la situation est globalement différente : l'enzyme CTX-M-1 est la plus fréquemment identifiée dans les isolats issus d'animaux, alors qu'elle est beaucoup moins représentée chez

les humains, chez qui l'on retrouve plutôt l'enzyme CTX-M-15, peu présente dans les échantillons provenant des animaux. De plus, le gène *bla*_{CTX-M-15} est souvent associé aux plasmides du groupe IncF¹¹³.

Certaines études ont montré que les sources animales et humaines pouvaient partager les mêmes clones de *E. coli*, les mêmes gènes *bla*_{BLSE} et les mêmes plasmides¹⁹²⁻¹⁹⁴. Néanmoins, l'interface entre les humains et les animaux semble exister uniquement pour certains clones. Notons que le clone ST131, qui est le plus répandu chez les humains, est généralement absent des échantillons animaux¹⁸¹. Par contre, d'autres clones, comme ST38, ST88 et plus particulièrement ST10 sont fréquemment isolés dans les différents réservoirs¹⁹⁵. Dans une étude récente réalisée au Vietnam, des isolats d'Ec-BLSE ont été cultivés à partir d'urines de patients, de poulets et de cochons vivants et abattus et de l'environnement des abattoirs. Sur les 235 Ec-BLSE collectés, quatre isolats appartenaient au ST10 ; ces isolats ont été comparés à 18 autres ST10 collectés à différents endroits du globe à partir de différentes sources (humains, poulets, bétail). Les analyses de cgMLST ont montré que les *core genome* des isolats de ST10 de sources humaines et non humaines créaient des clusters distincts, suggérant l'existence de sous-clones de ST10 adaptés aux différents réservoirs¹⁹⁶.

La diffusion de la résistance chez les animaux est, comme chez les humains, majoritairement causée par une utilisation excessive et souvent inappropriée des antibiotiques^{197,198}. Depuis quelques années, des mesures ont été mises en place afin de réduire cette consommation antibiotique¹⁹⁹. Dans certains pays comme en France ou aux Pays-Bas, la consommation d'antibiotiques en médecine vétérinaire pour les animaux servant à produire de la nourriture a diminué entre 2010 et 2017, passant de 136 mg/PCU (*population correction unit*) à 68,6 mg/PCU en France et de 146,1 mg/PCU à 56,3 mg/PCU aux Pays-Bas. En revanche, pour d'autres pays, comme Chypre ou l'Espagne, la consommation n'a pas diminué (Figure 14)²⁰⁰.

La contamination des fruits et des légumes par les EBLSE est moins fréquente²⁰¹⁻²⁰⁴. Certaines études rapportent des cas de contamination par EBLSE, notamment par *E. coli*. En revanche, le taux de contamination est généralement inférieur à 10%. Parmi les différentes études, les gènes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14} ou encore *bla*_{SHV-12} ont été identifiés²⁰¹⁻²⁰⁴. Les possibles origines de contamination sont l'eau utilisée pour l'irrigation, les sols qui peuvent être contaminés et une contamination directe par les humains lorsque les fruits et légumes sont cueillis, transportés puis vendus^{202,205}.

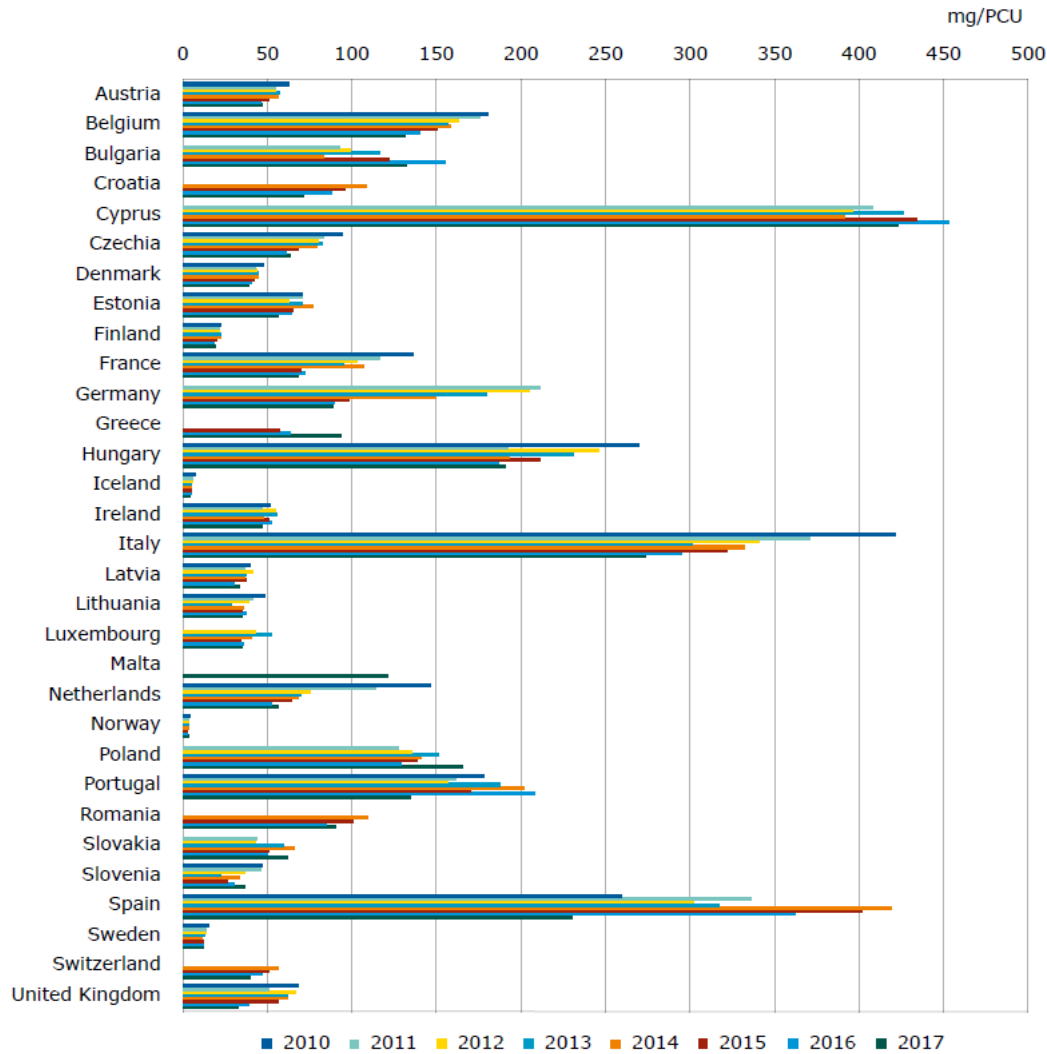


Figure 14. Ventes totales d'antimicrobiens en médecine vétérinaire pour les animaux servant à produire des aliments, en mg/PCU, par pays, de 2010 à 2017. PCU : *Population correction unit* ; les PCU servent à normaliser les quantités d'agents antimicrobiens vétérinaires vendues dans les différents pays par la population animale qui risque d'être traitée avec des antimicrobiens dans chaque pays. D'après le rapport EMA sur les ventes d'agents antimicrobiens vétérinaires dans 31 pays européens en 2017²⁰⁰.

3.1.10 Origine des EBLSE infectant ou colonisant l'humain

Dans la communauté, les humains sont exposés à de nombreuses sources de contamination bactérienne. Les sources d'acquisition des bactéries et donc des EBLSE peuvent être environnementales, liées à la consommation de nourriture, liées aux animaux et surtout liées à d'autres humains⁵⁹. Certains individus sont par ailleurs plus à risque que d'autres. C'est notamment le cas des personnes voyageant dans des pays où la prévalence des EBLSE est plus élevée²⁰⁶. Dans une étude de modélisation, Mughini-Gras *et al.* ont collecté des données publiées entre 2005 et 2017 aux Pays-Bas et ont déterminé la prévalence des isolats de *E. coli*

producteurs de BLSE et de céphalosporinases codées par des gènes plasmidiques (pAmpC, par exemple CMY et DHA) dans chaque réservoir et l'exposition humaine à partir d'une collection de 7495 isolats collectés⁵⁹. Les résultats montrent que la prévalence d'Ec-BLSE est la plus élevée chez les poulets et dans la viande de poulet. Si on s'intéresse à l'exposition des humains aux Ec-BLSE, on se rend compte que les humains sont fortement exposés via les légumes et quasiment tous les types de viandes. En revanche, les humains sont encore plus fortement exposés lors de contacts avec d'autres humains (Figure 15).

Cette étude montre que 67% des acquisitions d'Ec-BLSE dans la communauté sont attribuables aux transmissions interhumaines et aux transmissions avec des individus à risque comme les voyageurs. Les acquisitions via les animaux de compagnie représenteraient 7,9% des acquisitions. Les baignades en eaux douces seraient responsables de seulement 2,3% des acquisitions d'Ec-BLSE. Une autre étude s'est intéressée aux risques liés à la baignade et montre que les surfeurs sont plus à risque d'ingérer des isolats d'*E. coli* producteurs de CTX-M et ont plus de risque d'être colonisés par ces isolats²⁰⁷. Dans l'étude de Mughini-Gras *et al.*, les acquisitions via la nourriture ne sont pas négligeables et représenteraient 18,9% des acquisitions d'Ec-BLSE. Dans cette même étude, les probabilités d'acquisition ont ensuite été détaillées pour chaque gène associé à une BLSE ou une pAmpC⁵⁹. Les résultats montrent que les enzymes CTX-M-15, CTX-M-14 et CTX-M-27 sont fortement associées aux transmissions interhumaines avec respectivement 70%, 83% et 84% des occurrences attribuées aux porteurs dans la communauté. Quasiment la moitié des acquisitions de CTX-M-1 chez les humains seraient également attribuables aux contacts humains (45%) alors que la viande de poulet serait responsable de 9% des acquisitions de CTX-M-1⁵⁹.

La nourriture (et surtout la viande) étant une voie d'acquisition supposée des EBLSE pour les humains, Meijs *et al.* ont cherché si les végétariens étaient moins à risque d'être porteurs d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE que les non végétariens. Leurs résultats montrent cependant que les végétariens ne présentaient pas un risque plus faible de portage de d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE par rapport aux non-végétariens, suggérant que la consommation de viande n'est pas un facteur de risque de portage²⁰⁸. Dans une étude conduite au Liban, 27,9% des échantillons de lait collectés dans différentes fermes étaient contaminés par Kp-BLSE et 30,2% produisaient l'enzyme CTX-M-15²⁰⁹. Le lait étant souvent consommé cru, le risque d'acquisition de Kp-BLSE pourrait être plus important que par la viande.

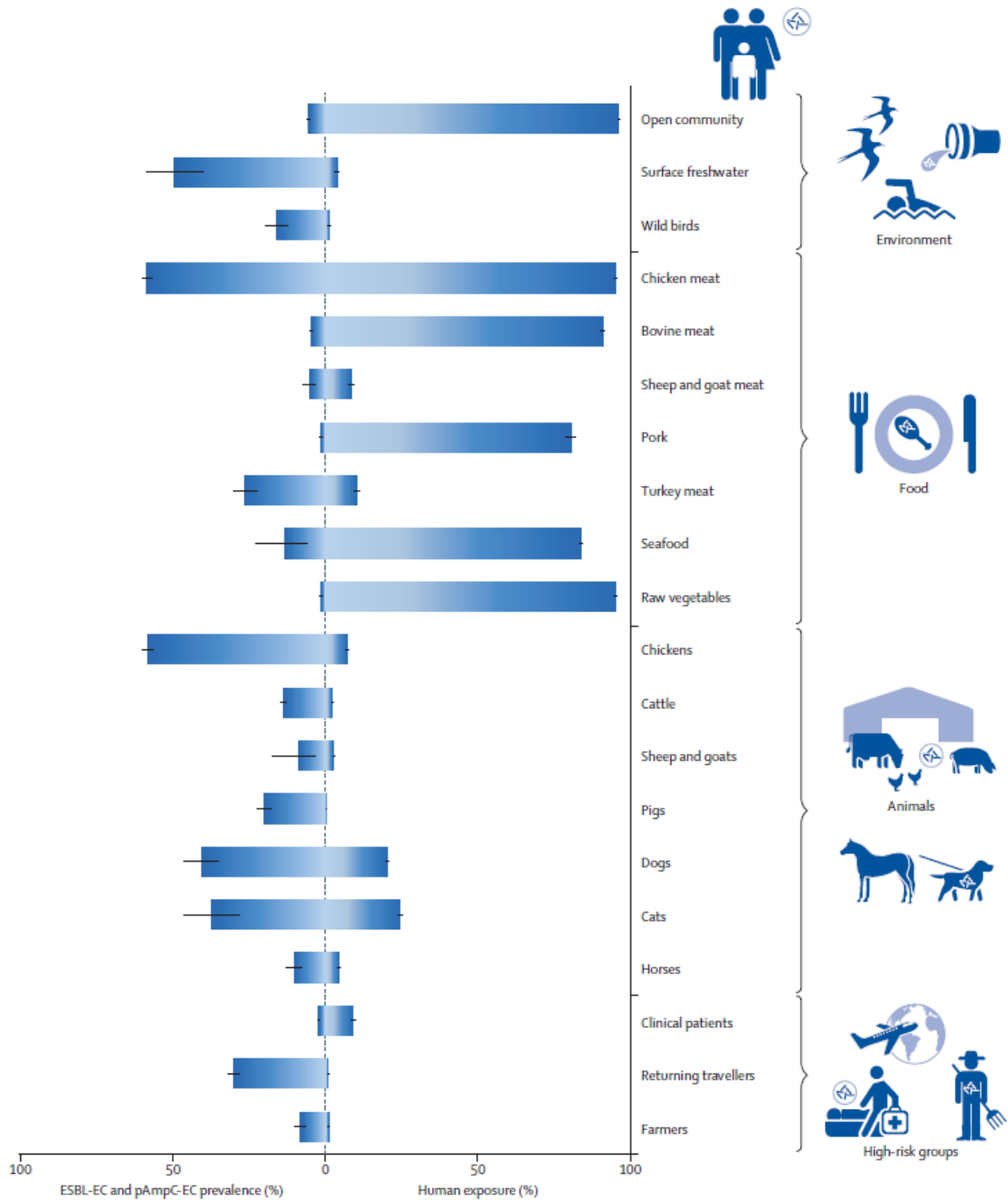


Figure 15. Prévalence des isolats de *E. coli* producteurs de BLSE et de pAmpC dans chaque source et probabilité d'exposition de la communauté à chaque source. D'après Mughini-Gras *et al.*⁵⁹.

De nombreuses études ont supposé que la nourriture et notamment la viande était une voie d'acquisition majeure d'EBLSE pour les humains¹⁹¹. Cependant, nombre de ces études étaient fondées uniquement sur des données de typage MLST. Ces dernières années, le développement des techniques WGS a permis de mieux comprendre la propagation des EBLSE grâce à des analyses phylogénétiques plus précises et à l'identification des gènes *bla*_{BLSE} qui peuvent être acquis horizontalement par des éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides¹⁰¹.

Aujourd'hui, les études effectuent généralement un screening sur des nombres importants d'isolats et sont basées sur des données de WGS. Quelques études ont montré que les populations bactériennes retrouvées dans la nourriture et chez les humains étaient différentes^{46,48,196}. Ces études montrent généralement que, bien que des STs soient communs, les distances génétiques entre les isolats collectés dans la nourriture et chez les humains sont élevées et que les éléments génétiques sur lesquels sont localisés les gènes *bla*_{BLSE} sont différents. D'autres études, conduites dans des pays en voie de développement, suggèrent que des transmissions entre les réservoirs ont lieu^{210,211}. Une autre étude réalisée sur l'île de Zanzibar (Tanzanie) montre que certains isolats d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE collectés à partir de volaille, de viande de poulet et de humains partagent les mêmes gènes *bla*_{BLSE} et ont des distances génétiques faibles suggérant une transmission entre le réservoir animal et les humains. Cependant, le faible nombre d'isolats séquencés dans cette étude empêche de jauger l'importance de ces événements²¹¹.

3.1.11 Objectifs des études

Dans le cadre du projet JPI-AMR MODERN, l'objectif du WP3 était de comparer les populations d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE présentes dans la nourriture et dans les eaux usées de cinq villes européennes. Les eaux usées ont été utilisées comme proxy de la contamination humaine afin de voir dans quelle mesure la nourriture constituait une voie d'acquisition d'EBLSE pour les humains en Europe de l'Ouest. Les isolats collectés dans les cinq villes européennes ont été séquencés par WGS afin de comparer leurs gènes *bla*_{BLSE} et leurs *core genome* en fonction du réservoir. Cette étude a été publiée dans *Clinical Microbiology and Infection* en 2021.

L'objectif de la seconde étude était de déterminer si les souches d'*E. coli* d'origine humaine contaminaient des milieux peu anthropisés comme les zones humides. Nous avons caractérisé les phylogroupes, la MLST et les gènes *bla*_{BLSE} d'isolats d'*E. coli* collectés dans des zones humides et nous les avons comparés à des isolats fréquemment retrouvés en clinique. Cette étude a été publiée dans *Frontiers in Microbiology* en 2020.

3.2 Résultats

3.2.1 Comparaison des populations d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE dans l'environnement pollué par l'homme et dans la nourriture : une étude multicentrique européenne

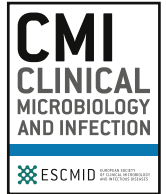
Résumé

Les EBLSE se sont répandues dans le monde entier au cours des deux dernières décennies et ont contaminé les aliments, les humains, les animaux et l'environnement. Cependant, les liens entre les différents réservoirs restent flous. Ici, nous avons évalué dans quelle mesure la nourriture constituait une voie d'acquisition d'EBLSE pour les humains dans cinq villes européennes. Nous avons prélevé 122 échantillons d'eaux usées (égouts, STEU et rivières polluées, comme indicateur de la contamination humaine) et 714 produits alimentaires à Besançon (France), Genève (Suisse), Séville (Espagne), Tübingen (Allemagne) et Utrecht (Pays-Bas). Nous avons collecté un total de 254 isolats d'Ec-BLSE et 39 Kp-BLSE. Tous les génomes ont été entièrement séquencés afin de comparer la distribution des STs, les *core genome* et la distribution des gènes *bla*_{BLSE} et de leurs supports génétiques (chromosome ou plasmide). Les données de séquençage ont révélé que les isolats d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE provenant des eaux usées étaient génétiquement différents de ceux contaminant la nourriture. Le clone Ec-BLSE ST131 était majoritaire dans les eaux usées, mais absent dans les échantillons de nourriture testés. Le clone Ec-BLSE ST10 était présent dans des proportions similaires dans les eaux usées et dans la nourriture, mais il portait gènes *bla*_{BLSE} différents. Les gènes *bla*_{CTX-M-1} et *bla*_{SHV-12} prédominaient dans les isolats d'Ec-BLSE liés à la nourriture, tandis que *bla*_{CTX-M-15} et *bla*_{CTX-M-27} prédominaient dans les isolats collectés dans les eaux usées. Globalement, nous avons montré que les liens entre les populations d'EBLSE et les gènes *bla*_{BLSE} étaient très limités entre les eaux usées et la nourriture. Ces résultats suggèrent que la contamination interhumaine, plutôt que nourriture, est probablement la voie la plus fréquente de transmission des EBLSE dans les pays développés.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Original article

Populations of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are different in human-polluted environment and food items: a multicentre European study

Daniel Martak^{1,2,*}, Julia Guther³, Tess D. Verschuuren⁴, Benoit Valot², Nadine Conzelmann⁵, Stefanie Bunk⁵, M. Eugenia Riccio⁶, Elena Salamanca⁷, Alexandre Meunier¹, Charles P. Henriot², Caroline Pressacco Brossier⁶, Xavier Bertrand^{1,2}, Ben S. Cooper⁸, Stephan Harbarth⁶, Evelina Tacconelli^{5,9}, Ad C. Fluit¹⁰, Jesús Rodríguez-Baño⁷, Jan A.J.W. Kluytmans^{4,11}, Silke Peter³, Didier Hocquet^{1,2,12}, on behalf of the MODERN WP3 study group

¹ Infection Control Unit, University Hospital of Besançon, Besançon, France

² UMR 6249, Laboratoire Chrono-environnement, CNRS-Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

³ Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University Hospital Tübingen, Tübingen, Germany

⁴ Julius Centre for Health Sciences and Primary Care, University Medical Centre Utrecht, Utrecht, the Netherlands

⁵ Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine I, University Hospital Tübingen, Tübingen, Germany

⁶ Infection Control Program, Geneva University Hospital and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland

⁷ Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, University Hospital Virgen Macarena and Department of Medicine, University of Sevilla / Biomedicines Institute of Sevilla (IBiS), Sevilla, Spain

⁸ Centre for Tropical Medicine & Global Health, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, United Kingdom

⁹ Infectious Diseases, Department of Diagnostics and Public Health, University of Verona, Italy

¹⁰ Department of Medical Microbiology, University Medical Centre Utrecht, Utrecht, the Netherlands

¹¹ Amphibia Hospital Breda, Microvida Laboratory for Medical Microbiology, Breda, the Netherlands

¹² Centre de Ressources Biologiques - Filière Microbiologique de Besançon, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2021

Received in revised form

15 July 2021

Accepted 18 July 2021

Available online xxx

Editor: E.J. Kuipers

Keywords:

Extended-spectrum β -lactamase

Environment

Escherichia coli

Food

Klebsiella pneumoniae

ABSTRACT

Objectives: To assess the extent to which food items are a source of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) -producing *Escherichia coli* (ESBL-Ec) and ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-Kp) for humans in five European cities.

Methods: We sampled 122 human polluted (hp)-environments (sewers and polluted rivers, as a proxy of human contamination) and 714 food items in Besançon (France), Geneva (Switzerland), Sevilla (Spain), Tübingen (Germany) and Utrecht (The Netherlands). A total of 254 ESBL-Ec and 39 ESBL-Kp isolates were cultured. All genomes were fully sequenced to compare their sequence types (ST) and core genomes, along with the distribution of *bla*_{ESBL} genes and their genetic supports (i.e. chromosome or plasmid).

Results: Sequence data revealed that ESBL-Ec and ESBL-Kp isolates from hp-environments were genetically different from those contaminating food items. ESBL-Ec ST131 was widespread in the hp-environment (21.5% of the isolates) but absent from the food items tested. ESBL-Ec ST10 was in similar proportions in hp-environments and food items (15 and 10 isolates, respectively) but mostly carried reservoir-specific *bla*_{ESBL}, *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{SHV-12} predominated in food-related *E. coli* isolates (32% and 34% of the isolates, respectively), whereas *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-27} predominated in isolates from hp-environments (52% and 15% of the isolates, respectively).

Conclusions: We found a very limited connection between ESBL-Ec and ESBL-Kp populations retrieved in food items and from hp-environments and *bla*_{ESBL}. This suggests that human-to-human contamination,

* Corresponding author: Daniel Martak, Laboratoire d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Régional Universitaire, 3 boulevard Fleming, Besançon, Cedex 25030, France.

E-mail address: martak.daniel@gmail.com (D. Martak).

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.07.022>

1198-743X/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article as: Martak D et al., Populations of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are different in human-polluted environment and food items: a multicentre European study, *Clinical Microbiology and Infection*, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.07.022>

rather than the food chain, is possibly the most frequent route of ESBL-Ec and ESBL-Kp transmission in high-income countries. **Daniel Martak, *Clin Microbiol Infect* 2021;•:1**

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Antimicrobial resistance is a global health issue and extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacterales* (ESBL-PE) are a major cause of antimicrobial resistance dissemination. *Escherichia coli* (ESBL-Ec) and *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-Kp) are the two major ESBL-PE species causing infections in humans with third-generation cephalosporin-resistant bacteria, limiting therapeutic options for patients [1]. ESBL-PE carriage by healthy people is frequent, with a prevalence of ~10% in Europe [2]. In addition, some populations, such as those found in long-term care facilities (LTCFs), are at higher risk of colonization and infection [3]. ESBL-PE have also been widely reported in slaughter animals [4], associated with a large proportion of the derived retail meat being contaminated with these antibiotic-resistant pathogens. To a lesser extent, ESBL-PE can also be found in fresh vegetables [5,6]. Sewage systems bring ESBL-PE found in human faeces to the surface water [7]. There are many routes for ESBL-PE dissemination and the One Health concept supports the idea that bacterial populations found in animals, humans and the environment are heavily interconnected [8]. However, the extent of transmission between these compartments remains uncertain, especially in high-income countries where hygiene standards probably limit the contamination from non-human sources [9]. In particular, the role of the food chain is under debate [9–12].

Most studies neglect ESBL-Kp, which also contaminates food items [13] and is responsible for an important burden in humans [14] with a rate of human-to-human transmission higher than that of ESBL-Ec [15].

The exact identification of the route of contamination of an individual is nearly impossible to establish and requires the use of population-level proxies. In European countries, human-polluted (hp-) environments, and especially wastewaters, constitute a good proxy of human contamination [10,16,17].

To estimate the contribution of food-borne ESBL-Ec and ESBL-Kp to human colonization, we used whole genome sequences to assess the genetic relationships, and compared the identity of *bla*_{ESBL} between the isolates from retail food and from hp-environments in five European cities.

Materials and methods

Study design

We conducted a multicentre study involving five European cities: Besançon (France), Geneva (Switzerland), Sevilla (Spain), Tübingen (Germany) and Utrecht (The Netherlands). We collected samples of food products and from the hp-environment between January 2018 and August 2019, as part of the multicentre MODERN project. Samples from food products and hp-environment were collected within a prospective cohort study of ESBL-Ec and ESBL-Kp carriage in four LTCFs (manuscript in preparation) and during a 4-month follow up of ESBL-Ec and ESBL-Kp carriers after hospital discharge [15].

Food and environmental samples

The contamination by ESBL-Ec or ESBL-Kp was assessed in 714 food samples collected in LTCF kitchens before any processing (representing collective catering) and in 35 supermarkets located in or nearby each study site representing food bought by ESBL-PE carriers [18] (see Supplementary material, [Appendix S1](#)). The contamination of the hp-environment by ESBL-Ec or ESBL-Kp was assessed by collecting samples ($n = 122$) eight times over a 32-week period in (a) the LTCF discharge sewer, (b) the inflow of the downstream wastewater treatment plant (WWTP), and (c) the river 200 m downstream of the WWTP outflow and >5 m from the riverbank (see Supplementary materials, [Appendix S1](#)).

Microbiological analysis

For food samples, 25 g of meat or vegetables were incubated overnight at 35°C in 250 mL of tryptic soy broth supplemented with 8 mg/L vancomycin and 0.25 mg/L cefotaxime. Then, 100 μ L were streaked on ESBL-specific plates (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and incubated overnight at 35°C.

Samples from WWTPs were diluted 1:10 in sterile water, 10 μ L and 100 μ L were streaked on ESBL-specific plates and incubated overnight at 35°C. One hundred millilitres of river and LTCF sewage samples were filtered on a 0.45- μ m filter deposited on ESBL-specific plates and incubated overnight at 35°C.

Bacterial colonies suspected to be *E. coli* or *K. pneumoniae* were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (Microflex LT, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) with a log value ≥ 2 according to the manufacturer's recommendations. We kept a maximum of three *E. coli* or *K. pneumoniae* isolates with different morphotypes per sample. ESBL production was confirmed by double-disc synergy tests (DDST20 and DDST30) as recommended by EUCAST [19]. All isolates were stored in bead-containing cryotubes (Microbank, PRO-LAB Diagnostics, Richmond Hill, ON, Canada) at -80°C until further analysis.

Genome sequencing and analysis

Bacterial DNA extraction and sequencing, read assembly, determination of sequence types (STs) with *in silico* multi-locus sequence typing (MLST), *bla*_{ESBL} identification and the identification of incompatibility (Inc) groups of plasmids are detailed in the Supplementary material ([Appendix S1](#)).

Core genomes of ESBL-Ec and ESBL-Kp isolates were determined using existing schemes (<https://www.cgmlst.org/ncs>). The home-made pipeline pyMLST analysed the cgMLST (<https://github.com/bvalot/pyMLST>) by aligning genes present in >95% of the isolates and phylogenetic trees were then constructed (see Supplementary materials ([Appendix S1](#))). A network was built with the package IGRAPH on R 3.6.2 software to link genetically related ESBL-Ec, the genomes of which were distant by fewer than ten genes.

Statistical analysis

The proportions of food samples contaminated by ESBL-Ec and ESBL-Kp were compared with non-parametric tests (Kruskal–Wallis test coupled with a post-hoc Dunn test). We then performed a test of equal proportions to determine in which cases the contamination was higher or lower. The distribution and association of *bla*_{ESBL} genes and plasmid incompatibility groups was also assessed. The α value was set to 0.05. All analyses were performed with R 3.6.2 software (R Core Team Package 2019).

Results

ESBL-Ec and ESBL-Kp isolated from food and hp-environment

We obtained 265 food samples from the LTCF kitchens and 449 food samples from 35 supermarkets (Table 1). Overall, ESBL-Ec or ESBL-Kp contaminated 26.7% (93/349) of the meat samples and 1.9% (7/365) of the vegetable samples. Among these samples, chicken (33.2% positive; $n = 63$) and turkey (75.0% positive; $n = 20$) were more frequently contaminated than other types of food products ($p \leq 2e-16$; Table 1). We also collected 122 samples from hp-environment (Table 1). We retrieved 293 isolates: 254 ESBL-Ec and 39 ESBL-Kp. The contamination of food samples by ESBL-Kp was infrequent with only 12 isolates retrieved in the 714 samples analysed (Table 1). Except for two chicken samples, all other food samples positive for ESBL-Kp came from Tübingen. The country-specific distribution of positive samples is shown in the Supplementary material (Table S1).

Genomic comparison of ESBL-producing *E. coli* cultured from food and hp-environment

The 254 ESBL-Ec isolated from food ($n = 96$) and hp-environment ($n = 158$) were distributed into 77 different STs (Table 2). Twenty-two and 45 STs were exclusively represented by isolates found in food and in hp-environment, respectively. In contrast, 10 STs (99/254 isolates) were found in both food and hp-environment samples (Table 2). ST131 was specifically found in samples of the hp-environment where it accounted for 21.5% of total ESBL-Ec.

We assessed the genetic relatedness of ESBL-Ec isolates retrieved from food and hp-environment by constructing a Bio Neighbour Joining tree from the 254 genomes. It showed that although the genomes of isolates cultured from food and hp-environment were intermixed in the tree, the cgMLST distances were generally high between the two reservoirs (Fig. 1). We identified only five clusters that contained ESBL-Ec isolates from both hp-environment and food, having a cgMLST distance <40 genes. They were represented by ten genomes of ESBL-Ec from the hp-environment and seven genomes of ESBL-Ec from food (see the green sectors in Fig. 1).

To evaluate the interconnections between the ESBL-Ec populations contaminating food and hp-environment, we built a network linking reservoirs with ESBL-Ec isolates whose genomes had a cgMLST distance <10 genes (Fig. 2). To define the cut-off value under which genomes were considered as genetically related, we created epidemiological groups based on the cities of isolation of the ESBL-Ec, considering that links between cities were epidemiologically unlikely. We then built networks that link the different sources: two sources were linked if each of them included at least one genome having less than 10, 15, 20, 30 or 40 differences in core genes. We then counted the number of unlikely links for each cut-off value. The cut-off value of 10, confirming previous findings [20], was chosen because it minimized the number of mistakenly connected compartments (see Supplementary material, Fig. S1).

Most of the links connected sources of the same type (food or hp-environment) and from the same city. Indeed, we found 15 clusters of hp-environment isolates, one cluster of nine isolates, one of five isolates, and 13 clusters of two isolates. Besides, there were 20 clusters of food isolates, one cluster of seven isolates, two of five isolates, four of three isolates and 13 of two isolates). The only link between the two compartments involved genomes of three meat-contaminating isolates and that of an isolate found in the receiving river in Tübingen (Fig. 2).

*bla*_{ESBL} distribution in *E. coli* cultured from food and hp-environment

Thirteen different *bla*_{ESBL} were identified. *bla*_{SHV-2} was specific to food-related isolates while *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-24} and *bla*_{CTX-M-65} were specific to isolates from hp-environments (see Supplementary material, Fig. S2). *bla*_{SHV-12} and *bla*_{CTX-M-1} were

Table 1

Contamination of food and human-polluted environment with ESBL-Ec and ESBL-Kp (Europe, 2018–2019)

	No. of samples	Positives (%)	ESBL-Ec	ESBL-Kp
Food samples				
Beef	61	4 (6.6)	4	0
Pork	51	3 (8.9)	3	0
Chicken	190	63 (33.2)	64	3
Fish	18	2 (11.1)	3	0
Turkey	28	21 (75.0)	16	8
Lamb	1	0	0	0
Overall meat/fish	349	93 (26.7)	90	11
Vegetables	365	7 (1.9)	6	1
Food total	714	100 (14.0)	96	12
Hp-environment				
LTCF sewages	30	22 (73.3)	19	10
WWTP inflows	40	40 (100)	66	8
Rivers downstream WWTPs	52	47 (90.4)	73	9
Hp-environment total	122	109 (89.3)	158	27
Total	836	211	254	39

Abbreviations: ESBL-Ec, extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*; ESBL-Kp, extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*; hp-, human-polluted; LTCF, long-term care facility; WWTP, wastewater treatment plant.

The table shows the number and nature of food and hp-environment samples collected in the five European cities (Besançon, Geneva, Sevilla, Tübingen and Utrecht), the number and proportion of samples positive for ESBL-Ec or ESBL-Kp and the number of ESBL-Ec and ESBL-Kp isolated from each type of sample. The distribution of the samples according to the city of isolation is detailed in the Supplementary material (Table S1).

Table 2
Distribution of STs among extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* found in the human-polluted environment and food (Europe, 2018–2019)

All sources		Overall hp-environment		Overall food	
ST	n (%)	ST	n (%)	ST	n (%)
ST131	34 (13.4)	ST131	34 (21.5)	ST10	10 (11.5)
ST10	26 (10.2)	ST10	16 (9.5)	ST155	10 (10.4)
ST155	14 (5.5)	ST38	11 (7)	ST69	9 (9.4)
ST38	14 (5.5)	ST949	10 (6.3)	ST1011	6 (6.3)
ST69	13 (5.1)	ST58	9 (5.7)	ST354	5 (5.2)
ST58	13 (5.1)	ST1193	5 (3.2)	ST58	4 (4.2)
ST949	10 (3.9)	ST155	4 (2.5)	ST533	4 (4.2)
ST1011	6 (2.4)	ST69	4 (2.5)	ST117	4 (4.2)
ST354	5 (2.0)	ST1431	4 (2.5)	ST101	4 (4.2)
ST533	5 (2.0)	ST88	3 (1.9)	ST115	4 (4.2)
ST117	5 (2.0)	ST44	3 (1.9)	ST48	4 (4.2)
ST1193	5 (2.0)	ST3995	2 (1.3)	ST38	3 (3.1)
ST101	4 (1.6)	ST405	2 (1.3)	ST4981	2 (2.0)
ST115	4 (1.6)	ST410	2 (1.3)	ST1249	2 (2.0)
ST48	4 (1.6)	ST227	2 (1.3)	ST3519	2 (2.0)
ST88	4 (1.6)	ST23	2 (1.3)	ST4937	2 (2.0)
ST1431	4 (1.6)	ST752	2 (1.3)	ST602	2 (2.0)
ST4981	3 (1.2)	ST95	2 (1.3)	ST746	2 (2.0)
ST44	3 (1.2)	ST1123	2 (1.3)	ST398	2 (2.0)
ST1249	2 (0.8)	ST2253	2 (1.3)	ST7204	2 (2.0)
ST3519	2 (0.8)	ST34	2 (1.3)	Singletons	12 (12.5)
ST4937	2 (0.8)	ST3541	2 (1.3)	—	—
ST602	2 (0.8)	ST993	2 (1.3)	—	—
ST746	2 (0.8)	Singletons	32 (20.2)	—	—
ST398	2 (0.8)	—	—	—	—
ST7204	2 (0.8)	—	—	—	—
ST362	2 (0.8)	—	—	—	—
ST3995	2 (0.8)	—	—	—	—
ST405	2 (0.8)	—	—	—	—
ST410	2 (0.8)	—	—	—	—
ST227	2 (0.8)	—	—	—	—
ST23	2 (0.8)	—	—	—	—
ST752	2 (0.8)	—	—	—	—
ST95	2 (0.8)	—	—	—	—
ST1123	2 (0.8)	—	—	—	—
ST2253	2 (0.8)	—	—	—	—
ST34	2 (0.8)	—	—	—	—
ST3541	2 (0.8)	—	—	—	—
ST993	2 (0.8)	—	—	—	—
Singletons	38 (15.0)	—	—	—	—
Total	254		158		96

Abbreviations: Hp-environment, human-polluted environment; STs, sequence types.

more often associated with food-related isolates (34% and 32% of the isolates, respectively) compared with isolates from hp-environments (3%, $p = 1 \times 10^{-11}$ and 12% $p = 8 \times 10^{-5}$ of the isolates, respectively). *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-27} dominated in ESBL-Ec from hp-environments (52% and 15% of the isolates, respectively) in contrast with food-related ESBL-Ec (11%, $p = 1 \times 10^{-13}$ and 6% $p = 0.043$ of the isolates, respectively). Although we found the ST10 clone in similar proportions in the ESBL-Ec populations in food and in the hp-environment (11.5% and 9.5% of the isolates, respectively; $p = 0.62$), ST10 isolates generally harboured different *bla*_{ESBL} genes (11/15 hp-environment samples harboured *bla*_{CTX-M-15} whereas 1/10 food-related isolates harboured this gene). Moreover, we found only one hp-environment isolate belonging to ST10 that had <40 different core genes with two food isolates, with these three isolates being collected in distinct cities (Geneva, Besancon and Tübingen).

We then analysed the distribution of plasmid incompatibility groups and found that it was homogeneous among the ESBL-Ec isolates of the two reservoirs except for IncB/O/K/Z, which was more often associated with food-related isolates ($p = 3 \times 10^{-7}$), and IncFIA groups, which were more frequently found in isolates from the hp-environment ($p = 0.019$) (see Supplementary material, Table S2).

Comparison of genomes and *bla*_{ESBL} of ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates cultured from food and hp-environment

Among the 39 ESBL-Kp isolates retrieved in this study, 12 were found in food and 27 in the hp-environment. We identified 22 different STs, among which 16 were singletons. Eight STs were specific to the food, 13 were specific to hp-environment, and one ST was shared between the two reservoirs. Indeed, ST219 isolates were found in one river sample of Geneva and Sevilla and in two meat samples (one chicken and one turkey) in Tübingen. We built a maximum-likelihood tree to investigate the relatedness of all ESBL-Kp genomes (Fig. 3). Only the ST219 was found in both food and the hp-environment, but of different cities: two isolates collected from food products in Tübingen had <40 different core genes with one isolate collected in the river in Sevilla. We identified six different ESBL-encoding genes with an overrepresentation of *bla*_{CTX-M-15}, carried by 87.2% of the ESBL-Kp isolates (Fig. 3).

Discussion

We compared the genomes of ESBL-Ec and ESBL-Kp isolates cultured from food items (96 ESBL-Ec and 12 ESBL-Kp) with those from hp-environment (158 ESBL-Ec and 27 ESBL-Kp) in five

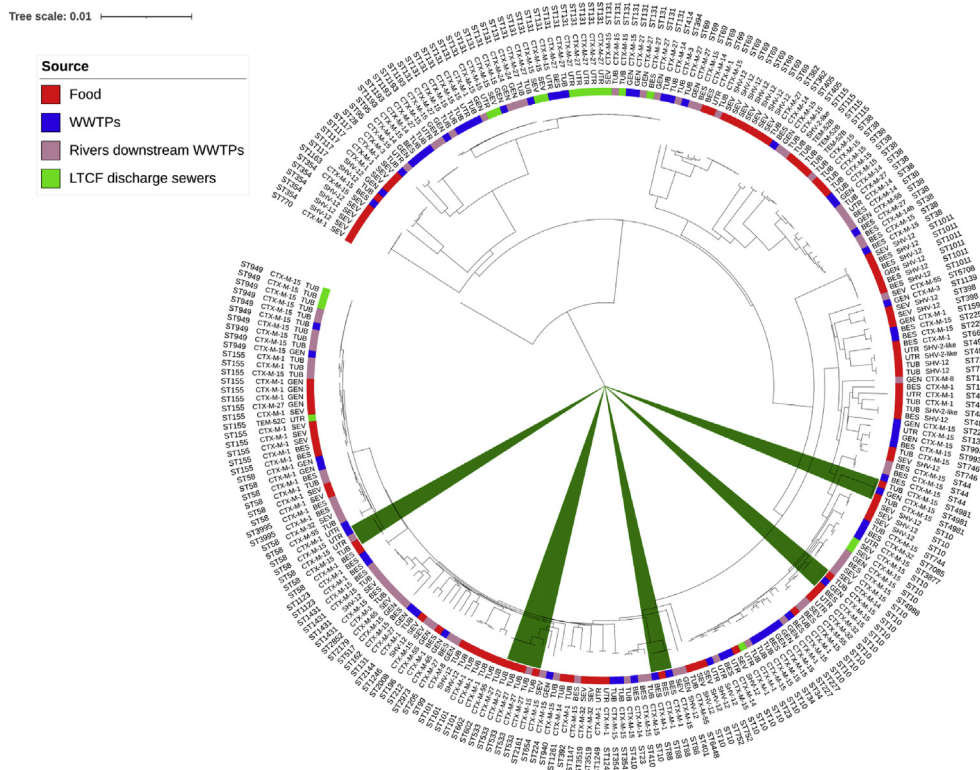


Fig. 1. Bio Neighbour Joining tree based on the core genome of the 254 extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-Ec) isolates cultured from food items and human-polluted (hp-) environment (Europe, 2018–2019). The tree was based on HKY85 distances calculated from the core genome constituted of 2275 genes. Sources: LTCF, long-term care facility; WWTP, wastewater treatment plant; city of isolation: TUB, Tübingen; BES, Besançon; SEV, Sevilla; UTR, Utrecht; GEN, Geneva; sequence types (STs) and *bla*_{ESBL} gene are indicated for each isolate. The yellow sectors indicate clusters of isolates retrieved from the same LTCF discharge sewer at different time-points. The green sectors indicate clusters of isolates which genomes had <40 different core genes.

European cities. The main finding of this international study was that the population of these ESBL-Ec and ESBL-Kp cultured from these two reservoirs were genetically different, and that ESBL-Ec generally had *bla*_{ESBL} genes of different nature.

Samples were collected in five European cities distributed from north to south in Western Europe to reflect the diversity of climate, food production and veterinary antibiotic consumption that could affect the contamination level of the different reservoirs by ESBL-PE. Our collection of ESBL-Ec found in hp-environment, dominated by ST131 and ST38 mostly carrying *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-27}, mirrored that of ESBL-Ec found in humans [10,16,17,21–23]. Similarly, we identified pandemic clones of ESBL-Kp (i.e. ST37, ST307) in the hp-environments. Food samples were gathered from LTCF kitchens and supermarkets to make the collection representative for most consumed food, both in collective catering and by ESBL-PE carriers [18] (Table 1, and see Supplementary material, Table S1). The contamination frequency of meat products and vegetables found in this study was consistent with those observed in the literature, with infrequent contamination of vegetables and more frequent contamination of poultry products [5,6,10,24].

The cgMLST analysis revealed that the populations of ESBL-Ec cultured from food and hp-environment are generally dissociated, with only six isolates out of 254 (four from food products and two from the hp-environment) that could be linked (Figs. 1 and 2). We found a majority of *bla*_{CTX-M-15} carriers among ESBL-Kp. The dominance of *bla*_{CTX-M-15} in wastewater and retail meat has been previously described [16,25]. The population of ESBL-Kp was mostly represented by distinct clones, with 22 different STs and with no linked isolates (i.e. which genomes had fewer than ten different core genes between the reservoirs). Overall, this suggests

that transmission of ESBL-Ec and ESBL-Kp strains from food items to humans is a rare event. This supports the idea that *E. coli* ST131 and other B2 clonal groups are not food-related and are mostly transmitted from human to human [10,15,24,26]. ST10 has been previously detected in humans, animals and in the environment [27]. Here, ESBL-Ec ST10 was equally distributed between food and the hp-environment but the isolates were genetically distinct and carried reservoir-specific *bla*_{ESBL} genes, which limits the chance of a common origin [12].

We further compared the distribution of *bla*_{ESBL} genes in isolates from food and hp-environment (see Supplementary material, Fig. S2) and found that 5 out of 13 genes were specific to a compartment. Among the other genes, *bla*_{SHV-12} and *bla*_{CTX-M-1} predominated in food isolates, as reported by others [22,26,28]. Overall, distinct *bla*_{ESBL} genes predominated in the two reservoirs. Plasmids carrying *bla*_{ESBL} can spread between phylogenetically distinct *E. coli* populations, possibly contributing to the human contamination with ESBL through the food chain [29]. It has been hypothesized that other food-related clones might serve as the source for plasmids or mobile genetic elements with resistance determinants to supply the major clone ST131, which is wide open for plasmid exchange [30]. Even if distinct genes predominated in the two reservoirs, plasmid reconstruction with long-read sequencing could help to identify transfer between the two reservoirs for the other genes.

We found here a limited concordance between the food and hp-environment reservoirs. This is in line with previous studies [10,12] but might appear as contrasting with a monocentric modelling study of the source distribution in a high-income country [9] where food products accounted for 18.9% of human contamination.

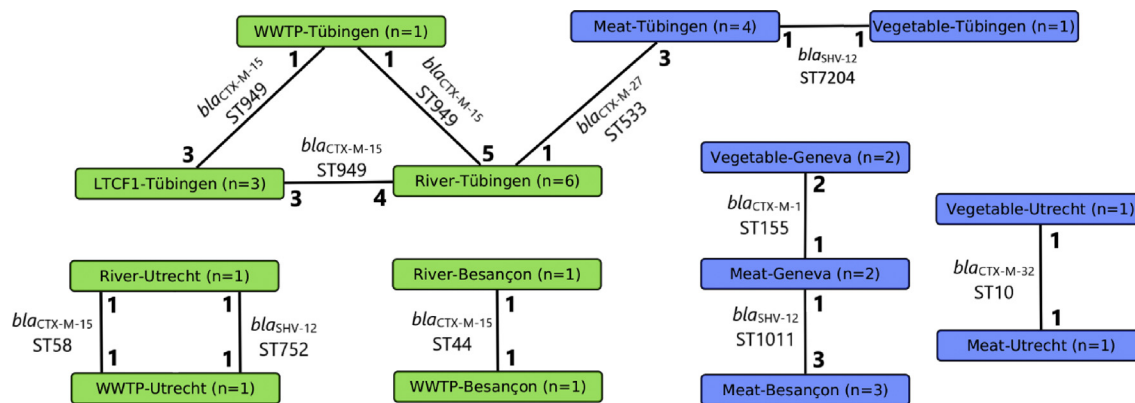


Fig. 2. Network analysis of the genomes of ESBL-Ec cultured from food and hp-environment (Europe, 2018–2019). The network connects the sources with ESBL-Ec which genomes had <10 core genes of difference. The rectangles represent the sources of the samples with hp-environments in green, food in blue (n = number of isolates of the source linked with isolate(s) of other sources). Only sources linked with ≥ 1 other source are shown. Figures indicate the number of ESBL-Ec genomes of the corresponding source linked to the other source. STs and bla_{ESBL} genes of the isolates linked are indicated.

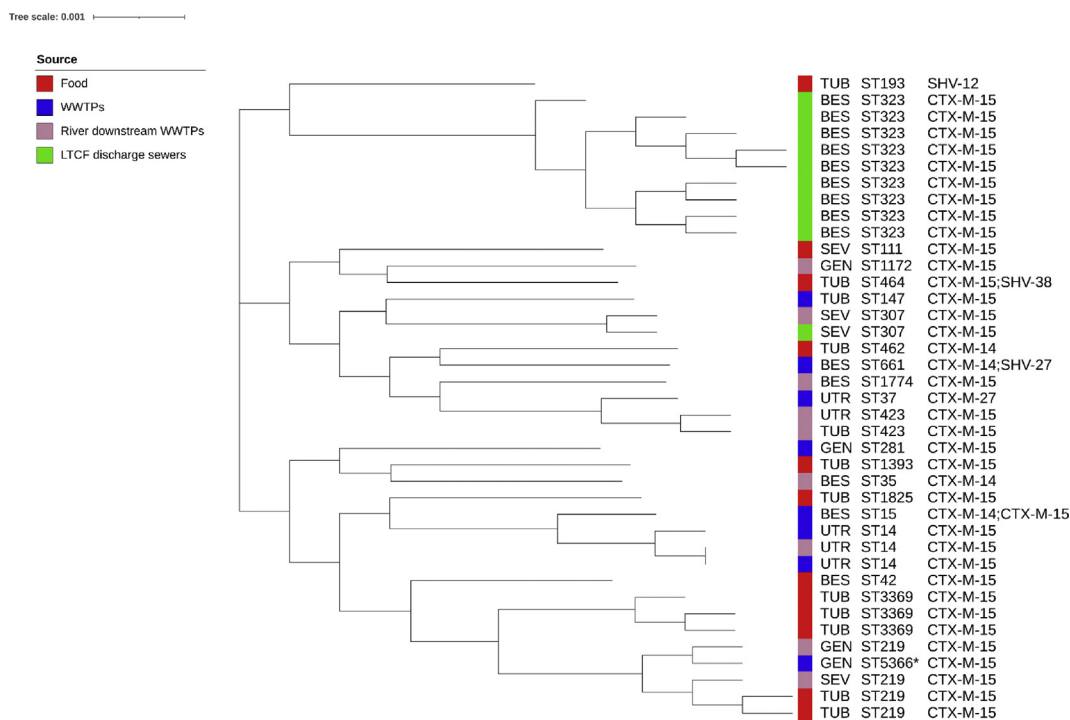


Fig. 3. Maximum likelihood tree based on single nucleotide polymorphisms in the core genes ($n = 2279$) of 39 *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamase cultured from food samples and human-polluted (hp-) environment (Europe, 2018–2019). Source: LTCF, long-term care facility; WWTP, wastewater treatment plant; city of isolation: TUB, Tübingen; BES, Besançon; SEV, Sevilla; UTR, Utrecht; GEN, Geneva. Sequence types (STs) and bla_{ESBL} gene(s) are indicated for each isolate. * only one mutation in allele *phoE* (A314G) differentiates ST5366 from ST219.

However, this contribution could have been overestimated because a model based on identity of *bla* genes was being used, while we also considered their bacterial vehicle. Although we cannot exclude the possibility of human colonization with food-borne ESBL-Ec and ESBL-Kp, our data suggest that, in Western Europe, human-to-human transmission plays a more important role in colonization of humans rather than contamination by food items. However, the situation may be radically different in low- and middle-income countries where interconnections between humans, animals and the environment are stronger [8].

Our study has several limitations. Although we isolated the two most relevant ESBL producers in the community and in hospitals (ESBL-Ec and ESBL-Kp, respectively), we have neglected bla_{ESBL}

borne by other species [22,31]. The ultimate identification of horizontal gene transfer events requires plasmid reconstruction from long-read sequencing data and the comparison of plasmids carrying identical bla_{ESBL} gene (manuscript in preparation). However, long-read sequencing would not have changed the main conclusions because there is a limited similarity between bla_{ESBL} genes carried by the isolates of the two reservoirs.

Overall, we found a very limited connection between ESBL-Ec and ESBL-Kp populations and bla_{ESBL} genes retrieved in retail food and that retrieved from hp-environment. This suggests that the human-to-human contamination, rather than the food chain, is likely the most frequent route of transmission for ESBL-Ec and ESBL-Kp in high-income countries.

MODERN WP3 study group (in addition to the authors listed above)

Geneva: Jacques Schrenzel, Gesuele Renzi, Abdessalam Cherkaoui.

Tübingen: Siri Goepel, Florian Hölzl, Michael Eib, Ingo B. Autenrieth.

Sevilla: Mercedes Delgado-Valverde, Álvaro Pascual, Rocío Medina, Cristina Belloso, Esperanza Racero.

Besançon: Jeanne Celotto, Marion Broussier, Camille Mauclair.

Utrecht: Jelle Scharringa.

Oxford: Patrick Musicha.

Transparency declaration

SP reports receiving consulting fees from Illumina and IDbyDNA and honoraria for presentation at Institute of Medical Microbiology, University Cologne, Germany. All other authors have nothing to disclose.

Role of the funding source

This study was part of a Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance collaborative research project, under the 2016 Joint Call framework (Transnational Research Projects on the Transmission Dynamics of Antibacterial Resistance). It received funding from the following national research agencies: Instituto de Salud Carlos III (grant no. AC16/00076), Netherlands Organization for Health Research and Development (grant no. 681055, 547001004), Swiss National Science Foundation (grant no. 40AR40-173608), German Federal Ministry of Education and Research (grant no. 01K11830) and the French Agence Nationale de la Recherche (grant no. ANR-16-JPEC-0007-03).

Elena Salamanca, Mercedes Delgado-Valverde, Alvaro Pascual and Jesús Rodríguez-Baño received support for research from by the Plan Nacional de I+D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0001), co-financed by the European Development Regional Fund *A way to achieve Europe*, Operative Program Intelligence Growth 2014–2020.

Author contributions

All authors contributed to the study design or conduct. DH, DM, AM, TV, SH, ET, JAJWK and JRB wrote the study protocol. DH, JAJWK, SH, JRB, ET and BSC obtained funding. DM, TV, NC, SB, AM, MER, ES and CB collected the samples. DM, AM, AC, SP, ACF, JG, AP, MD-V and DH performed or supervised the microbiological analyses in their local centres. JAJWK, ACF, TV, SP and JG provided a standardized procedure for whole-genome sequencing. JG and SP performed and supervised sequencing. CPH and BV performed statistical analyses. DM, BV and JG performed genetic analyses. DH, JAJWK, SH, JRB and ET supervised the study in their local institution as principal investigators. DM, XB and DH drafted the manuscript and all authors reviewed and contributed to the manuscript. DH coordinated the project.

Acknowledgements

We would like to thank the staff and residents from the LTCFs of Bellevaux in Besançon, France; Ferrusola and El Recreo in Sevilla, Spain; Luise-Wetzel-Stift and Samariterstift in Tübingen, Germany and Altenahove in Almkerk, the Netherlands for their involvement

in the study. We would like to thank Jelle Scharringa and Heike Schmitt from Utrecht, the Netherlands; Marion Broussier from Besançon, France; John Poté and Siva Lingam from Geneva, Switzerland and Michael Eib from Tübingen, Germany for their help on microbiological analyses of the samples, and Elisabeth Stoll and Steffen Ganß from Tübingen, Germany for collecting the samples.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.07.022>.

References

- [1] Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:165–74.
- [2] Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and risk factors among healthy individuals: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2016;63:310–8.
- [3] Tinelli M, Cataldo MA, Mantengoli E, Cadeddu C, Cunietti E, Luzzaro F, et al. Epidemiology and genetic characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in long-term care facilities. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2982–7.
- [4] Madec J-Y, Haenni M. Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and food-producing animals. *Plasmid* 2018;99:72–81.
- [5] Freitag C, Michael GB, Li J, Kadlec K, Wang Y, Hassel M, et al. Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables. *Vet Microbiol* 2018;189:72–81.
- [6] Randall LP, Lodge MP, Elviss NC, Lemma FL, Hopkins KL, Teale CJ, et al. Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 2017;241:283–90.
- [7] Bréchet C, Plantin J, Sauget M, Thouverez M, Talon D, Cholley P, et al. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin Infect Dis* 2014;58:1658–65.
- [8] Hernandez-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol* 2019;4:1432–42.
- [9] 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 beta-lactam antibiotic resistance genes: a population-based modelling study. *Lancet Planetary Health* 2019;3:e357–69.
- [10] Day MJ, Hopkins KL, Wareham DW, Toleman MA, Elviss N, Randall L, et al. Extended-spectrum beta-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;19:1325–35.
- [11] 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;60:439–52.
- [12] Nguyen MN, Hoang HTT, Xavier BB, Lammens C, Le HT, Hoang NTB, et al. Prospective One Health genetic surveillance in Vietnam identifies distinct blaCTX-M-harboring *Escherichia coli* in food-chain and human-derived samples. *Clin Microbiol Infect* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.01.006>.
- [13] Kim H-S, Chon J-W, Kim Y-J, Kim D-H, Kim M, Seo K-H. Prevalence and characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in ready-to-eat vegetables. *Int J Food Microbiol* 2015;207:83–6.
- [14] 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;19:56–66.
- [15] Riccio ME, Verschuuren T, Conzelmann N, Martak D, Meunier A, Salamanca E, et al. Household acquisition and transmission of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* after hospital discharge of ESBL-positive index patients. *Clin Microbiol Infect* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.024>.
- [16] Dolejska M, Frolkova P, Florek M, Jamborova I, Purgertova M, Kutilova I, et al. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2784–90.
- [17] Kwak Y-K, Colque P, Byfors S, Giske CG, Möllby R, Kühn I. Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm

- during 1 year: does it reflect the resistance trends in the society? *J Antimicrob Agents* 2015;45:25–32.
- [18] Peregrin T. Understanding millennial grocery shoppers' behavior and the role of the registered dietitian nutritionist. *J Acad Nutr Diet* 2015;115:1380–3.
- [19] EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version 2.0 n.d.
- [20] 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;24:350–4.
- [21] Chattaway MA, Jenkins C, Ciesielczuk H, Day M, DoNascimento V, Day M, et al. Evidence of evolving extraintestinal enteroaggregative *Escherichia coli* ST38 clone. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1935. –7.
- [22] Doi Y, Iovleva A, Bonomo RA. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *J Travel Med* 2017;24:S44–51.
- [23] Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J-Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing Clonal Group. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:543–74.
- [24] Ludden C, Raven KE, Jamroz 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;10. e02693–18.
- [25] Ludden C, Moradigaravand D, Jamroz 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;70:219–26.
- [26] 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;73:339–47.
- [27] Blaak H, de Kruijf P, Hamidjaja RA, van Hoek AHAM, de Roda Husman AM, Schets FM. Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Vet Microbiol* 2014;171:448–59.
- [28] Kluytmans JAJW, Overdeest ITMA, Willemsen I, Kluytmans-van den Bergh MFQ, van der Zwaluw K, Heck M, et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clin Infect Dis* 2013;56:478–87.
- [29] Been M de, Lanza VF, Toro M de, 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;10:e1004776.
- [30] Lanza VF, Toro M de, Garcillán-Barcia MP, Mora A, Blanco J, Coque TM, et al. Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131 sublineages, analyzed by plasmid constellation network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences. *PLoS Genet* 2014;10:e1004766.
- [31] Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol* 2020;18:344–59.

Supplementary data

Supplementary methods

Food and hp-environment sampling. In LTCF kitchens, at least four meat samples and four vegetable samples were collected eight times over a 32-week period from the kitchens of six LTCFs (one LTCF from Besançon, two from Tübingen, two from Sevilla, and one from Utrecht). Meat and vegetable samples were collected from supermarkets between January 2018 and August 2019 including 8 supermarkets in Besançon, 14 in Tübingen, 3 in Sevilla, 6 in Utrecht, and 4 in Geneva.

For hp-environment samples, two hundred and fifty mL of water were collected for WWTP inflow and LTCF discharge sewer samples and 500 mL were collected for river samples. We processed each sample within four hours of collection.

Microbiological analysis. For food samples, 25 g of meat or vegetables were incubated overnight at 35°C in 250 mL of tryptic soy broth supplemented by 8 mg/l vancomycin and 0.25 mg/l cefotaxime. One hundred µL were then streaked on ESBL-specific plates (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) and incubated overnight at 35°C.

Samples from WWTPs were diluted 1:10 in sterile water, 10 µL and 100 µL were streaked on ESBL-specific plates and incubated overnight at 35°C. One hundred mL of river and LTCF sewage samples were filtrated on a 0.45-µm filter deposited on ESBL-specific plates and incubated overnight at 35°C.

Bacterial colonies suspected to be *E. coli* or *K. pneumoniae* were identified by MALDI-TOF mass spectrometry (Microflex LT, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) with a log value ≥ 2 according to the manufacturer's recommendations. We kept a maximum of three *E. coli* or *K. pneumoniae* isolates with different morphotypes per sample. ESBL production was confirmed by double disk synergy tests (DDST20 and DDST30) as recommended by EUCAST (EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version 2.0). All isolates were stored in bead-containing cryotubes (Microbank, PRO-LAB Diagnostics, ON, Canada) at -80°C until further analysis.

Whole genome sequencing and bioinformatics. *E. coli* and *K. pneumoniae* strains showing an ESBL-producing phenotype were restored from deep freezing on Columbia agar

supplemented with 5% defibrinated sheep blood and incubated over night at 35°C. To exclude possible contamination, species identity was re-evaluated after the thawing process by MALDI-TOF MS before DNA extraction.

Bacterial DNA was extracted using QIAGEN DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Library preparation was performed with Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) followed by tagging with Nextera DNA CD Indexes (Illumina). Strains were whole-genome sequenced on the NextSeq platform with Illumina Mid-Output Kit v2, generating 150-bp paired-end reads. Raw reads were trimmed to a minimum length of 80 base pairs with Trimmomatic v0.35 [2] and de novo assembled with SPAdes v3.13.0 [3]. ESBL-encoding genes were identified using ResFinder v3.1 [4]. Sequence types (STs) were determined with in silico multi-locus sequence typing (MLST) [5].

We identified the incompatibility (Inc) groups of plasmids present in ESBL-Ec genomes using PlasmidFinder [6]. Mlplasmids [7] was then used to predict whether contigs bearing blaESBL genes were chromosome-integrated or plasmid-borne.

After cgMLST analysis, for ESBL-Ec, a Bio Neighbor Joining (BioNJ) tree based on differences on the core genes was constructed with SplitsTree5 [8] with a HKY85 distance calculation model. For ESBL-Kp, a maximum-likelihood tree was constructed with a GTR model using FastTree 2.1 [9]. We annotated and visualized the trees with iTOL v5 [10].

Phylogroups of *E. coli* were determined in silico with the Clermont method [11].

Supplementary references

- [1] EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version 2.0 n.d.
- [2] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- [3] Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich AA, Korobeynikov A, Lapidus A, et al. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol* 2013;20:714–37. <https://doi.org/10.1089/cmb.2013.0084>.
- [4] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2640–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.
- [5] Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 2012;50:1355–61. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>.
- [6] Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3895–903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>.
- [7] 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. *Microbial Genomics*, 2018;4:e000224. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000224>.
- [8] Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 2006;23:254–67. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>.
- [9] Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 – Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 2010;5:e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>.
- [10] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 2019;47:W256–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
- [11] 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 Genom* 2018;4. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192>.

Table S1. Major STs among extended-spectrum β -lactamase producing *E. coli* found in the different sources. The number and the proportion of isolates belonging to the nine most frequently found STs in each source are represented. WWTP: wastewater treatment plant; LTCF, long-term care facility; hp-environment, human-polluted environment; STs, sequence types.

WWTPs		Rivers downstream WWTPs		LTCF discharge sewers		Food from supermarkets		Food from LTCFs		Overall hp-environment		Overall food	
ST	n (%)	ST	n (%)	ST	n (%)	ST	n (%)	ST	n (%)	ST	n (%)	ST	n (%)
ST131	14 (21.2)	ST131	8 (10.8)	ST131	12 (63.2)	ST10	7 (11.3)	ST69	7 (21.2)	ST131	34 (21.5)	ST10	10 (11.5)
ST10	6 (9.1)	ST38	7 (9.5)	ST10	3 (15.8)	ST1011	6 (9.7)	ST155	5 (15.1)	ST10	16 (9.5)	ST155	10 (10.4)
ST38	4 (6.1)	ST10	6 (8.2)	ST949	3 (15.8)	ST155	5 (8.1)	ST354	5 (15.1)	ST38	11 (7.0)	ST69	9 (9.4)
ST58	4 (6.1)	ST58	5 (6.8)	ST155	1 (5.2)	ST58	4 (6.4)	ST10	3 (9.1)	ST949	10 (6.3)	ST1011	6 (6.3)
ST1193	3 (4.5)	ST949	5 (6.8)			ST533	4 (6.4)	ST117	3 (9.1)	ST58	9 (5.7)	ST354	5 (5.2)
ST949	2 (3.0)	ST1431	4 (5.4)			ST101	4 (6.4)	ST398	2 (6.1)	ST1193	5 (3.2)	ST58	4 (4.2)
ST88	2 (3.0)	ST69	3 (4.0)			ST38	3 (4.8)	ST7204	2 (6.1)	ST69	4 (2.5)	ST117	4 (4.2)
ST1123	2 (3.0)	ST155	3 (4.0)			ST115	3 (4.8)	ST115	1 (3.0)	ST155	4 (2.5)	ST533	4 (4.2)
ST2253	2 (3.0)	ST1193	2 (2.7)			ST48	3 (4.8)	ST48	1 (3.0)	ST1431	4 (2.5)	ST115	4 (4.2)
										Total	109 (60.7)	Total	55 (59.6)

	Plasmid		Chromosome	
	Food	Human-associated environment	Food	Human-associated environment
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	29	21	2	1
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	2	3	0	7
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	3	38	8	51
<i>bla</i> _{CTX-M-27}	6	5	0	18
<i>bla</i> _{CTX-M-32}	0	1	4	1
<i>bla</i> _{CTX-M-55}	1	2	1	6
<i>bla</i> _{SHV-12}	37	5	1	1

Table S2. Prediction of the different ESBL gene location (*i.e.*, plasmid-borne or chromosome-integrated) depending on the source.

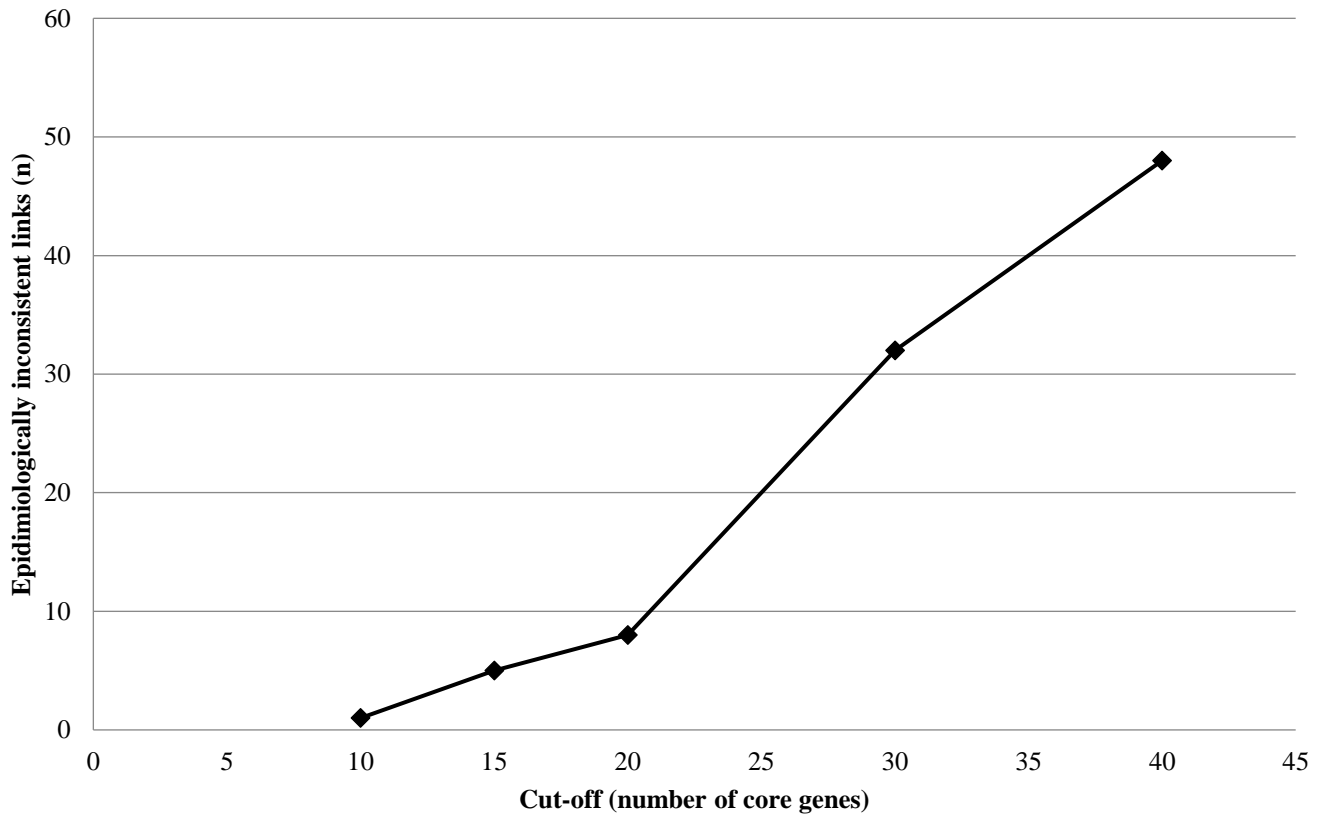


Figure S1. Number of epidemiologically inconsistent links in the network analysis of the genomes of ESBL-Ec cultured from food and hp-environment of five European cities. The networks created connect the sources with ESBL-Ec which genomes had <10, 15, 20, 30, or 40 core genes of difference (cut-off) out of 2275 core genes. Epidemiologically inconsistent links were defined as the links between sources from different cities and counted depending on the cut-off.

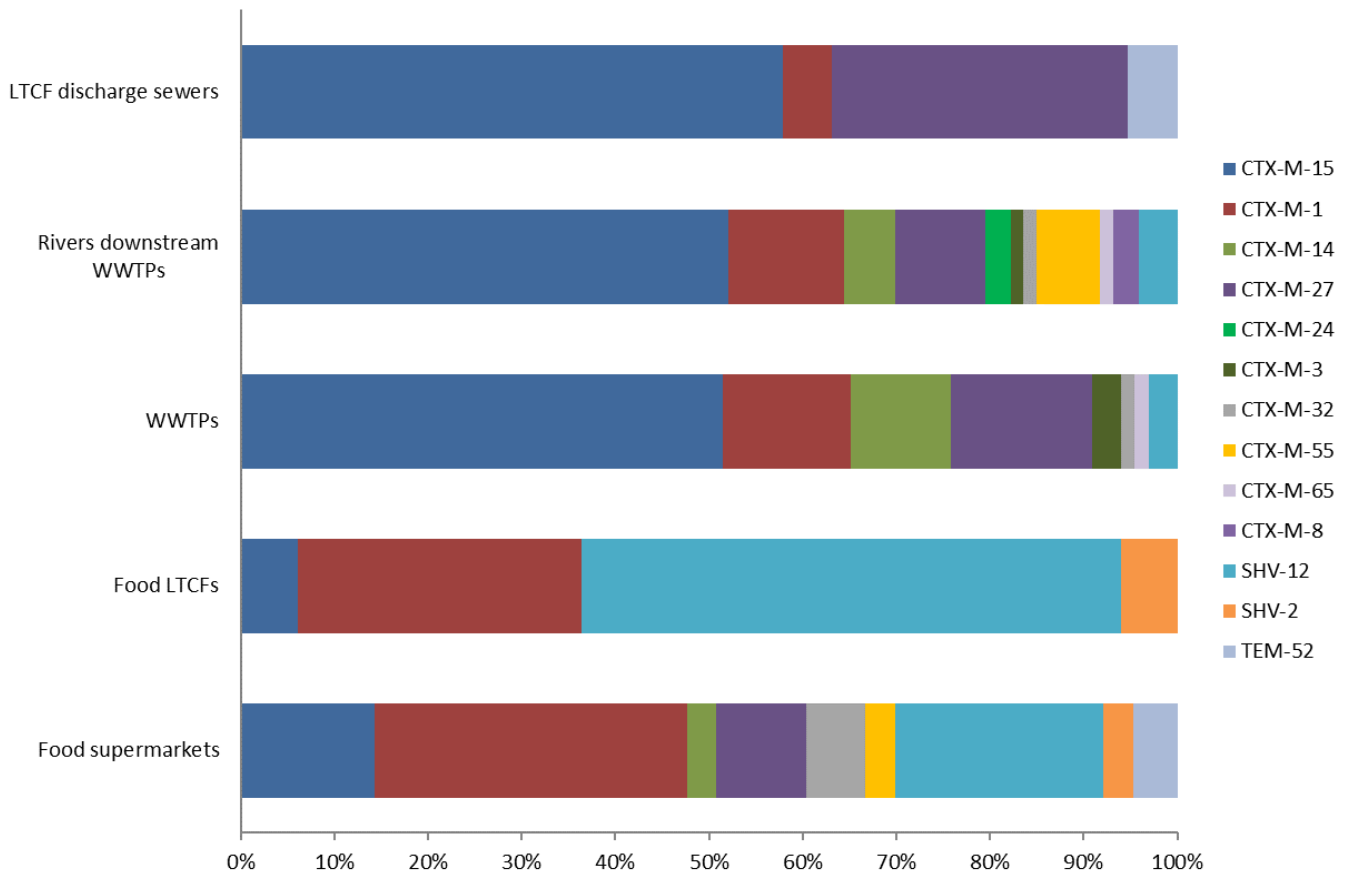


Figure S2. Distribution of the *bla*_{ESBL} genes identified in the 254 extended-spectrum β -lactamase producing *E. coli* isolates cultured from food and hp-environment. The gene types found in the different sources are expressed in proportion over the total number of genes per source. Source (LTCF: long-term care facility; WWTP: wastewater treatment plant) and *bla*_{ESBL} gene(s) are indicated for each isolate. For the ease of reading, the letters ‘*bla*’ have been omitted in the color code legend.

3.2.2 Diffusion d'*E. coli* dans les environnements peu anthropisés

High Prevalence of Human-Associated *Escherichia coli* in Wetlands Located in Eastern France

Daniel Martak, Charles P. Henriot, Marion Broussier, Charlotte Couchoud, Benoit Valot, Marion Richard, Julie Couchot, Gudrun Bornette, Didier Hocquet, and Xavier Bertrand

Résumé

Les isolats d'*E. coli* présents dans les rivières sont principalement apportés par les excréments humains et animaux. La contamination se fait principalement par les rejets STEU et par l'amendement des champs avec des boues d'épuration ou du fumier. Cependant, la survie de ces isolats dans les zones humides associées aux rivières reste inconnue. Ici, nous avons évalué la structure de la population d'*E. coli* dans des zones humides peu anthropisées situées le long de trois plaines alluviales afin d'identifier la principale source de contamination des zones humides, dont le fonctionnement est différent de celui des rivières. Nous avons collecté 179 isolats d'*E. coli* dans des échantillons d'eau prélevés mensuellement sur 19 sites situés dans l'est de la France pendant 1 an. Les phylogroupes B1 et B2 étaient dominants dans la population d'*E. coli*, tandis que le phylogroupe A était dominant dans les isolats résistants aux C3G, qui abritaient les gènes *bla*_{CTX-M-15} et *bla*_{CTX-M-27} dans la moitié des cas. La forte proportion d'isolats d'origine humaine peut être attribuée aux rejets des STEU et à la propagation des boues d'épuration. Nous avons analysé la distribution des isolats appartenant aux phylogroupes les plus associés à l'homme (B2 et D) sur un arbre phylogénétique de l'ensemble de l'espèce et l'avons comparée à celle des isolats prélevés chez des patients et dans les eaux usées. La distribution des trois populations d'*E. coli* était similaire, suggérant que les isolats collectés dans cette étude ne sont pas des souches adaptées à l'environnement. Nos résultats suggèrent qu'une forte proportion d'isolats d'*E. coli* qui atteignent et survivent dans des environnements faiblement anthropisés tels que les zones humides sont de source humaine.



High Prevalence of Human-Associated *Escherichia coli* in Wetlands Located in Eastern France

Daniel Martak^{1,2*}, Charles P. Henriot², Marion Broussier¹, Charlotte Couchoud^{1,2}, Benoit Valot^{2,3}, Marion Richard¹, Julie Couchot¹, Gudrun Bornette², Didier Hocquet^{1,2,3} and Xavier Bertrand^{1,2}

¹ Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire, Besançon, France, ² UMR 6249, Laboratoire Chrono-Environnement, CNRS-Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France, ³ Bioinformatique et big data au service de la santé, UFR Santé, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Teresa M. Coque,
Ramón y Cajal Institute for Health
Research, Spain

Reviewed by:

Azucena Mora Gutiérrez,
University of Santiago
de Compostela, Spain
David Gordon,
Australian National University,
Australia

*Correspondence:

Daniel Martak
dmartak@chu-besancon.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 16 April 2020

Accepted: 18 August 2020

Published: 04 September 2020

Citation:

Martak D, Henriot CP,
Broussier M, Couchoud C, Valot B,
Richard M, Couchot J, Bornette G,
Hocquet D and Bertrand X (2020)
High Prevalence
of Human-Associated *Escherichia coli*
in Wetlands Located in Eastern
France. *Front. Microbiol.* 11:552566.
doi: 10.3389/fmicb.2020.552566

Escherichia coli that are present in the rivers are mostly brought by human and animal feces. Contamination occurs mostly through wastewater treatment plant (WWTP) outflows and field amendment with sewage sludge or manure. However, the survival of these isolates in river-associated wetlands remains unknown. Here, we assessed *E. coli* population structure in low-anthropized wetlands located along three floodplains to identify the major source of contamination of wetlands, whose functioning is different from the rivers. We retrieved 179 *E. coli* in water samples collected monthly from 19 sites located in eastern France over 1 year. Phylogroups B1 and B2 were dominant in the *E. coli* population, while phylogroup A was dominant in isolates resistant to third-generation cephalosporins, which harbored the extended-spectrum β -lactamase (ESBL) encoding genes *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-27} in half of the cases. The high proportion of isolates from human source can be attributed to WWTP outflows and the spread of sewage sludge. We analyzed the distribution of the isolates belonging to the most human-associated phylogroups (B2 and D) on a phylogenetic tree of the whole species and compared it with that of isolates retrieved from patients and from WWTP outflows. The distribution of the three *E. coli* populations was similar, suggesting the absence of a specific population in the environment. Our results suggest that a high proportion of *E. coli* isolates that reach and survive in low-anthropized environments such as wetlands are from human source. To the best of our knowledge, this is the first study assessing *E. coli* contamination and resistance genes in natural freshwater wetlands.

Keywords: floodplains, wetlands, *E. coli*, human-associated *E. coli*, wastewater treatment plant

INTRODUCTION

Escherichia coli is a facultative anaerobic organism commensal of the vertebrate gut microbiota. Paradoxically, it can also be responsible of infections and is one of the main pathogens responsible for hospital- and community-acquired infections (Tenailon et al., 2010). Pathogenic strains of *E. coli* are divided into intestinal pathogens causing diarrhea and extraintestinal *E. coli* (ExPEC)

causing a variety of infections in both humans and animals including urinary tract infections, meningitis, and septicemia (Johnson et al., 2003; Riley, 2014). Although the ExPEC major clone sequence type (ST) 131 became predominant and have spread worldwide, other clones are also frequent (i.e., ST10, ST38, ST69, ST73, and ST405) (Nicolas-Chanoine et al., 2014; Manges et al., 2019). In contrast, diarrheagenic *E. coli* have been clustered into different pathovars according to their virulence gene arsenal. Humans widely contribute to the dissemination of *E. coli* in the environment through wastewaters. In developed countries, these wastewaters are treated in wastewater treatment plants (WWTPs). However, WWTP outflows contain *E. coli* that are released to the rivers (Bréchet et al., 2014). Agriculture also contributes to *E. coli* dissemination through practices such as spreading manure or sewage sludge (Cabral, 2010; Niu and Phanikumar, 2015; Hocquet et al., 2016). Cattle also play an important role in the dissemination of *E. coli* in the environment through their feces (Cabral, 2010). Overall, *E. coli* contaminates nearly all environments, with both human-associated or not human-associated *E. coli* present in rivers, lakes, groundwater, plants, and soils (Brookes et al., 2004; John and Rose, 2005; Park et al., 2016).

E. coli clusters into phylogroups A, B1, B2, C, D, E, F, and G (Clermont et al., 2013, 2019). Strains belonging to phylogroups A and B1 are ubiquitous and adapted to humans or vertebrate animals. Phylogroup A strains are predominant in humans while B1 strains are predominant in animals (Berthe et al., 2013). The rare phylogroup C is closely related to phylogroup B1 (Moissenet et al., 2010). Strains belonging to phylogroups B2, D, and F are the most frequent phylogroups found in human ExPEC infections (Clermont et al., 2013).

Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) is the major cause of resistance to cephalosporins in *E. coli*. In recent decades, ESBL-producing *E. coli* have spread worldwide, becoming a serious public health threat (Pitout and Laupland, 2008). These resistant strains have been widely isolated from humans but also from animals and food sources (Mughini-Gras et al., 2019; P rn nen et al., 2019). In a One-Health perspective, many recent studies assessed the relationships between *E. coli* from humans, meat, livestock, and WWTPs to understand the role played by humans in the spread of *E. coli* (Day et al., 2019; Ludden et al., 2019). Here, we wanted to understand the fate of *E. coli* in low-anthropized environments by determining the *E. coli* population structure in three rivers and their associated wetlands. We further compared their population structure with those from clinical settings and of WWTP outflows to understand the dynamics of the *E. coli* phylogroups from the human source to the wetlands.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Sampling

We sampled 16 wetlands distributed along the lower floodplains of the Ain, Doubs and Loue Rivers, three karstic rivers of the Jura Massif in eastern France (Supplementary Figure 1). One sampling point per river was chosen to compare the wetlands

and the rivers. Each river and its associated wetlands were sampled monthly for 1 year (from March 2015 to March 2016). Samples of 250 mL of water were collected and 100 mL of water were filtered by 0.45 μ m membranes and deposited on Drigalski agar plates (DRIGs) (Oxoid) and on ESBL-producing bacteria selection plates (chromID ESBL plates; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). After an overnight incubation at 37 C, colonies were counted; each lactose positive bacteria cultured on DRIGs and colonies growing on ESBL-specific plates were identified by MALDI-TOF MS (Microflex 100 LT; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). All *E. coli* identified with a log value ≥ 2 according to the manufacturer's recommendations and with different morphotypes were stored at -80°C until further analysis.

Identification of *bla*_{ESBL} in Isolates Resistant to Third-Generation Cephalosporins (3GC-R)

For each morphotype of *E. coli* growing on chromID ESBL plates, we confirmed the production of ESBL with the synergy test recommended by the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology (CA-SFM¹, last consultation: 10 November 2018). We used *E. coli* reference strain ATCC 25922 as a control. Isolates with a negative synergy test were considered as producer of plasmid-mediated cephalosporinases. Hence, isolates that grow on ESBL selective plates (i.e., resistant to 3GC) were sorted into ESBL or plasmid-mediated cephalosporinase producers. For all ESBL-producing isolates, we identified *bla*_{ESBL} genes by PCR and sequencing. We first screened the isolates carrying *bla*_{CTX-M} with consensus primers and we then targeted the different groups of CTX-M with specific primers (*bla*_{CTX-M-group 1}, *bla*_{CTX-M-group 9}, *bla*_{CTX-M-group 2}). *bla*_{CTX-M} negative isolates were then tested for the presence of *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} genes (Mabilat and Courvalin, 1990; Cao et al., 2002; Coque et al., 2008). The nucleotide sequences of all PCR products were determined.

Molecular Typing

Bacterial DNA was extracted from an overnight culture on Mueller-Hinton agar (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) using the boiling method. We used the Clermont method to assign all the isolates to one of the eight existing phylogroups (A, B1, B2, C, D, E, F, G) (Clermont et al., 2013, 2019). Phylogroups were assigned depending on the presence/absence of four genes (*arpA*, *chuA*, *yjaA*, and *TspE4.C2*) using a quadruplex PCR. Isolates with identical profiles were further discriminated by additional PCRs. Hence, we amplified *trpA* to differentiate the isolates in phylogroups A and C, *arpA* to differentiate the isolates in phylogroups D and E, and *cfaB* and *ybgD* to differentiate isolates of the phylogroups B2, F, and G. Particular profiles allowed us to differentiate *E. coli* and *Escherichia* cryptic clades (Clermont et al., 2013). Isolates belonging to phylogroups B2 or D were typed by multi-locus sequence typing (MLST) using a previously described method (Wirth et al., 2006).

¹<http://www.sfm-microbiologie.org/>

Sequence Types Distribution

The distribution of STs of interest was assessed with an SNP-based analysis of the concatenation of the seven alleles of 4195 STs extracted from EnteroBase (Alikhan et al., 2018). We built a phylogenetic tree with FastTree v2.1.9 (Price et al., 2009, 2010), with a GTR-G model to visualize the links between the different STs. Subtrees were then extracted using the R package ggtree (Yu et al., 2017, 2018) to precisely visualize the population structure of phylogroups B2 and D. STs found in clinical settings or in treated wastewater were extracted from previously published results (Gibreel et al., 2012; Bréchet et al., 2014; Kallonen et al., 2017). Their distribution on the trees was compared with that of the isolates retrieved from the floodplains.

Statistical Analysis

The independence of the explanatory variables of the whole dataset (i.e., spatial – floodplain and site variables) was tested using Pearson's χ^2 -tests on the contingency tables of each pair of explanatory variables. The explanatory variables were all independent of each other. Therefore, the independence of (i) the phylogroups and (ii) the relationships between phylogroups mostly associated to human (B2, D, F) and other (A, B1, C, E) *E. coli* strains with respect to each explanatory variable (one by one) was tested. We first separately constructed contingency tables for (i) the phylogroups and each explanatory variable and (ii) the association or not of the isolates with humans and each explanatory variable for *E. coli* cultured on DRIGs or ESBL selective plates. We then performed Pearson's χ^2 -tests on each contingency tables. The α value was set to 0.05. All analyses were performed with R 3.5.1 software (R Core Team Package 2019).

RESULTS

We retrieved 179 isolates of *E. coli*. We cultured 125 isolates on DRIGs; these isolates represented the unselected *E. coli* population present in the different rivers and their associated wetlands. We also cultured water samples on selective plates and identified 54 3GC-R isolates of which 49 and 5 produced an ESBL and a plasmid-mediated cephalosporinase, respectively. We also found 29 isolates belonging to the *Escherichia* cryptic clades (Clermont et al., 2013).

Phylogroup Distribution of the Unselected *E. coli* Population

The phylogroup distribution of the unselected *E. coli* population (cultured on DRIGs) showed that isolates belonging to phylogroups B1 (32%) and B2 (29.6%) were predominant (Figure 1A), with a high proportion of B2 isolates in the Ain floodplain ($p = 0.048$). Isolates belonging to phylogroups A (19.2%), C (6.4%), and D (12%) were identified in each floodplain, whereas isolates from phylogroup E (0.8%) were identified from only the Ain floodplain.

3GC-R *E. coli*

Compared to the other phylogroups, phylogroup A (39.6%) was dominant in 3GC-R *E. coli* (Figure 1B; $p = 0.002$). Phylogroups

C (18.9%) and D (20.7%) were more frequent than phylogroups B2 (11.3%) and B1 (7.6%). Phylogroup B1 was found only in the Ain and Loue floodplains, whereas phylogroup F (1.8%) was only found in the Doubs floodplain. There were more isolates belonging to phylogroup A in the Loue and Doubs floodplains than in the Ain floodplain ($p = 0.018$). Isolates belonging to the phylogroups mostly associated to human (B2, D, and F) were less frequent than the other phylogroups ($p = 0.019$).

*bla*_{ESBL} in 54 3GC-R isolates were mostly *bla*_{CTX-M-15} (43%) and *bla*_{CTX-M-1} (24%). *bla*_{CTX-M-14} and *bla*_{CTX-M-27} represented 17 and 7% of the *bla*_{ESBL} genes, respectively. The remaining 3-GC-R isolates (9%) presumably produced a plasmid-mediated cephalosporinase. Among the isolates belonging to the phylogroups mostly associated to human (B2, D; $n = 17$), 47, 29, 12, and 12% produced CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-1, and plasmid-mediated cephalosporinase, respectively.

MLST Typing of *E. coli* Belonging to Phylogroups B2 and D

All phylogroup B2 and D isolates ($n = 69$) were typed by MLST. We obtained 31 different STs, nine of which were new STs (Supplementary Table 1). Twenty-six isolates belonged to STs often associated with humans (ST10, ST12, ST38, ST69, ST73, ST95, ST131, ST372, ST405).

A phylogenetic tree comprising 4195 STs extracted from EnteroBase (Alikhan et al., 2018) was built. Then, we extracted the phylogroup B2 and phylogroup D subtrees (Figures 3A,B, respectively). The subtrees showed that the isolates from clinical or environmental collections (WWTPs or floodplains) were scattered throughout the trees, indicating (i) that the structure of these populations was comparable and (ii) the absence of a specific population in the environment.

Three phylogroup B2 STs (ST95, ST131, and ST372) and four phylogroup D STs (ST38, ST69, ST362, ST405) were shared among the three different collection groups.

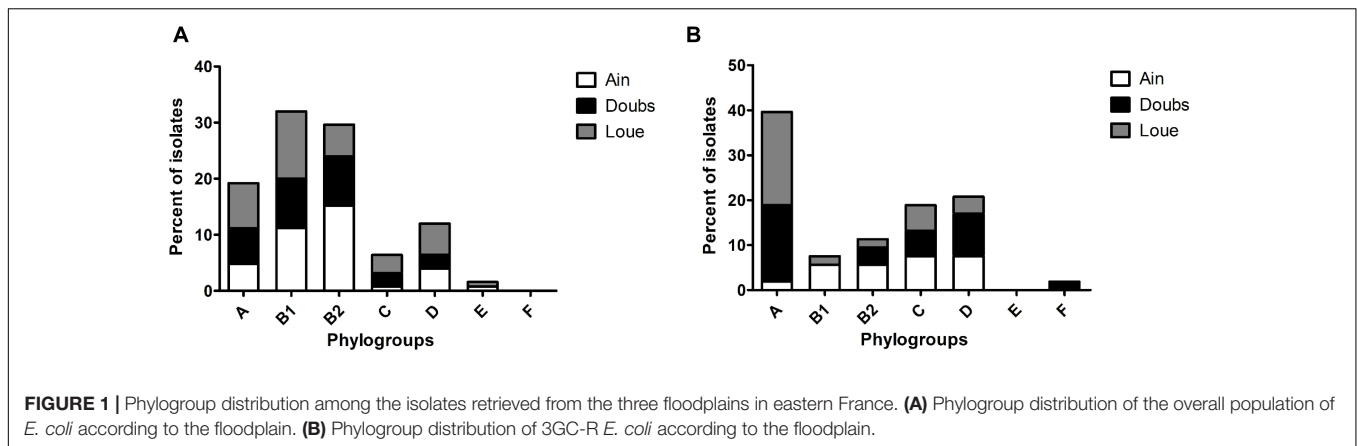
Escherichia Cryptic Clades

We retrieved 29 isolates belonging to *Escherichia* cryptic clades, which represents 14% of the isolates retrieved in this study. The *Escherichia* cryptic clades were predominant in wetlands not connected to rivers ($p = 0.026$).

DISCUSSION

Phylogroup Distribution of the Unselected *E. coli* Population

We previously determined that the concentration of total *E. coli* was higher in the rivers than in the wetlands with no significant differences in concentrations between wetlands (Henriot et al., 2019). We then divided 125 *E. coli* isolates into phylogroups and found a high proportion of isolates belonging to phylogroups A and B2, representing half of the isolates retrieved (48.8%). It was unexpected to find mostly human-associated phylogroups in low-anthropized wetlands (Escobar-Páramo et al., 2004; Massot et al., 2016). Previous studies identified WWTPs, sewage sludge and



manure as sources of *E. coli* contamination in the environment (Michael et al., 2013; Balière et al., 2015). The contamination of the wetlands by isolates belonging to phylogroups A and B2 probably resulted from the release of WWTP outflows and the spread of sewage sludge. Phylogroup B1 is the main phylogroup found in animals (Gordon and Cowling, 2003). The high proportion of isolates belonging to this phylogroup (32%) retrieved in the floodplains can be explained by direct contamination of the water by animals (wild animals or cattle, via superficial or groundwater flow) or by the spread of manure. Interestingly, the Ain floodplain was contaminated by a higher proportion of isolates belonging to phylogroup B2 than the Doubs and Loue floodplains (Figure 1A). This difference could be attributed to two concurrent factors in the Ain lower floodplain: a very coarse substrate (cobblestones) overlaid with a shallow soil layer and the spread of large amounts of sewage sludge. One can speculate that the spread of sewage sludge is a major source of contamination of the Ain River and wetlands by phylogroup B2 isolates, which are of human origin. However, this hypothesis needs to be confirmed by precise follow-up regarding the spread of sewage sludge and manure in each floodplain near the studied wetlands.

Resistance and Phylogroup Distribution of 3GC-R *E. coli*

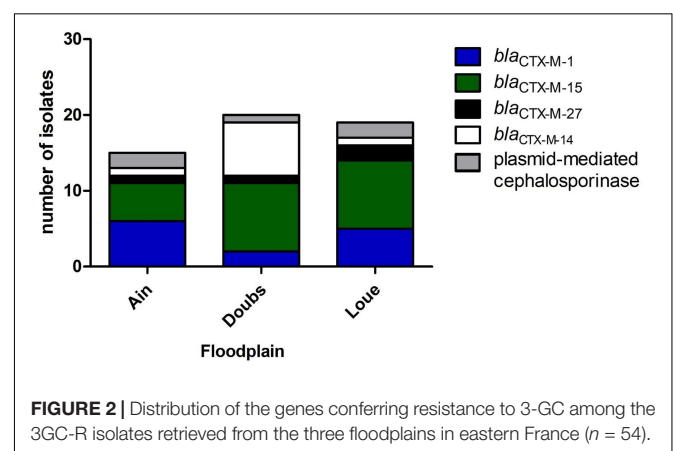
Phylogroup A was the main phylogroup found in 3GC-R *E. coli* (39.6%). These data are in line with the proportion of phylogroup A isolates recovered from humans (Tenailon et al., 2010). This high proportion of isolates belonging to phylogroups A (39.6%) and B2 (11.3%) and the lower proportion of phylogroup B1 isolates (7.6%) suggest that the contamination of rivers and wetlands by 3GC-R *E. coli* could be caused more by human contamination rather than cattle contamination. The identification of *bla*_{ESBL} genes showed that *bla*_{CTX-M-15} was predominant, accounting for 43% of the *bla*_{ESBL} identified in the 3GC-R isolates (Figure 2). *bla*_{CTX-M-27} was present in 7% of the isolates. Together, *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-27} represented half of the *bla*_{ESBL} found. These *bla*_{ESBL} are highly related to *E. coli* found in humans (Day et al., 2019; Ludden et al., 2019). *bla*_{CTX-M-14} has previously been documented as associated to

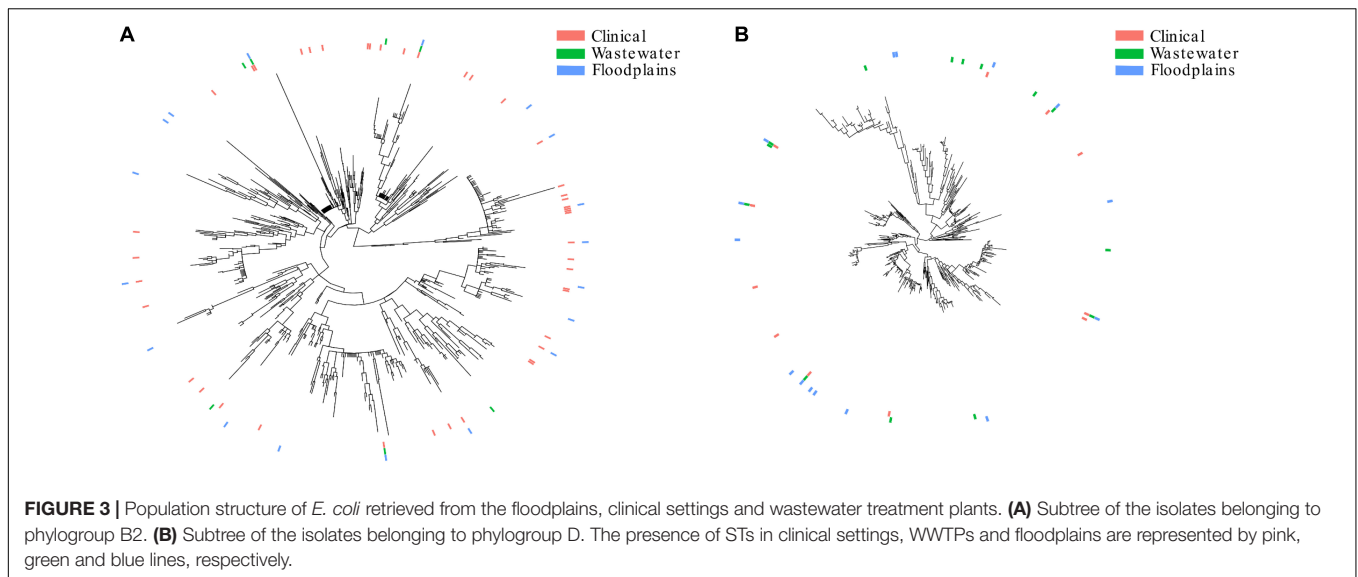
humans (Mughini-Gras et al., 2019), but this ESBL-encoding gene was also found in animals, especially in chicken (Hayashi et al., 2018). In contrast, *bla*_{CTX-M-1} is more often related to animals and meat (Day et al., 2019). This indicated that 3GC-R *E. coli* that contaminate the floodplains mostly originated from human effluents released from WWTP outflows into the rivers (Oberlé et al., 2012; Bréchet et al., 2014). Many studies identified multidrug-resistant *E. coli* in rivers downstream large cities (Dhanji et al., 2011; Jang et al., 2013). Here, we found multidrug-resistant *E. coli* in areas that were far from any direct contamination by humans (i.e., up to 20 km downstream from the WWTP outflows in our case), suggesting that these isolates can survive in rivers despite long-distance dispersal by water.

Escherichia Cryptic Clades

The cryptic clades of *E. coli* comprise five different groups. Clade I is considered a divergent *E. coli* and has been reported in human infections, while the other clades are less virulent than clade I (Clermont et al., 2013). These cryptic clades are phenotypically indistinguishable from *E. coli* but genetically different.

The 29 isolates belonging to the cryptic clades retrieved in our study represented 14% of the isolates found. Previous studies found similar proportions of these isolates in environmental samples in Australia, France, and Italy (Walk, 2015). We found





that these clades were frequent in unconnected wetlands which are supplied by groundwater, nutrient-poor, and cold (Bornette and Large, 1995; Bornette et al., 1996). In fact, low chlorophyll-*a* content, which directly relates to lower phytoplankton abundance and nutrient availability (Arthaud et al., 2013), and low temperature were nearly significantly associated with the presence of cryptic clades in wetlands of our study (data not shown). These cryptic clades may be genetically adapted to the environment by the presence of genes promoting their survival in this ecological niche (Walk, 2015).

MLST Typing

Among the B2 and D isolates, we found ST73, ST131, ST95, ST69, and ST12. These STs are predominant in isolates retrieved in the patient blood samples (Kallonen et al., 2017), further suggesting the human origin of the contamination.

The population structure of the present collection of *E. coli* was compared to that of collections from WWTP outflows and clinical settings (Figures 3A,B). Although not fully representative of all STs present in clinics or WWTPs, we found a comparable distribution of STs in the three collections that were distributed throughout the trees, suggesting that no specific sub-population of *E. coli* is adapted to a given environment. The similar distribution of STs in the WWTP outflows and in the environment strongly suggests that the contamination of the environment mostly results from the dilution of WWTP outflows. It also suggests that these isolates can reach and survive in remote areas like wetlands.

E. coli Survival in Water

Our results showed that low-anthropized wetlands contain *E. coli* isolates of human origin. Although *E. coli* contamination of rivers or lakes has been well-documented (Michael et al., 2013), that of wetlands has been less investigated. Indeed, the studied wetlands have varying degrees of connection with the river, can be supplied in water either by the river or by groundwater, and

the physical and chemical parameters can vary from those of the river (Henriot et al., 2019). It has been reported that *E. coli* can survive and grow in the environment (Jang et al., 2017). However, its survival is influenced by many factors, such as the carbon sources, temperature, pH, and availability of water (van Elsas et al., 2011). Here, we collected human-associated and 3GC-R isolates from a wide range of conditions (see Henriot et al., 2019 for details). Continuous discharge from WWTPs could explain the high proportion of human-associated *E. coli* isolates retrieved in low-anthropized environments. Previous studies suggested the existence of environmentally-adapted *E. coli* populations (van Elsas et al., 2011; Jang et al., 2017). Multi-drug resistant *E. coli* have been found in mangrove estuaries (Ghaderpour et al., 2015). The contamination of this low-anthropized environment was attributed to antibiotic release and human activities. Petit et al. (2017) found different distributions of *E. coli* population depending on the presence of cattle farm near the river. Overall, *E. coli* from human and animal effluents do not appear to be disadvantaged in environments and specific areas such as wetlands or mangrove estuaries which features drastically differ from those in the vertebrate intestine. In other words, the *E. coli* population in wetlands seems to be a dilution of the *E. coli* population found in human and animal guts. It reflects either the survival of *E. coli* of mammal origin in the environment and/or the permanent release of these contaminants in the environment. As the phylogrouping does not fully overlap the isolate origin, we cannot track the sources of the bacterial contamination with certainty.

CONCLUSION

We found that a high proportion of the *E. coli* isolates retrieved in low-anthropized wetlands were probably human-associated. The similar population structures found in clinical settings, WWTPs and the environment suggest that *E. coli* released in the environment can reach and survive in specific areas like wetlands.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets presented in this study are included in the article/Supplementary Material.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DM, CH, GB, XB, and DH conceived and designed the experiments and wrote the manuscript. DM, MB, JC, and MR

carried out the experiments. DM, CH, CC, and BV analyzed the data. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.552566/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Alikhan, N.-F., Zhou, Z., Sergeant, M. J., and Achtman, M. (2018). A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLoS Genet.* 14:e1007261. doi: 10.1371/journal.pgen.1007261
- Arthaud, F., Vallod, D., Robin, J., Wezel, A., and Bornette, G. (2013). Short-term succession of aquatic plant species richness along ecosystem productivity and dispersal gradients in shallow lakes. *J. Veg. Sci.* 24, 148–156. doi: 10.1111/j.1654-1103.2012.01436.x
- Balière, C., Rincé, A., Blanco, J., Dahbi, G., Harel, J., Vogeleer, P., et al. (2015). Prevalence and characterization of shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in shellfish-harvesting areas and their watersheds. *Front. Microbiol.* 6:1356. doi: 10.3389/fmicb.2015.01356
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., and Petit, F. (2013). Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4684–4693. doi: 10.1128/AEM.00698-13
- Bornette, G., Guerlesquin, M., and Henry, C. P. (1996). Are the characeae able to indicate the origin of groundwater in former river channels? *Vegetation* 125, 207–222. doi: 10.1007/BF00044652
- Bornette, G., and Large, A. R. G. (1995). Groundwater-surface water ecotones at the upstream part of confluences in former river channels. *Hydrobiologia* 310, 123–137. doi: 10.1007/BF00015531
- Bréchet, C., Plantin, J., Sauget, M., Thouverez, M., Talon, D., Chollet, P., et al. (2014). Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin. Infect. Dis.* 58, 1658–1665. doi: 10.1093/cid/ciu190
- Brookes, J. D., Antenucci, J., Hipsey, M., Burch, M. D., Ashbolt, N. J., and Ferguson, C. (2004). Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. *Environ. Int.* 30, 741–759. doi: 10.1016/j.envint.2003.11.006
- Cabral, J. P. S. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 3657–3703. doi: 10.3390/ijerph7103657
- Cao, V., Lambert, T., Nhu, D. Q., Loan, H. K., Hoang, N. K., Arlet, G., et al. (2002). Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3739–3743. doi: 10.1128/AAC.46.12.3739-3743.2002
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., and Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 58–65. doi: 10.1111/1758-2229.12019
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., et al. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ. Microbiol.* 21, 3107–3117. doi: 10.1111/1462-2920.14713
- Coque, T. M., Novais, Á., Carattoli, A., Poirer, L., Pitout, J., Peixe, L., et al. (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 195–200. doi: 10.3201/eid1402.070350
- Day, M. J., Hopkins, K. L., Wareham, D. W., Toleman, M. A., Elviss, N., Randall, L., et al. (2019). 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.* 19, 1325–1335. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30273-7
- Dhanji, H., Murphy, N. M., Akhigbe, C., Doumith, M., Hope, R., Livermore, D. M., et al. (2011). Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase from UK river water. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 512–516. doi: 10.1093/jac/dkq472
- Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., et al. (2004). Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5698–5700. doi: 10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004
- Ghaderpour, A., Ho, W. S., Chew, L.-L., Bong, C. W., Chong, V. C., Thong, K.-L., et al. (2015). Diverse and abundant multi-drug resistant *E. coli* in Matang mangrove estuaries, Malaysia. *Front. Microbiol.* 6:977. doi: 10.3389/fmicb.2015.00977
- Gibreel, T. M., Dodgson, A. R., Cheesbrough, J., Fox, A. J., Bolton, F. J., and Upton, M. (2012). Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 346–356. doi: 10.1093/jac/dkr451
- Gordon, D. M., and Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 149, 3575–3586. doi: 10.1099/mic.0.26486-0
- Hayashi, W., Ohsaki, Y., Taniguchi, Y., Koide, S., Kawamura, K., Suzuki, M., et al. (2018). High prevalence of blaCTX-M-14 among genetically diverse *Escherichia coli* recovered from retail raw chicken meat portions in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 284, 98–104. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.003
- Henriot, C. P., Martak, D., Cuenot, Q., Loup, C., Masclaux, H., Gillet, F., et al. (2019). Occurrence and ecological determinants of the contamination of floodplain wetlands with *Klebsiella pneumoniae* and pathogenic or antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95:fiz097. doi: 10.1093/femsec/fiz097
- Hocquet, D., Muller, A., and Bertrand, X. (2016). What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J. Hosp. Infect.* 93, 395–402. doi: 10.1016/j.jhin.2016.01.010
- Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., and Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J. Appl. Microbiol.* 123, 570–581. doi: 10.1111/jam.13468
- Jang, J., Suh, Y.-S., Di, D. Y. W., Unno, T., Sadowsky, M. J., and Hur, H.-G. (2013). Pathogenic *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases in the Yeongsan River basin of South Korea. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1128–1136. doi: 10.1021/es303577u
- John, D. E., and Rose, J. B. (2005). Review of factors affecting microbial survival in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 39, 7345–7356. doi: 10.1021/es047995w
- Johnson, J. R., Murray, A. C., Gajewski, A., Sullivan, M., Snippes, P., Kuskowski, M. A., et al. (2003). Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2161–2168. doi: 10.1128/AAC.47.7.2161-2168.2003
- Kallonen, T., Brodrick, H. J., Harris, S. R., Corander, J., Brown, N. M., Martin, V., et al. (2017). Systematic longitudinal survey of invasive *Escherichia coli* in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131. *Genome Res.* 27, 1437–1449. doi: 10.1101/gr.216606.116
- Ludden, C., Raven, K. E., Jamroz, D., Gouliouris, T., Blane, B., Coll, F., et al. (2019). One health genomic surveillance of *Escherichia coli* demonstrates

- distinct lineages and mobile genetic elements in isolates from humans versus livestock. *mBio* 10:e02693-18. doi: 10.1128/mBio.02693-18
- Mabilat, C., and Courvalin, P. (1990). Development of “oligotyping” for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2210–2216. doi: 10.1128/aac.34.11.2210
- Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., and Pitout, J. D. D. (2019). Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *Clin. Microbiol. Rev.* 32, 1–25. doi: 10.1128/CMR.00135-18
- Massot, M., Daubié, A.-S., Clermont, O., Jaureguy, F., Couffignal, C., Dahbi, G., et al. (2016). Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. *Microbiology* 162, 642–650. doi: 10.1099/mic.0.000242
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C. S., Manaia, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., et al. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res.* 47, 957–995. doi: 10.1016/j.watres.2012.11.027
- Moissenet, D., Salauze, B., Clermont, O., Bingen, E., Arlet, G., Denamur, E., et al. (2010). Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum β -lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: epidemiological investigation and characterization of the strain. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2459–2463. doi: 10.1128/JCM.00529-10
- Mughini-Gras, L., Dorado-García, A., van Duijkere, E., van den Bunt, G., Dierikx, C. M., Bonten, M. J. M., et al. (2019). Attributable sources of community-acquired carriage of *Escherichia coli* containing β -lactam antibiotic resistance genes: a population-based modelling study. *Lancet Planet. Health* 3, e357–e369. doi: 10.1016/S2542-5196(19)30130-5
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X., and Madec, J.-Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 543–574. doi: 10.1128/CMR.00125-13
- Niu, J., and Phanikumar, M. S. (2015). Modeling watershed-scale solute transport using an integrated, process-based hydrologic model with applications to bacterial fate and transport. *J. Hydrol.* 529, 35–48. doi: 10.1016/j.jhydrol.2015.07.013
- Oberlé, K., Capdeville, M.-J., Berthe, T., Budzinski, H., and Petit, F. (2012). Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from medical center patients to a receiving environment. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1859–1868. doi: 10.1021/es203399h
- Park, Y., Pachepsky, Y., Shelton, D., Jeong, J., and Whelan, G. (2016). Survival of manure-borne and fecal coliforms in soil: temperature dependence as affected by site-specific factors. *J. Environ. Qual.* 45, 949–957. doi: 10.2134/jeq2015.08.0427
- Pärnänen, K. M. M., Narciso-da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T. U., Cacace, D., Do, T. T., et al. (2019). Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci. Adv.* 5:eau9124. doi: 10.1126/sciadv.aau9124
- Petit, F., Clermont, O., Delannoy, S., Servais, P., Gourmelon, M., Fach, P., et al. (2017). Change in the structure of *Escherichia coli* population and the pattern of virulence genes along a rural aquatic continuum. *Front. Microbiol.* 8:609. doi: 10.3389/fmicb.2017.00609
- Pitout, J. D., and Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* 8, 159–166. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70041-0
- Price, M. N., Dehal, P. S., and Arkin, A. P. (2009). FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1641–1650. doi: 10.1093/molbev/msp077
- Price, M. N., Dehal, P. S., and Arkin, A. P. (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 5:e9490. doi: 10.1371/journal.pone.0009490
- Riley, L. W. (2014). Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 380–390. doi: 10.1111/1469-0691.12646
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., and Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 207–217. doi: 10.1038/nrmicro2298
- van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., and Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J.* 5, 173–183. doi: 10.1038/ismej.2010.80
- Walk, S. T. (2015). The “cryptic” *Escherichia*. *EcoSal Plus* 6. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2015
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., et al. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60, 1136–1151. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
- Yu, G., Lam, T. T.-Y., Zhu, H., and Guan, Y. (2018). Two methods for mapping and visualizing associated data on phylogeny using ggtree. *Mol. Biol. Evol.* 35, 3041–3043. doi: 10.1093/molbev/msy194
- Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., and Lam, T. T.-Y. (2017). ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol. Evol.* 8, 28–36. doi: 10.1111/2041-210X.12628

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Martak, Henriot, Broussier, Couchoud, Valot, Richard, Couchot, Bornette, Hocquet and Bertrand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4. COLONISATION INTESTINALE DES RESIDENTS D'ETABLISSEMENTS DE LONG SEJOUR PAR *P. AERUGINOSA*

4.1 Introduction

4.1.1 Généralités sur *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif de la famille des Pseudomonadaceae. C'est une espèce ubiquitaire retrouvée dans de nombreux environnements, qu'ils soient terrestres, aquatiques ou encore associés à l'Homme, aux animaux ou aux plantes²¹². Le génome de *P. aeruginosa* est d'environ 5,5 à 7 Mpb, ce qui en fait un génome plus important que la plupart des autres bactéries à Gram négatif^{213,214}. *P. aeruginosa* est considéré comme un pathogène opportuniste fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales et infectant principalement les personnes fragiles, telles que les grands brûlés, les patients immunodéprimés ou les patients présentant des défaillances pulmonaires, avec comme exemple type, les patients atteints de mucoviscidose^{40,215}. Selon l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales réalisée en 2017, *P. aeruginosa* est responsable de 6,28% des infections nosocomiales en France, ce qui fait de lui le 4^{ème} pathogène le plus fréquemment associé aux infections nosocomiales derrière *E. coli*, *S. aureus* et *Enterococcus faecalis*. Il est également le second pathogène responsable de pneumonies avec 13,94% des pneumonies qui lui sont attribuables¹⁰. Un grand nombre d'épidémies hospitalières liées à *P. aeruginosa* ont aujourd'hui été documentées, notamment dans les services de réanimations où l'origine de l'infection peut être endogène ou exogène. L'origine exogène regroupant les transmissions croisées entre les patients et l'origine environnementale ; les points d'eau, les siphons ou encore le matériel comme les endoscopes étant des sources fréquentes de contamination pour les patients^{40,216,217}. *P. aeruginosa* présente de nombreuses résistances intrinsèques auxquelles peuvent s'ajouter des résistances acquises. Ainsi, *P. aeruginosa* peut devenir résistant à un grand nombre d'antibiotiques, rendant le traitement des infections parfois difficile²¹⁸. Parmi les mécanismes de résistances intrinsèques, on note une faible perméabilité membranaire, le rejet des antibiotiques via les pompes d'efflux actives ou encore la production d'enzymes permettant de dégrader les antibiotiques²¹⁹. *P. aeruginosa* peut devenir résistant aux antibiotiques par l'acquisition de gènes par THG mais il se caractérise surtout par sa grande capacité à développer des mécanismes de résistance via des mutations chromosomiques^{220,221}.

P. aeruginosa peut également former des biofilms²¹⁸. Les biofilms sont des agglomérats complexes de bactéries attachées à une surface. Dans un biofilm, les bactéries s'entourent d'une matrice composée de polymères et de protéines qui les protège et qui leur permet de résister à leur environnement rendant le traitement antibiotique plus difficile encore²²². Par exemple, chez les patients atteints de mucoviscidose, *P. aeruginosa* forme des biofilms lui permettant de résister aux antibiotiques et au système immunitaire de l'hôte²²².

4.1.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

4.1.2.1 Les mécanismes de résistance intrinsèques

P. aeruginosa résiste naturellement à un grand nombre d'antibiotiques grâce à une perméabilité membranaire faible, à la production d'enzymes qui dégradent certains antibiotiques, ou encore grâce aux pompes d'efflux actifs qui expulsent les antibiotiques de la cellule²¹⁹.

La faible perméabilité membranaire de *P. aeruginosa* résulte d'une faible quantité de protéines OprF formant des canaux ouverts, empêchant ainsi certains antibiotiques de pénétrer dans la cellule et donc d'atteindre leur cible^{223,224}.

Les pompes d'efflux jouent un rôle majeur dans l'expulsion des composés toxiques en dehors des cellules bactériennes. Ces pompes peuvent être classées en cinq familles²²⁵, parmi lesquelles les pompes de la famille *resistance-nodulation-division* (RND) jouent un rôle clé dans la résistance aux antibiotiques. *P. aeruginosa* possède quatre pompes d'efflux de type RND qui contribuent significativement à la résistance aux antibiotiques²²⁶. Ces systèmes d'efflux permettent à *P. aeruginosa* de résister aux β -lactamines, aux fluoroquinolones ou encore aux aminosides. Par exemple, l'expression constitutive du système d'efflux MexAB-OprM joue un rôle clé dans la faible sensibilité basale de *P. aeruginosa* à la majorité des β -lactamines (à l'exception de l'imipénème)²²⁶. Le système d'efflux MexXY-OprM est quant à lui un système d'efflux inductible impliqué dans la résistance aux aminosides^{226,227}.

L'arsenal de *P. aeruginosa* est également composé d'enzymes inactivant les antibiotiques. La production de la β -lactamase AmpC, dont le gène est chromosomique, est induite par certains antibiotiques comme les céphalosporines. AmpC hydrolyse les β -lactamines et entraîne une résistance aux céphalosporines et quelquefois une réduction de la sensibilité à l'imipénème. Notons également que *P. aeruginosa* produit l'oxacilline OXA-50 qui impacte sa sensibilité aux β -lactamines mais dont le rôle précis reste incertain^{64,228,229}. *P. aeruginosa* produit également l'aminoside phosphotransférase (APH) APH(3')II associée à la résistance à la streptomycine, à la kanamycine et à la néomycine²³⁰.

4.1.2.2 Les mécanismes de résistance acquis

La résistance acquise à certains antibiotiques par une sous-population de l'espèce apparaît à la suite de mutations ou par l'acquisition de nouveaux gènes par THG. La résistance acquise contribue grandement au développement de la multirésistance chez *P. aeruginosa*, le rendant difficile à éradiquer²²⁰.

De nombreuses mutations de gènes du *core genome* peuvent modifier la sensibilité aux antibiotiques. Par exemple, des mutations dans le gène *oprD* ou dans d'autres gènes comme *parR* peuvent altérer ou conduire à la perte de la porine OprD avec pour conséquence une résistance aux carbapénèmes, en particulier à l'imipénème²²⁸.

Les mutations inactivant *ampD* sont responsables de la surproduction de la β -lactamase AmpC²¹⁸. AmpD réprime l'expression du gène *ampC*. Ainsi, l'inactivation d'AmpD affecte la conformation du régulateur de transcription AmpR qui, dérégulé, va augmenter la transcription d'*ampC* (Figure 16). Les mutations conduisant à la surproduction des pompes d'efflux constituent également un des mécanismes majeurs de résistance acquise. Par exemple, la surproduction de la pompe d'efflux MexAB-OprM résultant de mutations dans ses régulateurs transcriptionnels (*mexR*, *nalC*, *nalD*) augmente la résistance aux fluoroquinolones et aux β -lactamines (sauf à l'imipénème). Couplé à la perte de la porine OprD, ce mécanisme entraîne une résistance au méropénème^{226,231}. La surproduction du système d'efflux MexXY-OprM, résultant souvent d'une mutation dans le gène *mexZ*, augmente la résistance aux aminosides, au céfépime, et aux fluoroquinolones^{232,233}.

D'autres mutations réduisent l'affinité de l'antibiotique avec sa cible. L'exemple typique est la perte d'affinité des fluoroquinolones, antibiotiques qui inhibent la synthèse de l'ADN, avec leurs cibles. Cette perte d'affinité est due à des mutations dans les gènes codant pour les gyrases (*gyrA* et *gyrB*) ou dans les gènes codant pour les topoisomérases de type IV (*parC* et *parE*)²²⁰. Les principales mutations connues pour entraîner des mécanismes de résistance sont présentées dans le Tableau 3.

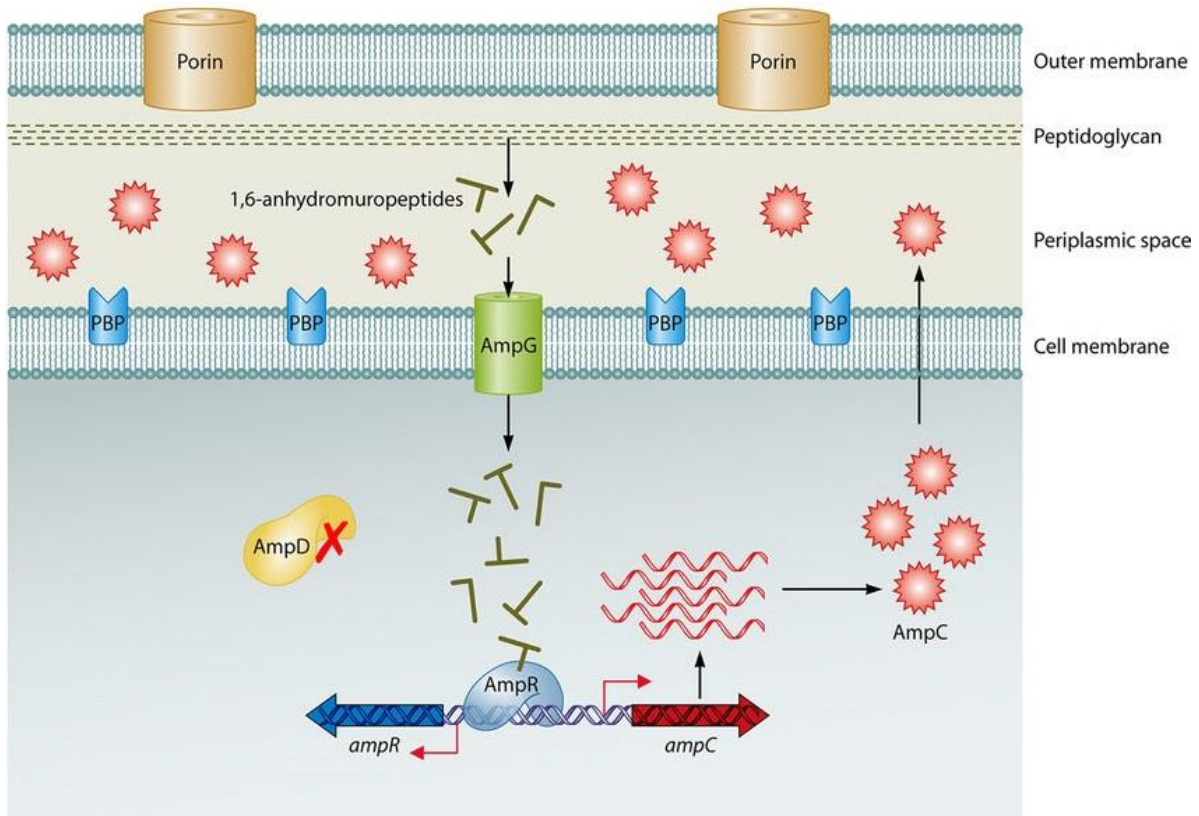


Figure 16. Dérepression du gène *ampC* liée à une mutation dans le gène *ampD*. Une mutation dans le gène *ampD* ou dans certains de ses homologues peut réduire son expression ou conduire à une inactivation de la protéine AmpD ayant pour conséquence un arrêt de la dégradation des peptides issus du recyclage de la paroi cellulaire qui s'accumulent dans le cytoplasme. Ces peptides sont normalement dégradés par la protéine AmpD avant de rejoindre l'espace périplasmique. Lorsqu'ils ne sont pas dégradés, ils ont un effet inducteur sur AmpR qui va changer de conformation et activer la transcription du gène *ampC*, qui va être exprimé constitutivement et à un niveau élevé. D'après Lister *et al.*²¹⁸.

En plus des résistances acquises grâce à des mutations dans des gènes du *core genome*, *P. aeruginosa* peut acquérir des gènes par THG. Les gènes conférant des résistances peuvent être situés sur des intégrons, des transposons, des plasmides ou portés par des prophages et codent généralement pour des β -lactamases^{234,235}. Les β -lactamases les plus fréquentes sont les β -lactamases de classe D avec notamment les oxacillines (OXA) à spectre étendu (OXA-14, OXA-28) et de classe A (PER, GES, BEL et PME)²³⁶. Les carbapénémases les plus fréquentes sont les MBL avec notamment celles de types IMP ou VIM²³⁵. Les intégrons peuvent porter plusieurs gènes de résistance, par exemple, des gènes de résistance aux aminosides ont été identifiés sur des intégrons contenant le gène cassette codant pour la β -lactamase VIM-2²³⁷. *P. aeruginosa* peut également acquérir des aminosides acétyltransférases (AACs) associées à la résistance à la gentamicine, à la tobramycine, à la kanamycine ou encore à l'amikacine et des aminosides nucléotidyltransférases (ANTs) associées à la résistance à la tobramycine, à la gentamicine et à l'amikacine.

Gene(s)	Resistance mechanism	Antibiotics affected
<i>gyrA</i>	Quinolone target modification (DNA gyrase)	Fluoroquinolones
<i>gyrB</i>	Quinolone target modification (DNA gyrase)	Fluoroquinolones
<i>parC</i>	Quinolone target modification (DNA topoisomerase IV)	Fluoroquinolones
<i>parE</i>	Quinolone target modification (DNA topoisomerase IV)	Fluoroquinolones
<i>pmrA, pmrB, phoQ, cprS, colR, colS</i>	Lipopolysaccharide modification	Polymyxins
<i>parR</i>	Lipopolysaccharide modification	Polymyxins
	OprD downregulation	Imipenem, meropenem
	MexEF-OprN hyperproduction	Fluoroquinolones
	MexXY hyperproduction	Fluoroquinolones, aminoglycosides, cefepime
<i>parS</i>	Lipopolysaccharide modification	Polymyxins
	OprD downregulation	Imipenem, meropenem
	MexEF-OprN hyperproduction	Fluoroquinolones
	MexXY hyperproduction	Fluoroquinolones, aminoglycosides, cefepime
<i>mexR, nalC, nalD</i>	MexAB-OprM hyperproduction	Fluoroquinolones, ceftazidime, cefepime, piperacillin-tazobactam, meropenem, ceftazidime-avibactam
<i>nfxB</i>	MexCD-OprJ hyperproduction	Fluoroquinolones, cefepime
<i>mexS</i>	MexEF-OprN hyperproduction	Fluoroquinolones
	OprD downregulation	Imipenem, meropenem
<i>mexT</i>	MexEF-OprN hyperproduction	Fluoroquinolones
	OprD downregulation	Imipenem, meropenem
<i>cmrA, mvaT, PA3271</i>	MexEF-OprN hyperproduction	Fluoroquinolones
<i>mexZ, PA5471.1, amgS</i>	MexXY hyperproduction	Fluoroquinolones, aminoglycosides, cefepime
<i>oprD</i>	OprD porin inactivation	Imipenem, meropenem
<i>ampC</i>	AmpC structural modification	Ceftolozane-tazobactam, ceftazidime-avibactam
<i>ampD, ampDh2, ampDh3, ampR, dacB, mpl</i>	AmpC hyperproduction	Ceftazidime, cefepime, piperacillin-tazobactam
<i>ftsI</i>	β -Lactam target modification (PBP3)	Ceftazidime, cefepime, piperacillin-tazobactam, ceftolozane-tazobactam, ceftazidime-avibactam, meropenem
<i>fusA1</i>	Aminoglycoside target modification (elongation factor G)	Aminoglycosides
<i>glpT</i>	Inactivation of transporter protein GlpT	Fosfomycin
<i>rpoB</i>	Rifampin target modification, RNA polymerase β -chain	Rifampin

Tableau 3. Principaux gènes appartenant au core genome dont les mutations sont responsables d'une augmentation de résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*. D'après Horcajada *et al.*²²⁸.

4.1.3 Structure de la population

La structure de la population de *P. aeruginosa* est dite non clonale épidémique²³⁸, ce qui signifie qu'il n'existe pas de clone spécifique à un habitat et que la population est composée d'un nombre limité de clones diffusant à large échelle. *P. aeruginosa* possède un *core genome* très conservé et un génome accessoire constitué d'éléments génétiques variés tels que des plasmides ou encore des blocs d'ADN insérés dans le chromosome²³⁹. L'acquisition des éléments génétiques variés du génome accessoire se fait majoritairement par THG²⁴⁰, résultant ainsi en une grande diversité entre les différents clones^{239,241}.

La diversité de la population de *P. aeruginosa* a largement été caractérisée grâce à la MLST (Figure 17). Le schéma de MLST développé par Curran *et al.* en 2004 est basé sur les sept gènes de ménage suivants : *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, et *trpE*²⁴². En février 2021, on dénombre plus de 3600 STs différents. Bien que la plupart des STs soient représentés par un ou quelques isolats, il en existe certains qui ont diffusé à large échelle voire mondialement. Ces clones sont appelés clones à haut risque (ou clones internationaux à haut risque ou clones à haut risque épidémique) et sont notamment représentés par les trois principaux clones ST111, ST175 et ST235 et par d'autres clones comme les suivants : ST17, ST233, ST244, ST357, ST395, ST253, ST308, ST309, ST277²⁴³.

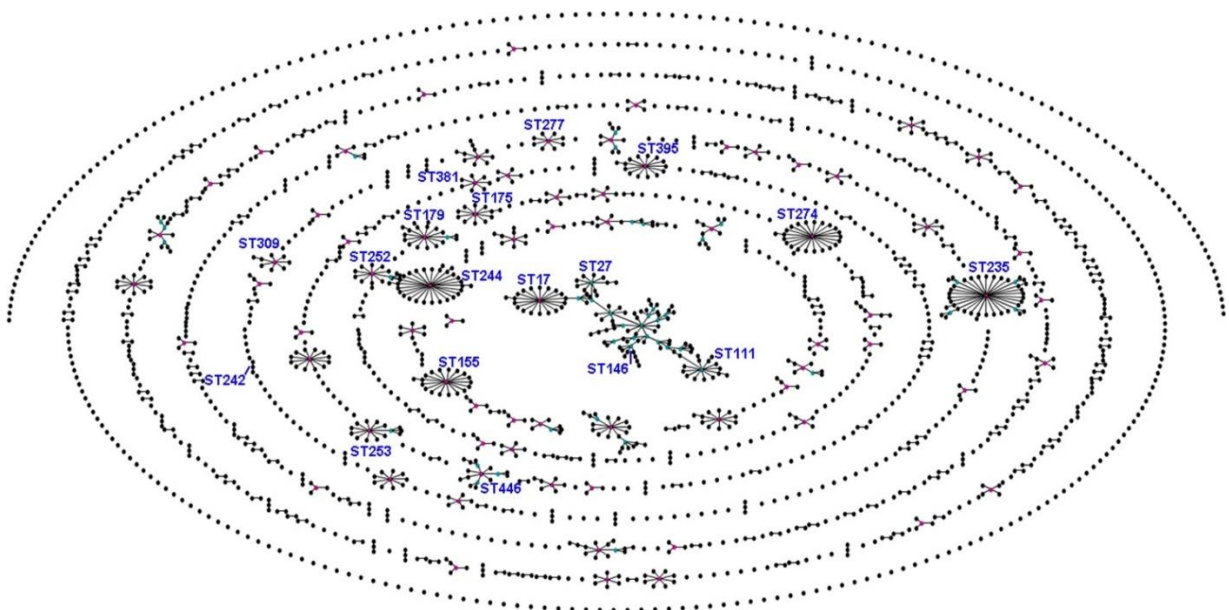


Figure 17. Diagramme de la population de *P. aeruginosa* à partir des 2106 STs disponibles au 03/06/2015 sur la base de données PubMLST. Chaque point représente un ST et les lignes connectent les STs avec un locus de différence. Les STs détectés dans au moins trois pays avec plus de 10 isolats collectés sont indiqués. Les STs indiqués sont les STs considérés comme à l'origine du complexe clonal auquel ils appartiennent. D'après Oliver *et al.*²⁴⁰.

On observe une grande diversité parmi les souches de *P. aeruginosa* provenant d'infections hospitalières, de patients atteints de mucoviscidose ou de l'environnement²⁴³. La diversité de *P. aeruginosa* est cependant moins importante chez les souches multirésistantes aux antibiotiques que chez les souches sensibles^{244,245}. Les clones responsables d'infections humaines sont donc généralement soit des clones qui ont diffusé mondialement (clones à haut risque), soit des clones possédant des caractéristiques particulières permettant de s'adapter à une niche²⁴⁶. L'exception concerne les patients atteints de mucoviscidose, chez qui la diversité génétique des isolats de *P. aeruginosa* est élevée²⁴⁷.

La connaissance de la structure de la population de *P. aeruginosa* a évolué au cours du temps. Le premier génome de *P. aeruginosa* à avoir été complètement séquencé est celui de PAO1²¹³. Les analyses phylogénétiques ont structuré l'espèce en deux groupes, avec un groupe représenté par PAO1 et un autre par PA14, puis en trois groupes^{248,249}. Plus récemment, le WGS a permis de mieux structurer la population de *P. aeruginosa* et son pangénome⁴⁵. Une analyse phylogénétique réalisée à partir de 1311 génomes de *P. aeruginosa* a identifié deux nouveaux groupes phylogénétiques, divisant ainsi l'espèce en cinq groupes, remplaçant les trois groupes définis auparavant (Figure 18)⁴⁵.

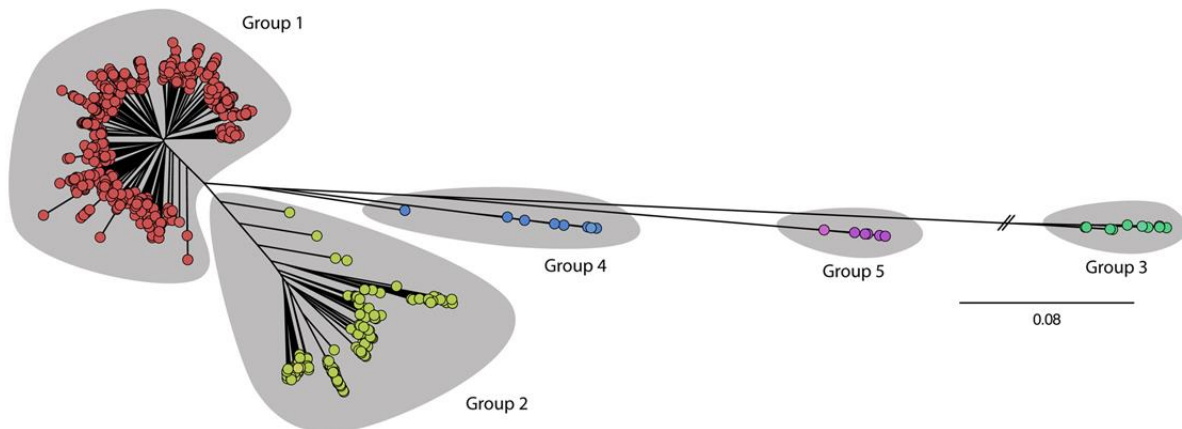


Figure 18. Arbre phylogénétique de l'espèce *P. aeruginosa* divisée cinq groupes. Arbre phylogénétique de tous les isolats de *P. aeruginosa* calculé à partir des SNPs ($n = 55\ 664$) présents dans les 448 gènes du *core genome*. Les différents groupes d'isolats sont mis en évidence par des zones grises. Les isolats appartenant à chaque groupe sont identifiés par une couleur spécifique (groupe 1 : rouge ; groupe 2 : vert ; groupe 3 : turquoise ; groupe 4 : bleu ; groupe 5 : violet). D'après Freschi *et al.*⁴⁵.

4.1.4 Succès des clones à haut risque

Comme mentionné dans la partie précédente, la diversité génétique est plus faible parmi les isolats de *P. aeruginosa* multirésistants aux antibiotiques, fréquemment isolés dans les hôpitaux. Ces isolats multirésistants sont souvent des clones à haut risque²⁴⁰. L'importance de ces clones dans les isolats collectés à partir d'infections hospitalières a particulièrement bien été décrite dans une étude réalisée en Espagne. La majorité des isolats de *P. aeruginosa* responsables de bactériémies sensibles aux antibiotiques étaient représentés par des génotypes uniques tandis que 90% des isolats *Extensively drug resistant* (XDR) appartenaient aux trois clones à haut risque majeurs (ST111, ST175, et ST235)^{250,251}. Parmi ces trois clones, ST235 est sans aucun doute le plus répandu. En effet, il a été retrouvé dans de nombreux pays à travers les cinq continents peuplés²⁴⁰. ST111 a lui aussi diffusé mondialement, à l'exception de l'Océanie. ST175, quant à lui, a diffusé surtout en Europe et au Japon (Figure 19). Une étude sur l'origine du ST235 a révélé que ce clone aurait émergé en 1984 en Europe pour se diviser en deux clades qui ont ensuite diffusé indépendamment²⁵².

D'autres clones à haut risque existent et ont diffusé dans plusieurs pays à travers la planète. Parmi eux, on retrouve ST233, ST244, ST277, ST298, ST308, ST357, ST654, ou encore ST395^{243,253-257}.

Le succès des clones à haut risque et de leur diffusion est en partie attribuable aux nombreux mécanismes de résistance qu'ils possèdent^{240,252}. Par exemple, une étude sur 22 isolats du clone ST175 a permis d'identifier des combinaisons de mutations dans différents gènes. En effet, les isolats étaient multirésistants aux antibiotiques grâce à des mutations dans le gène *ampR* entraînant une surexpression du gène *ampC*, des mutations dans le gène *oprD* conférant une résistance aux carbapénèmes, une mutation dans *mexZ* conduisant à une surproduction du système d'efflux MexXY. Les gènes *gyrA* et *parC* étaient également mutés pour tous les isolats, à l'origine de leur résistance aux fluoroquinolones²⁵⁸.

Plusieurs études ont identifié des mutations dans les gènes *oprD*, *gyrA* et *parC*, ou encore *mexZ* dans les génomes des clones ST111 et ST235, conduisant ainsi à des phénotypes de multirésistance^{259,260}.

Les clones à haut risque ont également acquis du matériel génétique par THG^{228,261}. Les clones ST111 et ST235 sont les deux clones les plus fréquemment producteurs de BLSE ou de MBL²²⁸. La Figure 20 montre les principales carbapénémases identifiées dans les clones à haut risque majeurs. Une grande partie des gènes de résistance acquis par *P. aeruginosa* sont portés par des intégrons et des transposons qui se propagent via des plasmides et des ICEs²⁶¹.

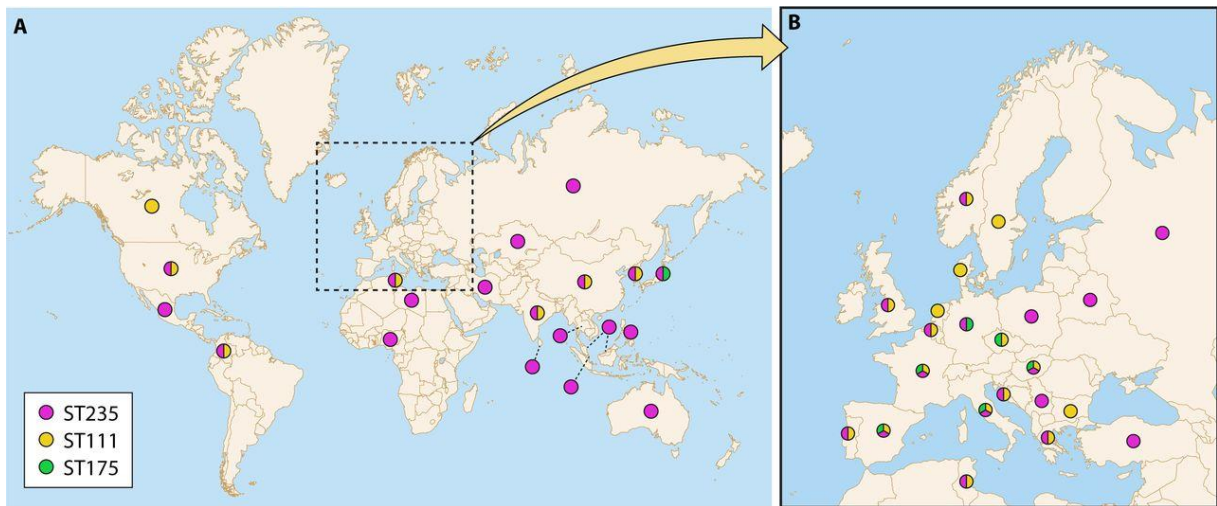


Figure 19. Carte de la distribution mondiale (A) et Européenne (B) des clones à haut risque ST111, ST175 et ST235. Carte réalisée à partir de données publiées sur l'apparition des différents clones dans le monde. D'après Oliver *et al.*²⁴⁰ et adapté par Horcajada *et al.*²²⁸.

Notons également la présence spécifique du gène *dprA* dans le génome du clone ST235²⁵². La protéine DprA est impliquée dans le processus de recombinaison entre l'ADN étranger et le chromosome lors du processus de transformation. Il est donc possible que le clone ST235 acquière plus facilement de l'ADN par transformation que les autres clones. Cependant, DprA n'est pas le seul acteur impliqué dans le processus de transformation⁶⁹. L'acquisition de l'ADN par transformation est possible uniquement si toute la machinerie nécessaire à la transformation est active, ce qui n'a pas été déterminé pour le clone ST235.

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont un rôle important dans le succès des clones à haut risque, cependant, d'autres facteurs semblent également impliqués. Il a été montré que les trois clones à haut risque principaux produisaient plus de biofilms, avaient un moins bon fitness dans des expériences de compétition, une motilité plus faible et que ces clones présentaient une déficience de production de pyoverdine et de pyocyanine. Les auteurs suggèrent que ces facteurs pourraient favoriser l'adaptation à l'hôte favorisant ainsi la diffusion de ces clones²⁵¹.

4.1.5 Epidémiologie hospitalière

En France, comme mentionné dans la partie 4.1.1, *P. aeruginosa* est responsable de 6,28% des infections nosocomiales selon la dernière enquête de prévalence réalisée en 2017¹⁰. *P. aeruginosa* est également fréquemment impliqué dans les infections urinaires mais il est surtout fréquemment responsable d'infections respiratoires, notamment dans les services de soins intensifs^{262,263}.

ST	Clonal Complex	O-antigen Serotype	T3SS	CONTINENT						CARBAPENEMASE								
				N. America	S. America	Europe	Africa	Asia	Oceania	<i>bla</i> FIM	<i>bla</i> GES	<i>bla</i> GIM	<i>bla</i> IMP	<i>bla</i> KPC	<i>bla</i> NDM	<i>bla</i> OXA-48	<i>bla</i> SPM	<i>bla</i> VIM
ST235	CC235	O11	ExoU+															
ST111	CC111	O12 (O4)	ExoS+															
ST233	CC233	O6	ExoS+															
ST244	CC244	O2	ExoS+															
ST357	CC357	O11	ExoU+															
ST308	CC308	O11	ExoU+															
ST175	CC175	O4	ExoS+															
ST277	CC277	O2	ExoS+															
ST654	CC654	O11	ExoS+															
ST298	CC446	O11	ExoU+															

Figure 20. Résumé des principales caractéristiques des clones à haut risque majeurs. Les carrés noirs indiquent que la variable correspondante a déjà été décrite pour le clone correspondant. ST, *sequence type* ; T3SS, *type III secretion system*. D'après Barrio-Tofiño *et al.*²⁴³.

Les infections nosocomiales à *P. aeruginosa* peuvent avoir des origines multiples. Les origines de contamination les plus fréquentes des infections liées à *P. aeruginosa* sont la transmission croisée entre patients ou entre les membres du personnel et le patient, la contamination hydrique via les points d'eau ou encore le portage endogène de la bactérie. L'origine environnementale des souches de *P. aeruginosa* responsables d'infections a été mise en évidence dans de nombreuses études^{216,264-267}. Il est cependant rarement possible d'identifier si l'origine de la contamination est réellement environnementale ou si le clone s'est propagé par transmission croisée pour ensuite coloniser l'environnement des patients. Dans leur étude, Quick *et al.* ont démontré l'origine environnementale d'une épidémie grâce à l'utilisation du WGS. Ils ont montré qu'un clone ST395 présent dans le réseau d'eau dès l'ouverture d'un nouvel hôpital était responsable d'infections à *P. aeruginosa* chez les patients d'une unité de soin des brûlés⁴⁰. La contribution des infections liées à une origine endogène de *P. aeruginosa* dans les infections nosocomiales, notamment dans les unités de soins intensifs est toujours débattue^{268,269}. L'origine endogène des infections est évoquée lorsque les patients sont porteurs digestifs de *P. aeruginosa* tandis que les infections d'origine exogène sont liées à l'environnement ou à la transmission croisée^{217,270}.

Les infections liées à des clones de *P. aeruginosa* multirésistants aux antibiotiques compliquent le choix du traitement pour les patients infectés. Dans les bactériémies liées à *P. aeruginosa*, les patients présentent souvent de nombreuses comorbidités²⁷¹. Ces bactériémies sont

également associées à un taux de mortalité élevé (>40%)^{16,272}. Certaines études ont également identifié que l'âge était un facteur associé au risque de développer des bactériémies à *P. aeruginosa*, ou d'être porteur à l'entrée en unités de soins intensifs²⁷³⁻²⁷⁵. Dans l'une de ces études, 60% des bactériémies étaient décrites comme acquises à l'hôpital, 27% par les soins et 12% comme acquises dans la communauté²⁷².

4.1.6 Diffusion communautaire

En dehors des patients atteints de la mucoviscidose, il existe peu de données sur la diffusion de *P. aeruginosa* dans la communauté. Le portage intestinal ou cutané de *P. aeruginosa* chez les individus sains et immunocompétents est décrit comme 'non fréquent et transitoire' (*sic*)²⁴⁶. Ainsi, une étude souligne que *P. aeruginosa* peut faire partie de la flore cutanée chez environ 2% des individus sains et être retrouvé dans les zones humides de la peau comme l'oreille externe, les aisselles ou les régions ano-génitales²⁷⁶. Dans une autre étude, 15,7% des échantillons de selles d'individus sains (âge moyen de 32 ans) étaient positifs *P. aeruginosa*²⁷⁷.

4.1.7 Objectifs de l'étude

Les bactériémies à *P. aeruginosa* surviennent surtout chez les personnes âgées et sont associées à une mortalité élevée. Dans ces travaux, nous avons émis l'hypothèse que l'âge était associé au portage digestif de *P. aeruginosa*. Pour tester cette hypothèse et pour identifier l'origine de contamination, nous avons déterminé la prévalence de portage digestif de *P. aeruginosa* chez des résidents hébergés dans des centres de long séjour, identifié les facteurs de risque associés à ce portage et nous avons déterminé la structure de la population des isolats de *P. aeruginosa* collectés durant l'étude. Le manuscrit correspondant à cette étude est rédigé mais celui-ci n'a pour le moment pas pu être soumis en raison de l'utilisation des données associées aux résidents et sera soumis après la publication de l'article du WP1 du projet MODERN.

4.2 Résultats

4.2.1 Forte prévalence de portage de *P. aeruginosa* et grande diversité génétique chez les résidents de 20 établissements de long séjour français et allemands.

Résumé

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste dont la population est non clonale et dont seuls quelques clones à haut risque diffusent dans le monde entier. Les bactériémies liées à *P. aeruginosa* sont associées à des taux de mortalité élevés et sont plus fréquentes chez les personnes âgées pour des raisons inconnues.

Dans cette étude, nous avons évalué la prévalence de portage intestinal de *P. aeruginosa* chez les résidents de 18 établissements de long séjour ainsi que l'incidence d'acquisition dans trois établissements de long séjour pendant une période de 32 semaines. Nous avons identifié les facteurs associés au portage et à l'acquisition de *P. aeruginosa*. Les isolats ont été séquencés par WGS et les données ont été utilisées pour déterminer la structure de la population de toute la collection d'isolats et pour identifier les gènes de résistance aux antibiotiques.

Nous avons trouvé un taux élevé de portage intestinal de *P. aeruginosa* de 51,6 % sur l'ensemble de la période d'étude. Au cours de la période de suivi, 28,6 % des résidents sont devenus porteurs de *P. aeruginosa*. L'âge, le sexe masculin et l'incontinence urinaire étaient associés au portage de *P. aeruginosa*, tandis que l'utilisation d'un fauteuil roulant et l'obésité étaient associées à son acquisition. La structure de la population des 208 isolats cliniques était principalement non clonale et représentée par 111 ST différents. Quelques clones à haut risque comme ST17, ST395, ST309, ST253 ont cependant été collectés dans différents établissements de long séjour. Plusieurs clones à haut risque prélevés dans l'environnement étaient proches phylogénétiquement d'isolats collectés chez des résidents, mettant en évidence une transmission potentielle à partir de l'environnement.

Nos résultats suggèrent que l'acquisition individuelle est une voie d'acquisition plus fréquente que la transmission chez les résidents des établissements de long séjour. Ces acquisitions individuelles pourraient être responsables du taux plus élevé de bactériémies causées par *P. aeruginosa* chez les personnes âgées, qui pourraient être principalement d'origine endogène.

Texte de l'article (en attente de soumission) :

High prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* carriage in residents of French and German long-term care facilities

Daniel Martak^{1,2*}, Houssein Gbaguidi-Haoré¹, Alexandre Meunier^{1,2}, Benoit Valot²,

Nadine Conzelmann³, Michael Eib⁴, Ingo B. Autenrieth⁴, Céline Slekovec¹,

Evelina Tacconelli⁵, Xavier Bertrand^{1,2}, Silke Peter⁴, Didier Hocquet^{1,2,5}, Julia Guther⁴

1 Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire, Besançon, France

2 UMR 6249 Chrono-environnement, CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

3 Infectious Diseases, Dept. of Internal Medicine I, University Hospital Tübingen, Tübingen, Germany

4 Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University Hospital Tübingen, Tübingen, Germany

5 Centre de Ressources Biologiques - Filière Microbiologique de Besançon, Centre Hospitalier Universitaire, Besançon, France

* Corresponding author: Daniel MARTAK

Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire, 3 boulevard Fleming,
Besançon, Cedex 25030, France.

Tel: (33) 3 70 63 21 34

Fax: (33) 3 70 63 21 27

Running title: Frequent *P. aeruginosa* intestinal carriage in the elderly

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for bloodstream infections (BSI) associated with high mortality rates, which are more frequent in the elderly for unknown reasons. Here, we assessed the prevalence of *P. aeruginosa* intestinal carriage in the residents of 18 long-term care facilities (LTCFs) (cohort I) and the incidence of acquisition in three LTCFs during a 32-week study period (cohort II). In cohorts I and II, fecal samples were collected from 403 LTCF residents. In cohort II, environmental samples (n=289) were collected from the U-bends of sinks at baseline and after 20 weeks, and from drinking water points at week 32. We identified the factors associated with the carriage and acquisition of intestinal *P. aeruginosa*. The resistance profile to antipseudomonal agents was assessed for all isolates with agar diffusion method. Genome sequences were used to determine the population structure of the isolate collection and to identify antibiotic resistance determinants. We found a high rate of *P. aeruginosa* intestinal carriage of 51.6% among the entire study period. Over the follow-up period, 28.6% of the residents acquired intestinal *P. aeruginosa*. In total, we collected 241 isolates of *P. aeruginosa* (208 from residents and 33 from the environment). Age (cohort I, $p=0.002$ and cohort II, $p=0.018$), urinary incontinence (cohort I, $p=0.003$) and male gender (cohort II, $p=0.039$) were associated with carriage, while wheelchair usage ($p=0.013$) and a body mass index >25 ($p=0.026$) were associated with acquisition of the pathogen. The population structure of the 208 clinical isolates was mainly non-clonal with 111 different STs, although several clones (*i.e.* ST17, ST395, ST309, and ST253) spread in independent LTCFs. Several high-risk clones were collected from the environment and were clustered with isolates collected from residents, highlighting potential transmission from the environment. The vast majority of clinical isolates were susceptible to the antibiotics tested, with no genes conferring resistance to antipseudomonal agents.

Overall, we found an unexpected high prevalence of *P. aeruginosa* intestinal carriage, associated with increasing age, male gender, obesity, and wheelchair usage. The population of *P. aeruginosa* was mainly susceptible to antipseudomonal agents and polyclonal. Our results suggest that individual acquisition is a more frequent route of acquisition than inter-human transmission in LTCF population. These individual acquisitions could be responsible for the higher rate of BSI caused by *P. aeruginosa* in the elderly, which might be mostly of endogenous origin.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous Gram-negative bacterium, found in many environments such as soils, plants, or water [1]. It is also an opportunistic pathogen responsible for severe infections in immunocompromised, burned or cystic fibrosis patients [2,3]. *P. aeruginosa* bloodstream infections (BSIs) are associated with mortality rates higher than 40% [4,5]. The incidence of BSI with *P. aeruginosa* has been found to increase with age for reasons that remain unknown [4,6].

The sources of infections with *P. aeruginosa* can be either exogenous, with water points of use and other patients being common sources *P. aeruginosa* in hospital settings [2,7–10], or endogenous, with the patients' endogenous flora being a major source of this opportunistic pathogen [7,11]. However, *P. aeruginosa* intestinal carriage has been described as infrequent and temporary, as it is readily eliminated by a healthy immune system [12,13]. Despite the higher risk of disease with *P. aeruginosa* in the elderly and the subsequent mortality [4–6], the proportion of elderly non-hospitalized population carrying this pathogen is unknown.

The species has a non-clonal population structure but several so-called 'high-risk clones' spread worldwide and became a public health concern notably due to their multi-drug resistance patterns [14]. These high-risk clones include a few sequences types (STs) such as ST111, ST175, ST235, ST308, and ST395 [15,16].

In recent years, the analyses of genome sequences allowed the sharp definition of population structures of different bacterial species including *P. aeruginosa* [17].

Here, we determined if increasing age or duration of stay in a long-term care facility (LTCF) were associated with higher prevalence and incidence of *P. aeruginosa* intestinal carriage. We then defined the population structure of our collection to identify the routes of acquisition and the epidemiology of *P. aeruginosa* in LTCFs from two European countries.

METHODS

Study design. This study was conducted as a prospective multicenter study between November 2017 and April 2019 in 18 LTCFs from France and two LTCFs from Germany (Fig. S1). The prevalence of *P. aeruginosa* carriage was determined with cohorts I and II and the incidence of *P. aeruginosa* acquisition was determined with cohort II. Cohort I included residents of 17 French NHs and one LTCF located in Bourgogne-Franche-Comté (eastern France) and was used to determine the point prevalence of intestinal *P. aeruginosa* carriage. We described the selection of facilities and residents elsewhere. Briefly, a two-stage random sampling method was used to select NHs/LTCF and residents eligible to participate [18].

Cohort II included residents of one French LTCF (also included in cohort I, but with a larger number of residents) located in Besançon (France) and the two German LTCFs located in Tübingen (Germany). The present study was an ancillary study of the MODERN project (Reference MS MODERN WP1).

One fecal sample was obtained from each resident of the cohort I. Fecal samples of residents of the cohort II were collected eight times (*i.e.* at baseline and after 1, 4, 12, 20, 21, 24, and 32 weeks).

Residents included in both cohorts provided written consent. The study was approved by ethics committees prior to study commencement (Comité de Protection des Personnes – Ouest III, France, reference 2017-A02640-53; Comité d'Etude Clinique of Besançon University Hospital, France, reference: 2017-A00276-47; and Ethik-Kommission of Tübingen University Hospital, Germany, reference 818/2017BO1).

Additionally, environmental samples were collected in cohort II. Water from the U-bends of the residents' personal bathrooms was sampled two times (*i.e.* at baseline and after 20 weeks). At week 32, we sampled water from drinking water points in the French LTCF of Besançon

with a method adapted from the EN ISO 19458. Briefly, one liter of water was collected in sterile bottles after a 1-min pre-flush.

Data collection. Different sets of data were collected for cohorts I and II. For each LTCF fostering residents of the cohort I, we documented the LTCF capacity, number of health-care workers, number of beds, and presence of hand-sanitizer dispensers. The following personal data from the cohort I residents were collected: age, sex, date of admission, roommate number (if included in the study), comorbidities and diseases, antibiotics intake or hospitalization during the six last months, and presence of medical devices (Table S1 and S2).

For cohort II, data about the LTCF and the residents were collected at the beginning of the study and each sampling week thereafter (*i.e.* resident habits, hospitalization, presence of medical devices, and antibiotics administration since the last sample) (Table S3 and S4).

Statistical analysis. Data are reported as medians (inter-quartile ranges [IQR]) for continuous variables and frequencies (percentages) for categorical variables. Comparison of continuous data was performed using the Student's t-test or the Mann-Whitney U test while the categorical data were compared using the Pearson's Chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. Factors independently associated with the prevalence of *P. aeruginosa* fecal carriage or its acquisition in residents were determined using ordinary or random-effects logistic regression models taking into account clustering effects of data (*i.e.*, within-LTCF correlation and repeated screening in residents). Multivariable models were built using a backward elimination process with independent variables with a *p*-value of less than 0.10 in univariable analysis. All analyses were conducted using the software package Stata, version 14.1 (Stata Corp., College Station, TX, USA). A *p*-value of less than 0.05 was considered as statistically significant.

Microbiological analysis. Stool samples or rectal swabs were collected and analyzed within 24 h. Samples were streaked on ceftrimide agar plates (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) for selective isolation of *P. aeruginosa*. Environmental samples were collected using a sterile syringe and a suction catheter, 50 mL of wastewater were aspirated from the bottom of each U-bend from the sink of the residents' bathrooms. The samples were centrifuged 5 min at 5000 *g* at room temperature. The supernatant was discarded and 100 μ L of the pellet were transferred to 10 mL Tryptic Soy Broth (TSB; Oxoid, Wesel, Germany) and incubated at 37°C overnight. After enrichment in TSB, 25 μ L were streaked on ceftrimide agar and incubated overnight at 37°C. One liter of water was collected from the drinking water points in the French LTCF of the cohort II. Water samples were filtered (Microfil V 0.45 μ m cellulose filters; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and the filters were incubated 48 h at 37°C on ceftrimide agar. All isolates were identified by MALDI-TOF MS (Microflex LT; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) with a log value ≥ 2 according to the manufacturer's recommendations and stored at -80°C until further analysis. We sequenced the whole genome of all isolates gathered from cohort I and that of the first isolate of each resident of cohort II.

Genome sequencing and analysis. Bacterial DNA was isolated from an overnight culture on Mueller-Hinton agar (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) and extracted with a QIAmp DNA Minikit or QIAGEN DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA was sequenced on an Illumina NovaSeq or an Illumina NextSeq, both generating 150-bp paired-end reads with a mean coverage of 80X. Reads were assembled using SPAdes v13.3.0 [19]. All paired-end reads were uploaded on the SRA under Bioproject accession number PRJNA683221. Biosample details are given in the Table S5.

STs were determined *in silico* [20]. We quantified ST diversity by calculating Simpson's diversity index (SDI) and 95% confidence interval (CI) for LTCFs of the cohort II with a number of isolates >20.

Core genome was determined using Spine v0.1.2 [21]. Prophage sequences were searched with phaster.ca [22] and removed for core genome phylogeny analysis. SNP calling was performed with a customized python pipeline including GATK v.3.2-2 and SAMtools v.0.1.19 [23,24]. A Bio Neighbor Joining (BioNJ) tree based on differences on the core genes was constructed with SplitsTree5 [25]. Maximum likelihood (ML) trees were built with RAxML v.8.2.6 [26] with general time-reversible (GTR) substitution model and gamma distribution of rates undergoing 1,000 bootstraps. Phylogenetic trees were annotated and visualized with iTOL v5.7 [27].

Phenotypic and genotypic antibiotic resistance profiles. Susceptibility for eight antimicrobial substances (tobramycin, piperacillin, piperacillin/tazobactam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, meropenem, and imipenem) were tested for all isolates according to the current recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2021). Chromosomal and acquired resistant determinants were identified using ResFinder v4.0 [29].

RESULTS

Prevalence and acquisition of *P. aeruginosa* among residents. The prevalence of *P. aeruginosa* carriage was determined within the two cohorts. Overall, we screened 403 residents and found 208 carriers (51.6%) during the 32-week study period.

The cohort I was a point-prevalence survey while the cohort II was a prevalence and follow-up survey (Fig. S1). In cohort I, we enrolled 262 residents across 18 LTCFs, and found 123 carriers (46.9%), with disparities of prevalence between the different facilities (Min: 20.0%, Max: 66.7%) (Figure 1A). In cohort II, we determined the prevalence at the first week of sampling. Overall, 159 residents were enrolled of whom 155 provided a fecal sample. In the LTCF Fra2, we recruited 76 residents (in addition to the 34 from cohort I) for a total of 100 residents. We found 34.2% (53/155) of the fecal samples positive for *P. aeruginosa* (Figure 1B) with a distribution of positive samples of 36% (36/100) in the LTCF Fra2, 16.7% (4/24) in the LTCF Ger1 and 41.9% (13/31) in the LTCF Ger2 (Figure 1B). We then obtained a maximum of eight samples per resident during the 32-week period of follow-up. Sixteen additional residents were recruited during the follow-up to replace deceased residents bringing the number of residents included in the follow-up to 175. Overall, we collected 958 samples from the 175 residents included in the follow-up and found that 58.9% of the residents had at least one positive fecal sample to *P. aeruginosa* over the 32-week period of sampling. Fifty residents (28.6%) became *P. aeruginosa* carriers during the study period (31, 12, and 7 residents from Fra2, Ger1, and Ger2, respectively) (Figure 1B).

We then determined the factors independently associated with the prevalence of *P. aeruginosa* fecal carriage or its acquisition by residents. Data collected on LTCFs and residents in Table S1 and Table S2 for cohort I and in Table S3 and S4 for cohort II. Table 1 shows the results of the multi-variate analysis. In cohort I, we found that age and urinary incontinence were associated with a higher risk of *P. aeruginosa* carriage while the systematic use of bedpan washers was associated with a lower risk (Table 1). In cohort II, we found that

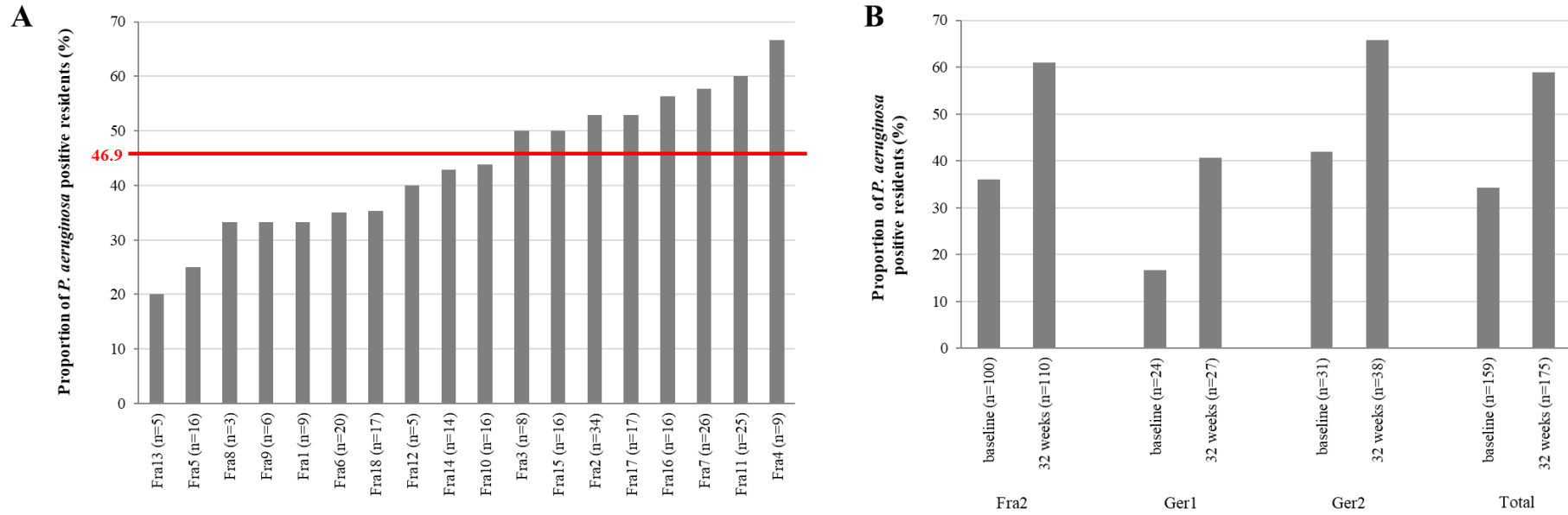


Figure 1. Proportion of positive residents to intestinal *P. aeruginosa* carriage during cohort I and cohort II. A. Proportion of positive residents in LTCFs of the cohort I. The red line indicates the mean proportion of positive residents among all residents from whom fecal samples were obtained. B. Number of positive residents at baseline and after a follow-up of 32 weeks.

age and male gender were associated with a higher risk of intestinal carriage of *P. aeruginosa*. By investigating factors associated with *P. aeruginosa* acquisition in cohort II, we found that a body mass index (BMI) >25 and wheelchair usage were associated with *P. aeruginosa* intestinal acquisition (Table 1).

We also collected 289 samples from the environment: wastewater samples from U-bends (n=254) and water from drinking water points (n=35). We found that 12.2% (31/254) of the U-bends samples and 2.9% (1/35) of the drinking water points were contaminated with *P. aeruginosa*.

	Multivariate analysis		
	OR	95% CI	p-value
Variables associated with carriage (cohort I)			
Age	1.29	1.09 - 1.52	0.002
Urinary incontinence	2.56	1.37 - 4.88	0.003
Systematic use of bedpan washers	0.36	0.15 - 0.92	0.033
Variables associated with carriage (cohort II)			
Age	1.30	1.04 - 1.62	0.018
Male	2.55	1.05 - 6.18	0.039
Variables associated with acquisition (cohort II)			
Wheelchair usage	4.56	1.38 - 15.05	0.013
BMI>25	3.71	1.17 - 11.82	0.026

Table 1. Factors associated with *P. aeruginosa* carriage and acquisition from logistic regression analysis.

Population structure of *P. aeruginosa* in LTCFs. We fully sequenced 241 genomes of *P. aeruginosa* collected (i) from residents during cohort I and cohort II (n=208) and (ii) from the environment during cohort II (n=33). The genetic diversity was determined with *in silico* multi-locus sequence typing (MLST). We found a high genetic diversity in the *P. aeruginosa* isolates collected from humans in the different LTCFs with the presence of several high-risk clones. We found 112 different STs among the 241 isolates collected in the 20 LTCFs from which 74 were singletons. Interestingly, the three major high-risk clones (ST111, ST175, and

ST175) were absent. The ST diversity was high according to the SDI calculated for the three LTCFs of the cohort II: Ger1 (SDI=0.94; 95% confidence interval [CI]=0.894-0.976); Ger2 (SDI=0.96; 95% CI=0.941-0.983), and Fra2 (SDI=0.94; 95% CI=0.905-0.980).

When focusing on human isolates, we found 111 different STs with the most represented STs being the high-risk clones ST253 (n=26), ST17 (n=11), ST244 (n=11), ST309 (n=10), and ST395 (n=10). ST244, ST17, and ST309 were retrieved from six, five, and four LTCFs, respectively.

To understand the population structure of *P. aeruginosa* in LTCFs, we built a BioNJ tree from those 241 genomes (Figure 2A). The tree was divided into two major groups and into one to three smaller groups. By building another tree including the reference strain PAO1 and PA14, we found that the two major groups each include one these reference strain (data not shown). We then investigated more closely the distribution of isolates collected in French and German LTCFs by constructing a ML tree based on the SNPs present in the core genome of the isolates (Figure 2B). The trees revealed a high diversity among the *P. aeruginosa* isolates with several clusters of isolates mostly implicating high-risk clones. For instance, ST253 and ST309 were found in the LTCF Fra2. The ST253 predominated (representing 15 out of 67 human isolates) in this LTCF while ST309 was represented by four human isolates, and by three isolates collected from the environment in this LTCF. Hence, one ST309 isolate was isolated from a U-bend while two ST309 isolates were found in drinking water of the LTCF Fra2 (Figure 2B). The ST17 predominated in the LTCF Fra17 (6/9 isolates). We mostly retrieved distinct clones within the two LTCFs located in Tübingen, except for ST253 which also predominated in the LTCF Ger2 with six isolates collected from human samples (n=3) clustering with three isolates from U-bends of sinks. In this same LTCF Ger2, five ST260 isolates collected from human samples (n=3) and U-bends of sinks (n=2) also clustered. In Ger1, the ST27 was found in four U-bend samples.

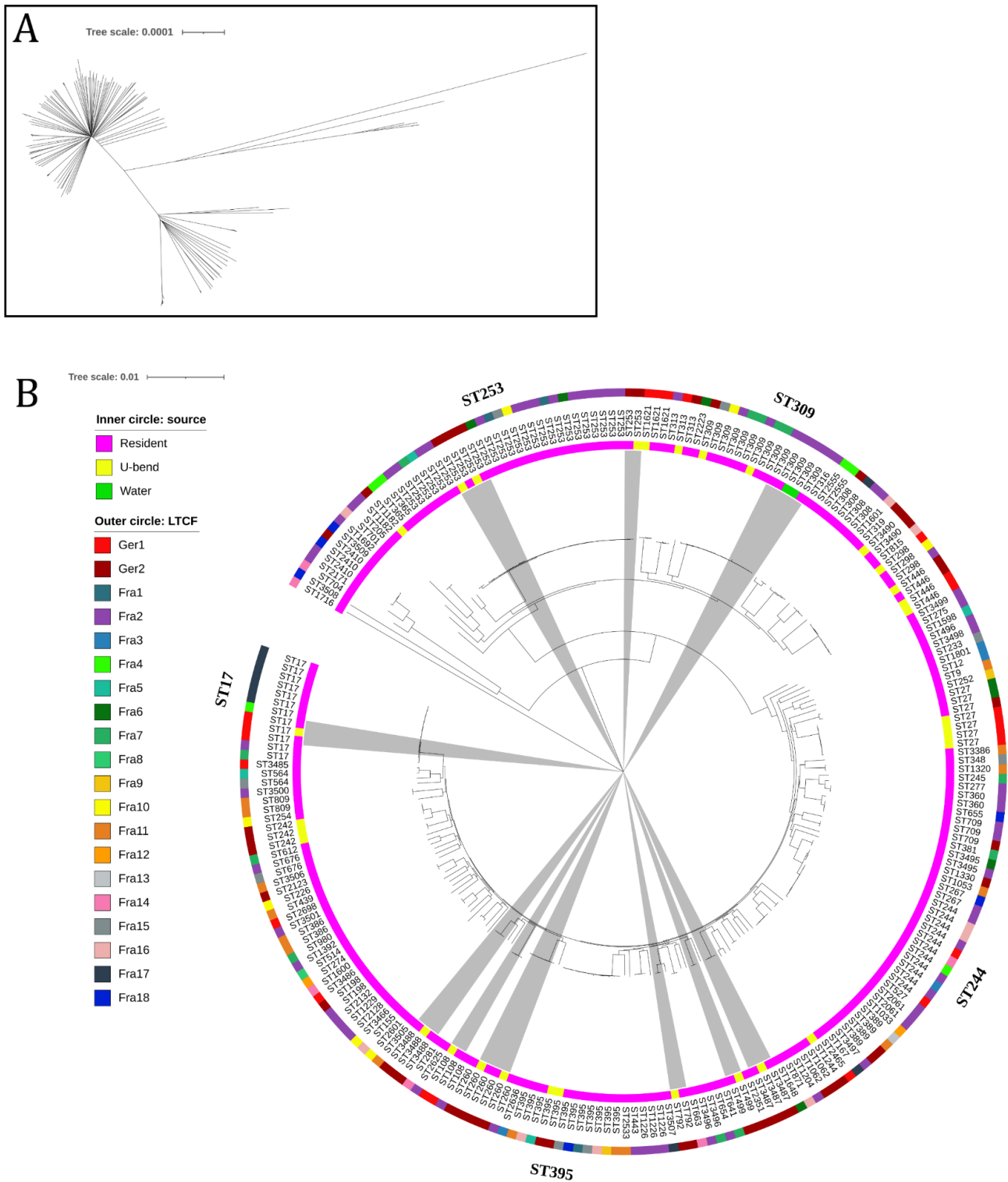


Figure 2. Phylogenetic analysis of the 241 *P. aeruginosa* isolates collected from human feces and environment in the 20 LTCFs. A. BioNJ tree based on the core genome. B. Maximum likelihood tree based on SNPs present in the core genome. LTCF, long-term care facility. Sources (resident; U-bend; water), country of isolation (Ger, Germany; Fra, France), and STs are indicated for each isolate. The grey sectors indicate clusters of isolates gathering isolates retrieved from human and environmental sources. The location of major STs is indicated.

Antibiotic resistance profile and resistance determinants. The vast majority of our isolates were susceptible to the eight antibiotics tested. Overall, we found that 33 isolates (13.7%) had a phenotypic resistance to at least one antibiotic (Table S5). Twelve isolates (5.0%) were resistant to meropenem and/or imipenem. Among the 13 isolates resistant to ciprofloxacin, two were co-resistant to carbapenems. Using ResFinder, we found that acquired resistance genes were rare, with no genes conferring resistance to antipseudomonal agents.

DISCUSSION

In this study, we found a high prevalence of *P. aeruginosa* carriage in residents of LTCFs, associated with age, urinary incontinence, and male gender (Figure 1 and Table 1). Residents were recruited in 20 different LTCFs located in two European countries to limit the influence of factors intrinsic to one specific facility (*e.g.* local catering, kitchen practices, dietary habits, or environmental contamination in a specific area).

It was unexpected to find a prevalence of *P. aeruginosa* intestinal carriage of 46.9% in cohort I and 34.2% in cohort II. Moreover, 28.6% of the residents in cohort II became carriers during the 32-week study period. Overall, 51.6% of the residents enrolled in this study were tested positive for *P. aeruginosa* intestinal carriage at a given time during the study.

Although *P. aeruginosa* carriage and acquisition have been frequently measured in hospitalized patients, data in the general population are missing. A study on carriage and acquisition in ICUs conducted on 3009 patients found an overall incidence of 15.7 cases per 100 patients [7]; Only 8.7% of the patients were carriers, which is considerably lower than the carriage rate found in this study. However, 57.8% of the patients became positive with *P. aeruginosa* after 14 days of hospitalization in ICU, meaning that the acquisition rate was about twice that observed in LTCF. Another study found a prevalence of carriage of 17% at admission in ICU and identified age as a risk factor for carriage at admission [8] which is in line with our findings. Indeed, we

identified age as a factor associated with *P. aeruginosa* carriage in both cohorts I and II (Table 1). These results are also in accordance with studies reporting that age is associated with a higher incidence of bacteremia caused by *P. aeruginosa* [4,6]. Moreover, we found that male gender was associated with intestinal carriage in cohort II. Parkins *et al.* had previously found that males were at higher risk for *P. aeruginosa* BSIs [4]. Overall, these findings indicate the colonization of the gut microbiota by *P. aeruginosa* is facilitated with age. Interestingly, antibiotic consumption was not related to *P. aeruginosa* intestinal carriage in our study. Although the positive correlation between antibiotic consumption and the carriage of antibiotic-resistant *P. aeruginosa* is established, the impact of antibiotic consumption on colonization by *P. aeruginosa* with a wild-type susceptibility profile remains unexplored.

The cgMLST analysis of our entire *P. aeruginosa* collection (Figure 2A) showed that the population structure was similar to that of the whole species described in a previous study where a tree built from 1311 genomes was divided in five groups [17]. This similarity demonstrates the high genetic diversity of our collection, represented mostly by distinct clones and in which only several high-risk clones were overrepresented (Figure 2B). The phylogenetic analysis also revealed that several isolates collected from drinking water points and U-bends clustered with human isolates (Figure 2B). Although it is impossible to determine the direction of contamination between residents and their environment, we cannot discard resident contamination from water sources. Hence, two ST309 isolates were retrieved from drinking water and were clonally related to three isolates gathered from residents (Figure 2B). ST309 is a high-risk clone which frequently contaminates water [31,32]. Since our sampling method limits the contamination with bacteria originating from patients or the environment of care units, our finding suggests that contaminated water is a source of *P. aeruginosa* for residents. Overall, we found that the *P. aeruginosa* population carried by the residents of LTCFs was mainly polyclonal.

Multiple factors could be responsible for a higher prevalence of carriage among the elderly and overweight individuals. The intake of antacid drugs, more frequent in the elderly, has been already linked to the acquisition of Enterobacteriales producing extended-spectrum β -lactamase [33] and could facilitate the oral uptake of *P. aeruginosa* prior to its implantation in the gut microbiota.

Metagenomic studies have shown that gut microbiota changes with aging and obesity [34]. Hence, ageing is associated with the modification of the ratio between certain genera and obesity is frequently associated with dysbiosis and chronic inflammation [35,36]. These changes could favor the implantation of *P. aeruginosa* in the gut microbiota of the residents. A previous study identified that age was associated with higher prevalence of *Clostridioides difficile* in patients at hospital admission [37]. The senescence of the gut microbiota and the immune system linked with age along with the obesity-induced inflammation could thus modify the balance between the different species of the gut microbiota [38], facilitating the implantation of pathogens such as *P. aeruginosa*.

The great majority of the human isolates were susceptible to the antipseudomonal agents tested, indicating the limited contribution of these isolates to the spread of antimicrobial resistance genes within the community. However, in hospitalized patients under antibiotic pressure, *P. aeruginosa* can rapidly become multi-drug resistant triggering its many intrinsic resistance mechanisms after chromosomal mutations [39].

The main limitation of our study is that residents of LTCFs do not fully represent the elder populations in the community. Indeed, it has been shown that residents of these institutions could have a gut microbiota that is more sensitive to changes than elderly people living at home. A worse health status and a less diversified diet in institutions could be responsible for this sensitivity [40]. Further studies should determine the prevalence of carriage in different age

groups of the general population and correlate the results with metagenomic data to identify characteristics of the microbiota associated with *P. aeruginosa* implantation.

To conclude, we found an unexpected high prevalence (51.6%) of *P. aeruginosa* intestinal carriage that was associated, among other factors, with increasing age and obesity. Despite the spread of several high-risk clones, the population of *P. aeruginosa* colonizing the elderly was mainly polyclonal, indicating independent acquisition by the residents.

Fundings

MODERN, CELIA, R'EHPAD.

Acknowledgements.

We would like to thank Cécile Humbert and Marion Broussier for their help on microbiological analysis in Besançon, and Stefanie Bunk, Elisabeth Stoll, Petra Engels and Steffen Ganß from Tübingen for the collection of samples and data acquisition. We would like to thank Jeanne Celotto from the LTCF of Besançon for her help. The authors would furthermore like to pronounce their gratitude to the staff of all LTCFs in France and Germany for their participation and fruitful cooperation.

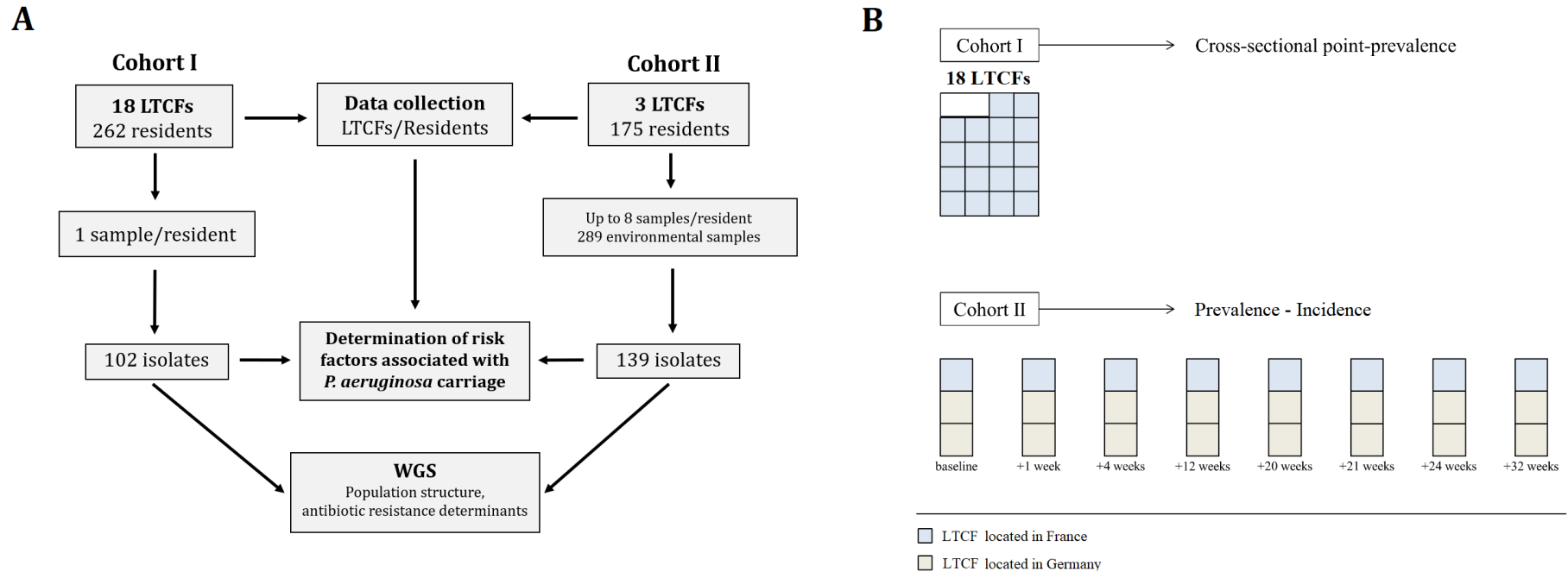
References

- [1] Rutherford V, Yom K, Ozer EA, Pura O, Hughes A, Murphy KR, et al. Environmental reservoirs for *exoS+* and *exoU+* strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep* 2018;10:485–92. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12653>.
- [2] Quick J, Cumley N, Wearn CM, Niebel M, Constantinidou C, Thomas CM, et al. Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. *BMJ Open* 2014;4. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006278>.
- [3] Heltshe SL, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Khan U, Baines A, Ramsey BW, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients with G551D-CFTR treated with ivacaftor. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2015;60:703–12. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu944>.
- [4] Parkins MD, Gregson DB, Pitout JDD, Ross T, Laupland KB. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Infection* 2010;38:25–32. <https://doi.org/10.1007/s15010-009-9145-9>.
- [5] McCarthy KL, Paterson DL. Long-term mortality following *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *J Hosp Infect* 2017;95:292–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.11.014>.
- [6] Al-Hasan MN, Wilson JW, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a population-based study. *Am J Med* 2008;121:702–8. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.03.029>.
- [7] Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, et al. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med* 2001;27:1263–8. <https://doi.org/10.1007/s001340100979>.
- [8] Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, de la Salmonière P, Scanvic-Hameg A, Lucet JC, et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 2003;53:274–82. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1370>.
- [9] Rogues A-M, Boulestreau H, Lashéras A, Boyer A, Gruson D, Merle C, et al. Contribution of tap water to patient colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit. *J Hosp Infect* 2007;67:72–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.06.019>.
- [10] Cholley P, Gbaguidi-Haore H, Bertrand X, Thouverez M, Plésiat P, Hocquet D, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *J Hosp Infect* 2010;76:316–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.06.007>.
- [11] Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 2005;33:S41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2005.03.006>.
- [12] Lee C, Klockgether J, Fischer S, Trcek J, Tümmler B, Römling U. Why? – Successful *Pseudomonas aeruginosa* clones with a focus on clone C. *FEMS Microbiol Rev* 2020;44:740–62. <https://doi.org/10.1093/femsre/uaa029>.
- [13] Kerckhoffs APM, Ben-Amor K, Samsom M, van der Rest ME, de Vogel J, Knol J, et al. Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome. *J Med Microbiol* 2011;60:236–45. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.022848-0>.
- [14] Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 2015;21–22:41–59. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>.

- [15] Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:736–55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>.
- [16] Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev* 2019;32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>.
- [17] Freschi L, Vincent AT, Jeukens J, Emond-Rheault J-G, Kukavica-Ibrulj I, Dupont M-J, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. *Genome Biol Evol* 2019;11:109–20. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy259>.
- [18] Broussier M, Gbaguidi-Haoré H, Rachidi-Berjamy F, Bertrand X, Slekovec C. Prevalence, genetic diversity of and factors associated with ESBL-producing Enterobacterales carriage in residents of French nursing homes. *J Hosp Infect* 2020;104:469–75. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.12.008>.
- [19] 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;19:455–77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- [20] Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 2012;50:1355–61. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>.
- [21] Ozer EA, Allen JP, Hauser AR. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics* 2014;15:737. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-737>.
- [22] Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 2016;44:W16-21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>.
- [23] Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25:2078–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- [24] McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The genome analysis toolkit: a mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010;20:1297–303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>.
- [25] Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 2006;23:254–67. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>.
- [26] Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 2014;30:1312–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
- [27] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 2019;47:W256–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
- [28] EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. *Eur Comm Antimicrob Susceptibility Test* 2021.
- [29] 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. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
- [30] Ducarmon QR, Terveer EM, Nooij S, Bloem MN, Vendrik KEW, Caljouw MAA, et al. Microbiota-associated risk factors for asymptomatic gut colonisation with multi-drug-resistant organisms in a Dutch nursing home. *Genome Med* 2021;13:54. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00869-z>.

- [31] Abdouchakour F, Dupont C, Grau D, Aujoulat F, Mournetas P, Marchandin H, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. Clonal Selection Leads to Successive Waves of Contamination of Water in Dental Care Units. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:7509–24. <https://doi.org/10.1128/AEM.01279-15>.
- [32] Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa LF, Isselo D, Méndez JL, Rodriguez C, et al. Fingerprint Analysis and Identification of Strains ST309 as a Potential High Risk Clone in a *Pseudomonas aeruginosa* Population Isolated from Children with Bacteremia in Mexico City. *Front Microbiol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00313>.
- [33] Hagel S, Makarewicz O, Hartung A, Weiß D, Stein C, Brandt C, et al. ESBL colonization and acquisition in a hospital population: The molecular epidemiology and transmission of resistance genes. *PLoS ONE* 2019;14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208505>.
- [34] Gupta VK, Paul S, Dutta C. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Front Microbiol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162>.
- [35] Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes* 2018;9:308–25. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1465157>.
- [36] Badal VD, Vaccariello ED, Murray ER, Yu KE, Knight R, Jeste DV, et al. The gut microbiome, aging, and longevity: A systematic review. *Nutrients* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/nu12123759>.
- [37] Meltzer E, Smollan G, Huppert A, Fluss R, Tal I, Gilboa M, et al. Universal screening for *Clostridioides difficile* in a tertiary hospital: risk factors for carriage and clinical disease. *Clin Microbiol Infect* 2019;25:1127–32. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.02.002>.
- [38] Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLOS ONE* 2010;5:e10667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010667>.
- [39] Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34:634–40. <https://doi.org/10.1086/338782>.
- [40] Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012;488:178–84. <https://doi.org/10.1038/nature11319>.

Supplementary data



Supplemental Figure 1. Details about the study design and the sampling. A. Flowchart of the study design. B. Sampling performed during cohort I and cohort II. During cohort I, one stool sample was collected for each resident. During cohort II, stool samples were collected over a 32-weeks period. LTCF: long-term care facility; WGS: whole genome sequencing.

Table S1, S2, S3, S4: Characteristics of LTCFs and of residents according to their carrier status. Ces tableaux sont présentés dans la partie 7.3 de la partie 'Matériel et méthodes' du manuscrit de thèse.

Table S5: characteristics of all isolates collected during the study. Disponible ici :

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1tzTmf4gggbBjh50_0xyv49V0kTt8qBSG0NZnEDVd2k/edit?usp=sharing

5. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

5.1 Épidémiologie bactérienne et WGS

5.1.1 Le WGS dans le paysage du typage bactérien

Au cours des dix dernières années, le WGS est devenu la méthode de typage la plus répandue et tend à remplacer les méthodes conventionnelles²⁷⁸. Plusieurs types de données sont accessibles à partir du séquençage de génomes, évitant ainsi de multiplier les méthodes de typage. La diffusion de la résistance peut notamment être comprise grâce à l'identification des déterminants de la résistance et de leurs supports. Les STs, les gènes associés à la virulence bactérienne, l'âge du dernier ancêtre commun, les plasmides contenus par les bactéries sont également identifiables à l'aide du WGS. De nombreuses études ont par ailleurs démontré l'efficacité du WGS pour comprendre les sources et les événements de contaminations dans les épidémies bactériennes^{35-38,40}. Une autre étude a évalué l'impact de la mise en place du WGS dans la gestion des épidémies. Ainsi, grâce au séquençage des isolats de SARM en routine, l'hypothèse de transmission nosocomiale de la majorité des isolats collectés en routine a pu être exclue, alors que sans le WGS, il aurait fallu typer les isolats avec d'autres méthodes moins discriminantes. De plus, les auteurs soulignent que lorsque des événements de transmissions étaient détectés, ils ont mis en place des mesures ciblées afin d'éviter de nouvelles transmissions⁵¹.

Ces nombreux avantages ont permis au WGS de supplanter les méthodes comme la MLVA ou le PFGE. Même s'il paraît logique que ces techniques soient progressivement délaissées au profit du WGS, les études qui les utilisaient doivent toujours être considérées comme pertinentes et les conclusions des études faisant appel à cette technique sont toujours valables. Nous avons par exemple comparé le pouvoir de discrimination du WGS et du PFGE en utilisant une collection de *P. aeruginosa* appartenant au clone ST395²⁷⁹ (Martak *et al.*, JHI, 2020, présenté dans la partie 2.2.1). Dans cette étude, tous les isolats ont été typés par PFGE et leurs génomes ont été séquencés par WGS. Un MST a été construit à partir d'une analyse de cgMLST, mettant ainsi en avant le nombre de gènes du *core genome* différents entre chaque isolat de *P. aeruginosa*. Les résultats ont montré que le PFGE créait des groupes cohérents avec ceux définis par les analyses de cgMLST mais qu'il avait tendance à rapprocher des isolats sans liens épidémiologiques (par exemple, isolés dans des villes différentes). En revanche, le PFGE s'est révélé efficace pour regrouper des souches hypermutatrices et leurs parents. Les hypermutateurs ont un système de réparation des mésappariements de l'ADN défectueux. Ce

système implique les gènes *mutL*, *mutS*, et *uvrD*²⁸⁰. Les souches hypermutatrices de notre étude possédaient des liens épidémiologiques et étaient bien clusterisées par le PFGE alors qu'elles étaient séparées par le WGS (distance cgMLST élevée). Ce résultat met en évidence le besoin de recommandations pour le traitement des données de WGS. Ainsi, sans recherche précise de ces phénotypes hypermutateurs, ces isolats auraient été considérés sans liens, à tort. La standardisation des méthodes d'analyse des données de WGS constitue donc un point essentiel pour son avenir dans la gestion d'épidémie de bactéries pathogènes. Ce point sera abordé plus en détails dans la partie suivante.

Plus globalement, plusieurs études ont relevé de bonnes corrélations entre le PFGE et le WGS pour le typage de *P. aeruginosa*, *E. coli* ou encore *K. pneumoniae*²⁸¹⁻²⁸³. Le PFGE est donc un outil fiable à utiliser préférentiellement pour typer des isolats ayant des liens épidémiologiques (origines géographiques similaires). En revanche, cette technique manque de robustesse, présente une grande variabilité inter-laboratoire et les résultats ne sont pas exportables, il apparaît donc logique qu'elle soit progressivement remplacée, notamment par le WGS, mais également par d'autres méthodes plus robustes, plus rapides et moins laborieuses, comme nous allons le voir ensuite.

5.1.2 Choix du seuil et standardisation des méthodes

En épidémiologie clinique, les analyses phylogénétiques réalisées à partir de données de WGS servent majoritairement à comprendre les voies de transmission des pathogènes. Les métadonnées associées aux isolats bactériens séquencés comme le type de prélèvement (patient, environnement), la date de prélèvement et le lieu de prélèvement permettent de comprendre les événements de transmission. Les analyses phylogénétiques regroupent les isolats bactériens en clusters qui indiquent une transmission ou une origine d'acquisition commune. Les clusters peuvent être créés en comptant le nombre de SNPs ou en comptant le nombre d'allèles de gènes de différence entre les isolats²⁶. Ce regroupement repose donc essentiellement sur le choix d'un seuil (*cut-off*) pour différencier les isolats bactériens.

En PFGE, le regroupement des isolats en pulsotypes est basé sur le coefficient de similitude entre les isolats, standardisant ainsi l'interprétation des résultats²⁰. A l'inverse, l'interprétation des résultats de cgMLST n'est pas standardisée. Pour comparer le WGS et le PFGE, nous avons fixé notre seuil à 20 allèles de différence pour délimiter les clusters. Des études précédentes ont par exemple proposé un seuil à 14 allèles de différence pour *P. aeruginosa*^{26,51}. Cependant, ce seuil n'était pas adapté à nos données car il regroupait des isolats sans lien épidémiologique.

Les *cut-off* doivent donc être étalonnés en considérant les données épidémiologiques. Dans l'étude où nous avons comparé les populations d'Ec-BLSE isolées de l'environnement et de la nourriture (manuscrit publié dans *Clinical Microbiology and Infection*, présenté dans la partie 3.2.1), la structure de la population d'*E. coli* a été analysée par cgMLST. Nous avons ensuite construit un réseau qui liait les sources (environnement ou nourriture) qui contenaient des isolats d'Ec-BLSE dont les génomes présentaient moins de 10 allèles de différence en cgMLST. Pour définir le seuil (10 allèles) en dessous duquel les génomes étaient considérés comme génétiquement liés, nous avons regroupés les isolats d'Ec-BLSE par ville d'isolement, en considérant que les transmissions d'Ec-BLSE entre les villes étaient improbables. Nous avons ensuite construit des réseaux reliant les différentes sources en utilisant des seuils de 10, 15, 20, 30 ou 40 différences dans les gènes du *core genome*. Nous avons ensuite compté le nombre de liens improbables pour chaque valeur de seuil et choisi la valeur de 10 car elle minimisait le nombre de compartiments connectés par erreur (Fig. S1 de l'article présenté en partie 3.2.1). Un seuil fixé à 10 allèles de différence avait déjà été documenté pour des analyses de cgMLST conduite sur des génomes d'*E. coli*²⁶.

Le choix du seuil doit donc considérer (i) les données épidémiologiques liées aux isolats bactériens mais également (ii) l'espèce bactérienne étudiée. Les vitesses d'évolution sont en effet différentes en fonction des espèces bactériennes²⁸⁴. Une étude comparant les vitesses d'évolution de plusieurs espèces bactériennes a montré que les vitesses d'évolution de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *S. aureus* étaient similaires (entre 10^{-7} et 10^{-6} substitutions par site par an) alors que la vitesse d'évolution d'autres espèces comme *Enterococcus faecium* était plus élevée (entre 10^{-6} et 10^{-5} substitutions par site par an)²⁸⁴. D'autres études s'intéressant à l'évolution d'*E. coli* ont calculé que sa vitesse d'évolution était d'environ une mutation par génome par an ($\sim 10^{-7}$ substitutions par site par an)^{285,286}. Le réservoir étudié pourrait également être pris en compte pour définir le seuil. La vitesse d'évolution étant dépendante du temps de génération bactérien, le taux de substitution nucléotidique diffère en fonction du réservoir considéré (eau vs hôte, par exemple)^{287,288}.

Stimson *et al.* ont proposé un modèle dépassant la considération d'un seuil uniquement lié au nombre de SNPs²⁸⁹. Ce modèle de transmission, créé à partir d'une collection de *Mycobacterium tuberculosis*, prend en compte le nombre de SNPs entre les génomes comme dans une approche classique. En plus de ça, les dates de prélèvements sont intégrées au modèle pour prendre en compte la chronologie des cas. Le modèle considère également l'horloge moléculaire de la bactérie et le taux de transmission supposé. Ce modèle considère donc les données épidémiologiques pour établir des liens entre les isolats. Ainsi, des isolats proches

génétiqnement mais ayant été collectés à intervalles longs pourront appartenir à des clusters distincts²⁸⁹. Plus globalement, un consensus autour de la définition des seuils est nécessaire pour rendre les résultats des études comparables et reproductibles.

Comme nous venons de le voir, définir un seuil approprié pour discriminer des isolats bactériens sans lien épidémiologique est délicat, et ce d'autant plus qu'il existe également des biais importants liés aux outils et aux méthodes d'analyses. Des tests récents réalisés au laboratoire (résultats obtenus récemment par des collègues au laboratoire et non présentés dans ce manuscrit) ont par exemple montré les biais d'analyse liés à l'assemblage des données brutes avec l'outil SPAdes²⁴. La collection d'isolats de *P. aeruginosa* que nous avons utilisée pour comparer le PFGE et le WGS²⁷⁹ a servi à comparer les résultats de cgMLST obtenus par deux approches différentes. La première approche consistait à assembler les *reads* à l'aide de SPAdes avant l'analyse de cgMLST via pyMLST (<https://github.com/bvalot/pyMLST>). Dans la seconde approche, les *reads* sont alignés directement via KMA pour être comparés au *core genome*²⁹⁰. Les résultats montrent qu'avec la méthode sans assemblage (KMA), les distances génétiques entre les isolats sont plus faibles qu'avec la méthode avec assemblage, qui introduirait donc des erreurs. SPAdes étant largement utilisé en bioinformatique, il est probable que les seuils définis jusqu'à présent surévaluent les distances génétiques réelles entre les isolats bactériens.

Ce type de résultat montre le besoin de seuils communs pour l'analyse des séquences générées par WGS. En effet, les données de WGS peuvent être traitées par des outils et des pipelines très variables, à l'origine d'une faible reproductibilité entre les études. Une étude a montré que les résultats obtenus par WGS étaient reproductibles lorsque des méthodes similaires étaient utilisées²⁹¹. Il existe donc un besoin évident d'harmoniser les méthodes avant de définir des seuils standardisés.

Cependant, ces problèmes de standardisation ne doivent pas freiner les laboratoires à utiliser le WGS car cette technique est la plus résolutive de toutes les méthodes de typage¹⁷.

5.2 Diffusion des bacilles à Gram négatif

5.2.1 Diffusion dans la communauté

De nombreuses études documentent aujourd'hui la transmission des différents pathogènes humains à l'hôpital dans un grand nombre de pays (*e.g.*, EBLSE). En revanche, pour ces mêmes EBLSE, les données concernant les transmissions interhumaines dans la communauté sont moins abondantes. *E. coli* a été particulièrement étudié ces dernières années tandis que les données sur *K. pneumoniae* sont moins nombreuses. Dans le cadre du WP2 du projet MODERN, pour quantifier la transmission vers les autres membres de leur foyer, nous avons suivi des patients porteurs d'Ec-BLSE ou de Kp-BLSE à leur sortie de l'hôpital²⁹² (Article présenté dans les travaux complémentaires, partie 8.2.2). Les résultats importants de cette étude sont :

- La transmission d'un clone d'EBLSE s'est produite pour 20% (19/94) des participants,
- La majorité des transmissions ont eu lieu dans les deux premiers mois de suivi,
- Le taux d'acquisition d'EBLSE était plus important que le taux de transmission,
- Le taux de transmission de Kp-BLSE était plus élevé que celui d'Ec-BLSE,
- L'assistance des membres du foyer pour aider le cas index à faire ses besoins (urinaires et fécaux) était le facteur de risque de transmission d'EBLSE le plus important.

Nous avons en effet relevé des événements de transmissions intrafamiliaux pour 20% des membres de foyers associés à un cas index. De plus, 14 membres de foyers étaient porteurs d'un clone similaire à celui du cas index dès le début de l'étude, indiquant une transmission avant le début de l'étude. Ces données sont cohérentes avec le taux de transmission légèrement moins élevé de 12% qui a été rapporté dans une étude récente¹³⁸.

Les entérobactéries colonisant le tractus intestinal peuvent se transmettre facilement par voie oro-fécale. Dans les établissements de soin, l'hygiène des mains évite la transmission des pathogènes²⁹³. Le taux de transmission élevé retrouvé dans cette étude suggère que des précautions d'hygiène élémentaire, comme le lavage des mains, devraient être appliquées par les membres de la famille aidant les personnes dépendantes.

Parmi les STs les plus fréquemment isolés, le ST131 représentait 46,0% des isolats d'Ec-BLSE. D'autres clones comme ST38 (6,9%), ST1193 (4,0%) et le ST10 (3,6%) ont été identifiés. Le ST131 est le clone prédominant au niveau mondial, il n'est pas étonnant qu'il soit majoritaire dans notre étude. De plus, la diffusion du ST131 dans la communauté avait déjà été documentée^{135,136}. On notera la présence du ST10, clone également fréquemment retrouvé dans la nourriture ou les eaux usées, dont nous discuterons plus loin.

Que ce soit pour *E. coli* ou pour *K. pneumoniae*, le gène *bla*_{CTX-M-15} prédominait parmi les EBLSE colonisant les cas index et les membres de leurs familles. *E. coli* ST131 était majoritairement associé au gène *bla*_{CTX-M-15}, comme précédemment décrit²⁹⁴. Dans cette publication, une des limites principales est l'absence de caractérisation des plasmides dont les groupes d'incompatibilité auraient pu être identifiés, avec PlasmidFinder par exemple²⁹⁵. Actuellement, des membres du projet MODERN (à Utrecht aux Pays-Bas et à Tübingen en Allemagne) caractérisent précisément les plasmides des isolats de cette étude avec une technique de séquençage de *reads* longs. Cette méthode permettra de reconstituer les séquences plasmidiques complètes, de localiser les gènes *bla*_{BLSE} (intégrés au chromosome ou plasmidiques) et de caractériser les éléments génétiques mobiles portant ces gènes et d'identifier leurs groupes d'incompatibilité. Ces données documenteront plus précisément les événements de transmissions intrafamiliaux, ce qui n'a pour le moment, à ma connaissance, jamais été réalisé.

Comme pour les EBLSE, la transmission et l'origine de *P. aeruginosa* ont été largement décrites dans les infections hospitalières. Différentes études ont montré que l'origine des infections à *P. aeruginosa* pouvaient avoir une origine endogène, être liées à la transmission croisée, ou encore liées à l'environnement et notamment l'environnement hydrique du patient^{40,217,268,296}. De plus, il a été montré que l'âge était un facteur associé aux bactériémies à *P. aeruginosa*^{16,275}. Ce constat nous a poussé à évaluer la prévalence de portage intestinal et d'acquisition de *P. aeruginosa* chez les personnes âgées. La prévalence de portage a été déterminée chez des résidents d'établissements de long séjour. Notre étude a révélé un taux de portage élevé chez les personnes âgées, avec 51,6% des résidents ayant eu au moins un prélèvement positif à *P. aeruginosa* (Manuscrit présenté en partie 4.2.1). Le taux de portage observé ici contraste avec une étude retrouvant 8,7% de patients porteurs digestifs de *P. aeruginosa* à leur admission en unité de soins intensifs²¹⁷. Dans une autre étude, le taux de portage de patients admis en unité de soins intensifs était de 17% et l'âge était un facteur de risque associé au portage intestinal à l'admission²⁷³. Nos travaux ont montré que l'âge était un facteur associé au portage digestif de *P. aeruginosa*. La structure de la population était majoritairement non clonale avec beaucoup de STs différents. Globalement, ces résultats suggèrent que le portage digestif de *P. aeruginosa* augmente avec l'âge et que les acquisitions individuelles de *P. aeruginosa* par les personnes âgées pourraient favoriser les bactériémies d'origine endogène. L'association entre l'âge et le portage de pathogènes nécessite d'être confirmée par d'autres études sur des populations plus jeunes. Néanmoins, il faut faire preuve

de vigilance à l'égard des populations âgées, nous pouvons imaginer que des politiques de dépistage systématique des patients âgés lors de l'admission à l'hôpital pourraient être mises en place afin d'identifier les éventuels patients porteurs de pathogènes opportunistes comme *P. aeruginosa* pouvant compliquer la prise en charge du patient.

Nous pourrions également déterminer l'implication de l'âge dans le portage d'autres pathogènes opportunistes. Il a par exemple été montré que chez des patients prélevés à leur admission à l'hôpital, l'âge était un facteur associé avec une prévalence de portage plus élevée de *Clostridioides difficile*²⁹⁷.

Si on s'intéresse plus particulièrement à l'association entre l'âge et la prévalence de portage digestif de *P. aeruginosa* élevée, plusieurs facteurs pourraient faciliter le portage de pathogènes chez les personnes âgées. Par exemple, la prise d'inhibiteurs de pompes à protons (IPP) est plus fréquente chez les personnes âgées²⁹⁸. L'association entre colonisation par EBLSE et IPP a par exemple été précédemment décrite²⁹⁹. Il est possible que ces médicaments favorisent le passage de *P. aeruginosa* dans l'intestin et donc son implantation dans le microbiote. Les IPP ont également été associés à un risque plus élevé d'infections à *Clostridium difficile*³⁰⁰. L'immunosénescence de l'hôte et les changements de composition du microbiote liés à l'âge pourraient favoriser le portage digestif de *P. aeruginosa* observé dans notre étude. Des études de métagénomique sur l'évolution du microbiote en fonction de l'âge, de la nutrition, de la situation géographique ou encore des pathologies ont déjà été menées³⁰¹. Il a déjà été montré que la composition du microbiote évolue avec l'âge, on observe notamment une variation interindividuelle plus grande et une diminution de la diversité microbienne³⁰². Ces changements sont principalement liés à la modification de l'alimentation et à la malnutrition, à la dégradation de l'état de santé général, au mode de vie (communauté, établissement de long séjour, hôpital) et à l'exposition aux médicaments et notamment aux antibiotiques³⁰³⁻³⁰⁵. Le changement majoritaire observé dans le microbiote des personnes âgées est la diminution du rapport Firmicutes/Bacteroidetes³⁰⁶ (Figure 21). En plus de la diminution de la représentation du phylum des Firmicutes, le genre *Bifidobacterium*, rapporté comme ayant des propriétés bénéfiques, est également moins retrouvé chez les personnes âgées³⁰⁷. Ces modifications pourraient ainsi faciliter l'implantation de *P. aeruginosa* dans le microbiote des personnes âgées. L'implantation de certains autres genres bactériens comme les streptocoques et les entérocoques, ou de la famille des entérobactéries a par ailleurs déjà été documentée³⁰⁷.

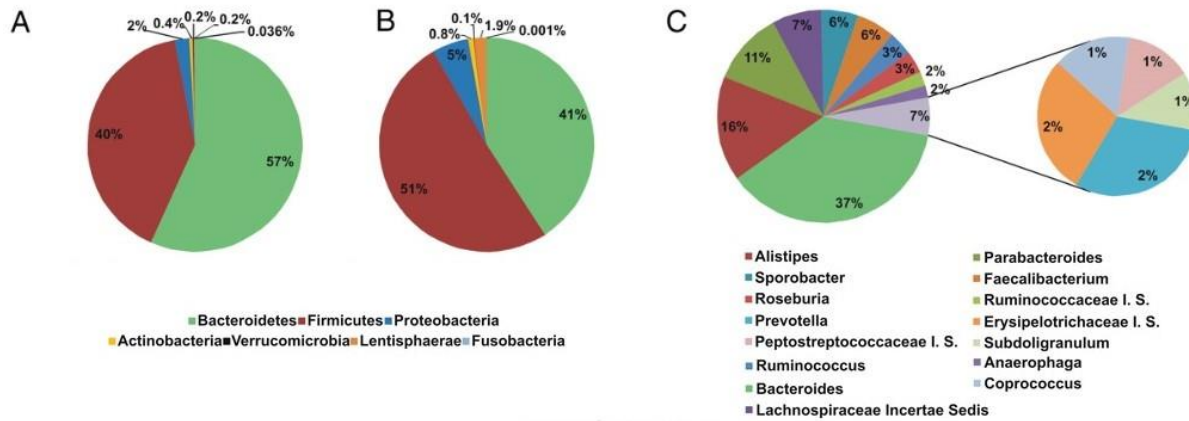


Figure 21. Composition globale du microbiote. Distribution des phylum bactériens dans (A) 187 échantillons fécaux provenant de sujets âgés de 65 ans ou plus, (B) 9 jeunes adultes témoins en bonne santé. (C) Distribution des genres bactériens dans les 187 échantillons fécaux provenant de sujets âgés (le petit diagramme de droite a été inséré pour plus de clarté). Seuls les groupes taxonomiques majeurs sont indiqués, représentant 95% des *reads* assignés au niveau du genre. D'après Claesson *et al.*³⁰⁸.

Une étude a également montré que le mode de vie influençait la composition du microbiote et que les personnes âgées vivant dans des établissements de long séjour possédaient un microbiote moins diversifié et une plus grande variabilité interindividuelle que les personnes âgées vivant en communauté. Ces différences sont probablement associées à l'état de santé général moins bon chez les personnes vivant en établissements de long séjour³⁰³.

Nos données montraient également qu'un indice de masse corporel supérieur à 25 était associé à l'acquisition de *P. aeruginosa*. L'association entre dysbiose et obésité a déjà été observée³⁰⁹. En effet, il a déjà été rapporté que la diversité du microbiote pouvait être réduite chez les individus obèses et que cette perte de diversité est corrélée à une inflammation chronique de bas grade dans certains tissus^{309,310}. La baisse de la diversité dans le microbiote des individus obèses pourrait faciliter l'implantation de *P. aeruginosa*.

Le lien entre l'âge de l'hôte et le portage intestinal de *P. aeruginosa* devra être exploré par un suivi de la population générale, incluant des individus de toutes les tranches d'âge. La détermination conjointe de la composition du microbiote par une approche de métagénomique complète permettrait d'identifier les types de microbiote (enrichis ou appauvris en divers espèces bactériennes) favorisant l'implantation de pathogènes comme *P. aeruginosa*.

Les technologies de séquençage évoluant très rapidement, il est possible d'imaginer que, dans le futur, l'identification et la caractérisation de toutes les espèces du microbiote permettra de comprendre les interactions entre les espèces et de définir précisément les événements conduisant à une dysbiose et à l'implantation de certains pathogènes.

5.2.2 La diffusion des BLSE dans une approche *One Health*

Le concept *One Health* est une approche globale et multidisciplinaire du monde de la santé, considérant que la santé humaine, la santé animale et la qualité de l'environnement sont liées. Les études présentées dans la partie 3.2 avaient pour objectif (i) de déterminer dans quelle mesure la nourriture constituait une voie d'acquisition d'EBLSE pour les humains et (ii) de déterminer si des souches d'*E. coli* d'origine humaine contaminaient des environnements peu anthropisés. Pour répondre à ces questions, nous avons caractérisé les populations d'*E. coli* totaux, d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE isolées d'échantillons de nourriture et d'environnements plus ou moins anthropisés.

Dans le manuscrit présenté en partie 3.2.2, les isolats de *E. coli* collectés dans des zones humides ont été caractérisés par phylogroupage, par MLST et en identifiant les gènes associés à la résistance aux C3G pour voir si des souches d'origine humaine contaminaient ces milieux peu anthropisés³¹¹. Parmi les isolats de *E. coli* cultivés sur géloses non sélectives, les phylogroupes B1 et B2 prédominaient, tandis que le phylogroupe A prédominait dans les isolats résistants aux C3G. Le gène *bla*_{CTX-M-15}, gène *bla*_{BLSE} le plus fréquemment associé aux EBLSE responsables d'infections humaines¹⁰⁰, était majoritaire (43%) parmi les isolats résistants aux C3G. Les isolats appartenant aux phylogroupes B2 et D ont ensuite été typés par MLST, conduisant à l'identification de STs fréquemment responsables d'infections chez l'homme (ST131, ST38, ST69, ST405, ST10)^{95,312}. La présence du phylogroupe B2, du gène *bla*_{CTX-M-15} et de certains STs associés aux infections chez l'Homme suggèrent que les zones humides, zones peu anthropisées, sont polluées par les bactéries d'origine fécale. Les rejets de STEU constituent la source majeure de pollution des rivières par des bactéries pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques¹⁴⁹. Ces résultats montrent que les isolats d'*E. coli* humains peuvent polluer des zones éloignées des activités humaines. Cependant, cette étude ne permet pas de savoir si cette contamination résulte d'un flux continu atteignant les zones humides ou de l'adaptation d'isolats d'origine humaine à leur environnement. La limite principale de cette étude est que les résultats obtenus permettent uniquement de supposer l'origine humaine des isolats, et non de la confirmer. Des méthodes de typage supplémentaires (typage des plasmides) ou plus résolutive (WGS) auraient permis une meilleure caractérisation des isolats.

Il est néanmoins intéressant de constater que des isolats d'*E. coli* d'origine humaine puissent atteindre et survivre dans des zones humides. Les degrés de connectivité entre les zones humides et les rivières sont variables, de plus, les zones humides peuvent être alimentées par

des eaux de nappes. Ces zones humides présentent des températures et des paramètres physico-chimiques qui peuvent différer de ceux des rivières³¹³. Les caractéristiques des zones humides de l'étude sont décrites dans l'article publié dans *FEMS Microbiology Ecology* (Henriot C.P, Martak D *et al.* (2019) ; présenté dans la partie 8.3 des travaux complémentaires).

Les prochaines études devront se focaliser sur la résilience de ce type d'environnement, afin de voir si l'arrêt de la pollution entraîne une diminution de la concentration d'*E. coli* d'origine humaine, permettant ainsi de voir si la contamination des zones peu anthropisées comme les zones humides résulte d'un flux continu ou de l'adaptation d'une sous-population d'*E. coli* à son environnement. A titre d'exemple, une étude s'intéressant à la résilience d'un étang après des épisodes d'inondations montre que deux semaines sont nécessaires à la reconstitution des communautés microbiennes³¹⁴. Etant donné qu'il est impossible de stopper les effluents de STEU, la résilience des environnements après une pollution par ces effluents ne pourrait être caractérisée que via des études de modélisation.

L'étude des milieux peu anthropisés comme les zones humides permet de quantifier l'impact des activités humaines sur des milieux censés être préservés de ces activités. Des études d'écotoxicologie quantifiant d'autres marqueurs de contamination humaine plus larges comme les concentrations en antibiotiques et autres molécules médicamenteuses, en métaux lourds, en médicaments ou en biocides fourniraient un aperçu du niveau de contamination des environnements peu anthropisés et de l'impact de ces contaminants sur la faune et la flore.

L'étude dont le manuscrit est présenté en partie 3.2.1 constitue un des volets du projet MODERN. L'objectif de cette étude était de déterminer dans quelle mesure la nourriture constituait une voie d'acquisition des EBLSE pour les humains. Pour répondre à cette question, nous avons caractérisé les populations d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE collectés dans la nourriture et dans les eaux usées. Des échantillons de viandes, de légumes, d'eaux usées ont été collectés dans cinq villes européennes. Nous avons considéré que les échantillons d'eaux usées (collectés en entrée et en sortie de la STEU) contenaient les populations bactériennes colonisant les humains^{155,160}. Les génomes des isolats d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE ont été séquencés par WGS et les populations issues des deux réservoirs (nourriture et eaux usées) ont été comparées. Le résultat principal de cette étude est que les populations d'EBLSE collectées dans les eaux usées et la nourriture sont génétiquement différentes et qu'elles possèdent des gènes *bla*_{BLSE} généralement différents. Une étude récente comparant les populations d'*E. coli* humains et collectés dans les eaux usées a montré que les ST131 et ST38 prédominaient à la fois dans les isolats fécaux, de bactériémies, et les eaux usées. Le ST10 était également le 3^{ème} ST le plus

représenté dans les échantillons fécaux et dans les eaux usées⁴⁸. Une autre étude se focalisant sur les gènes de résistance aux C3G chez *E. coli* montrait, via une analyse en composante principale, une superposition du réservoir humain et des eaux usées⁴⁹. L'utilisation des eaux usées comme proxy de la contamination humaine est donc pertinente, du moins pour *E. coli*, pour qui les résultats sont nombreux. Ceci reste donc à confirmer pour *K. pneumoniae*.

Nos résultats montrent que les souches d'Ec-BLSE des eaux usées ont les caractéristiques de souches souvent documentées dans les infections humaines. En effet, les trois STs majoritaires (ST131, ST38, ST10) et les gènes *bla*_{BLSE} prédominants (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27}) sont identiques^{124,294,315}. Similairement, nous avons identifié des clones épidémiques de Kp-BLSE dans l'environnement (ST37, ST307).

Le niveau de contamination de la nourriture était globalement similaire à celui observé ailleurs, avec une faible contamination des légumes et un taux de contamination plus élevé du poulet^{46,48,202-204}. Bien que les Kp-BLSE ne contaminent que rarement la nourriture, comme observé dans d'autres études européennes^{316,317}, nous avons retrouvé des clones épidémiques dans des échantillons de poulet (ST15 et ST147). Les isolats d'Ec-BLSE collectés à partir d'échantillons de nourriture appartenaient majoritairement au ST10, au ST155 et au ST69 tandis que les gènes de résistance majoritaires étaient *bla*_{CTX-M-1} et *bla*_{SHV-12}. Les isolats de Kp-BLSE issus de la nourriture ou des eaux usées contenaient majoritairement le gène *bla*_{CTX-M-15}, comme documenté dans des études précédentes^{47,160}.

Les analyses de cgMLST de notre étude viennent confirmer les données de MLST et de résistance. En effet, seulement six des 254 Ec-BLSE provenant des deux réservoirs étaient potentiellement liés (Figures 1 et 2 du manuscrit présenté dans la partie 3.2.1).

Globalement, nos résultats suggèrent que les transferts de souches d'Ec-BLSE ou de Kp-BLSE de la nourriture vers les humains sont rares, supportant l'idée que le clone ST131 de *E. coli* et les autres souches du phylogroupe B2 sont majoritairement transmises d'humain à humain^{47-49,292}. Cependant, un doute aurait pu subsister pour le clone ST10 de *E. coli*, distribué également entre les deux sources (nourriture et eaux usées). Mais les isolats étaient génétiquement différents et portaient majoritairement des gènes *bla*_{BLSE} différents. Le ST10 a déjà été isolé dans l'environnement, la nourriture et chez les humains^{49,172}. Dans une étude récente, les génomes de 22 isolats du ST10 collectés à partir de sources humaines, environnementales et animales sur différents continents (Amérique du Nord, Asie, Europe, Afrique) ont été comparés. L'analyse cgMLST montre que la diversité génétique est élevée parmi les souches du ST10 et que celles-ci sont séparées dans différents clusters¹⁹⁶. Ces résultats suggèrent que des sous-lignées existent au sein de ce ST. Néanmoins, les résultats exposés dans

la publication de Nguyen *et al.* ne comportent que 22 génomes du ST10¹⁹⁶. Il serait intéressant de comparer les génomes d'un nombre important de souches du ST10 collectées à partir des différents réservoirs afin d'estimer leur distribution sur un arbre phylogénétique et d'identifier les gènes *bla*_{BLSE} portés en fonction de la source. Un enrichissement protéique et fonctionnel pourrait être réalisé à partir des génomes pour voir si certaines protéines ou fonctions sont enrichies en fonction de la source de la souche, comme décrit précédemment dans l'analyse d'une épidémie à *P. aeruginosa*³⁸.

Notre étude montre également que les gènes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-32} et *bla*_{CTX-M-55}, qui dominaient dans l'environnement, étaient souvent prédits comme intégrés au chromosome. En revanche, le gène *bla*_{CTX-M-1} était plus souvent prédit comme plasmidique, facilitant ainsi les échanges par THG³¹⁸. L'intégration au chromosome de *bla*_{CTX-M-15}, déjà décrite^{319,320}, limiterait la propagation de ce gène par THG via des plasmides (mais qui serait toujours possible s'il est localisé sur un ICE). Cependant, ces résultats sont à nuancer car la localisation des gènes a été prédite avec *mlplasmids*, un outil pouvant commettre des erreurs lors de la prédiction de la localisation du gène³²¹. Ces résultats nécessitent d'être confirmés grâce à des techniques de séquençage produisant des *reads* longs (Oxford Nanopore). Ces données sont déjà en cours d'exploitation par des partenaires du consortium MODERN (dont le projet est décrit partie 7.1.1). Ce projet prévoit en effet de comparer les génomes des isolats d'EBLSE d'origine humaine en plus de ceux collectés dans les eaux usées ou dans la nourriture afin de mieux définir les voies de transmission des EBLSE (interhumaines) et l'implication de la nourriture dans la contamination humaine. De plus, les séquences de plasmides des isolats pour lesquels une transmission est soupçonnée seront obtenues grâce au séquençage de *reads* longs afin de caractériser les plasmides et l'environnement génétique des gènes *bla*_{BLSE}. L'ensemble de ces données démêlera les routes de diffusion des clones produisant une BLSE mais également celles des gènes *bla*_{BLSE} via les éléments génétiques mobiles sur lesquels ils sont situés. Des résultats préliminaires sont présentés Figure 22.

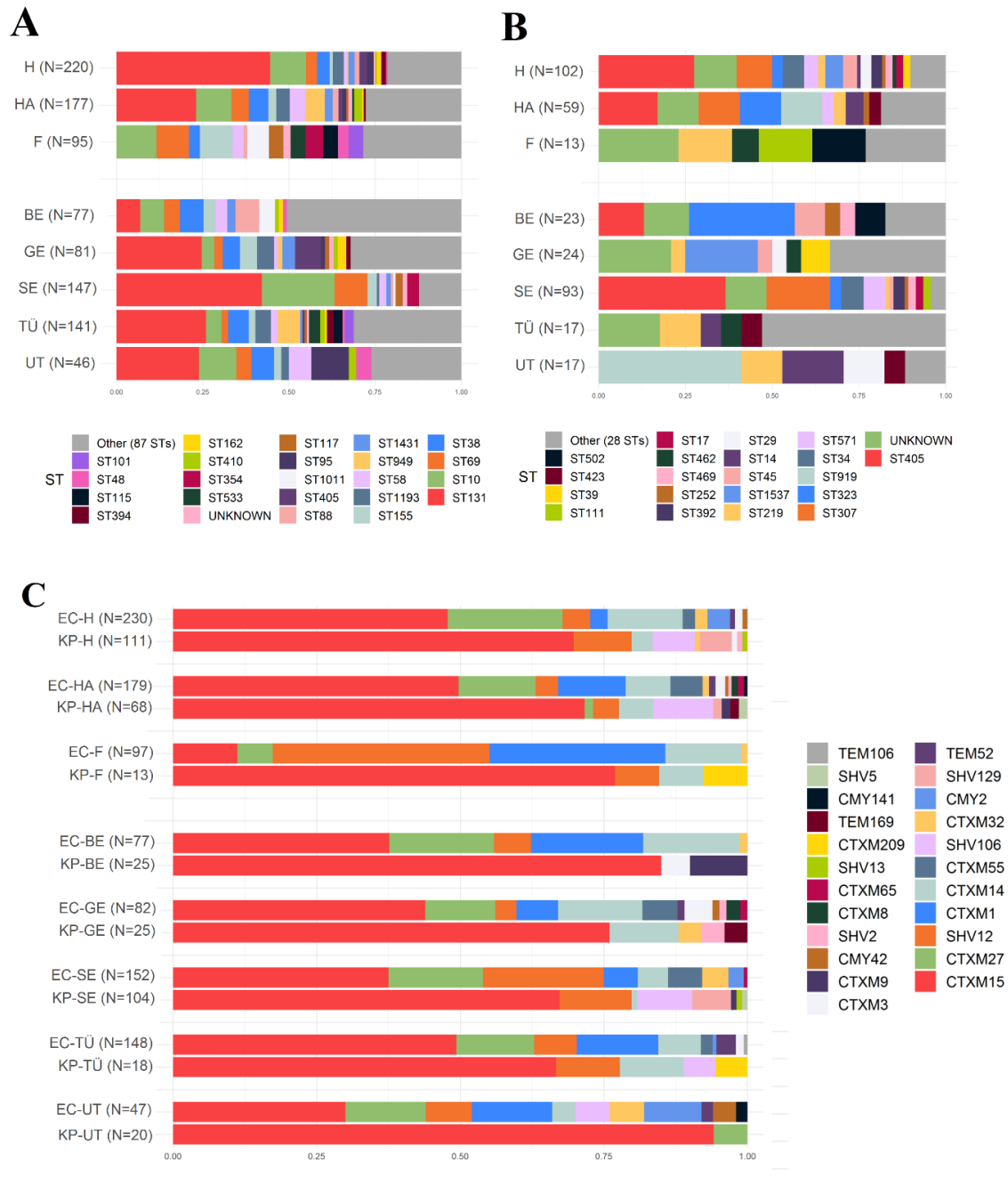


Figure 22. Distribution des STs et des gènes de résistance par réservoir et par ville. Proportions de STs identifiés parmi les Ec-BLSE-Ec (A) et les Kp-BLSE (B) par réservoir et par ville. Pour les Ec-BLSE (n=492), le ST est indiqué s'il est apparu au moins cinq fois dans l'ensemble des données pour Ec-BLSE et au moins deux fois pour Kp-BLSE. C. Proportions de gènes BLSE/pampC observés pour *E. coli* et *K. pneumoniae* par réservoir et par ville. H : humain ; HA : associé à l'humain (environnement) ; F : *food*, nourriture ; BE : Besançon ; GE : Genève ; SE : Séville ; TU : Tübingen ; UT : Utrecht ; EC : *E. coli* ; KP : *K. pneumoniae*. Figure créée par Tess D. Verschuuren (UMCU, Utrecht, Pays-Bas, équipe du consortium MODERN).

Les résultats de la Figure 22A viennent confirmer nos résultats. Les STs majoritaires sont les mêmes pour les isolats d'*E. coli* humains et collectés dans les eaux usées (ST131, ST10, ST38). De même, pour *K. pneumoniae* (Figure 22B), les STs majoritaires sont les mêmes pour les

isolats humains et collectés dans les eaux usées (ST405, ST307, ST323). Le gène *bla*_{CTX-M-15} était largement prédominant dans les isolats humains de Kp-BLSE, comme dans l'environnement et la nourriture (Figure 22C). Les gènes *bla*_{BLSE} les plus fréquemment retrouvés dans les Ec-BLSE humains sont, comme dans les eaux usées, *bla*_{CTX-M-15} et *bla*_{CTX-M-27} (Figure 22C). Le gène *bla*_{CTX-M-1} est en revanche plus fréquent dans les Ec-BLSE des eaux usées que dans les isolats d'origine humaine. Une étude récente suggère que l'implication clinique des Ec-BLSE porteurs du gène *bla*_{CTX-M-1} est plus faible, contrairement aux autres gènes *bla*_{BLSE}. En effet, celui-ci était moins souvent identifié dans les isolats cliniques que dans les isolats d'échantillons fécaux collectés dans la communauté³²². Les eaux usées reflètent la circulation des pathogènes dans la communauté et les isolats porteurs du gène *bla*_{CTX-M-1} étant plus responsables de portage que d'infections, il apparaît logique qu'ils soient plus fréquemment isolés dans les eaux usées que dans les prélèvements humains provenant de résidents d'établissements de long séjour et de patients sortant de l'hôpital, ces derniers ne reflétant pas la communauté générale.

Globalement, les résultats de la Figure 22 confirment que les populations d'EBLSE des eaux usées reflètent celles qui colonisent les humains. Ainsi, la surveillance des populations de BMR dans les eaux usées de STEU par WGS pourrait aider à détecter l'émergence ou la propagation de certaines BMR dans la communauté, mais également à quantifier et caractériser la pollution environnementale. Ce type de méthode a été proposé précédemment pour la surveillance des antibiotiques relargués par l'Homme et aujourd'hui pour la surveillance de l'imprégnation communautaire par le SARS-CoV-2^{323,324}. La surveillance des eaux usées devrait se focaliser sur les espèces cliniquement importantes mais aussi sur les gènes de résistance et les éléments génétiques mobiles pouvant se transmettre facilement par THG à d'autres espèces et ainsi diffuser dans l'environnement¹⁵⁷.

Plus globalement, nos résultats et ceux présentés Figure 22 montrent qu'en Europe, la nourriture semble avoir un rôle mineur dans la contamination des humains par les EBLSE. Bien que l'existence d'événements de transmission ne peut pas être exclue, une grande majorité des transmissions semblent être interhumaines, comme le suggère les résultats du WP2 de l'étude MODERN (suivi des transmission dans les foyers)²⁹². Ces résultats sont en accord d'autres études ayant comparé les populations d'Ec-BLSE dans les différents réservoirs^{46,48,196}. Nos résultats peuvent cependant paraître contradictoires avec une étude de modélisation estimant que la nourriture était responsable de 18,9 % de la contamination humaine par des *E. coli* résistants au C3G⁵⁹. Les auteurs pourraient avoir surestimé le rôle de la nourriture dans la transmission des *E. coli* résistants aux C3G d'une part en utilisant un modèle basé sur les gènes

bla ne prenant pas en compte leur support génétique et d'autre part en considérant également les *E. coli* producteurs de pAmpC.

Peu d'études se sont focalisées sur les Kp-BLSE, pour lesquelles les résultats sont peut-être plus contrastés. La nourriture est moins contaminée par Kp-BLSE que par Ec-BLSE mais la prédominance du gène *bla*_{CTX-M-15} chez les Kp-BLSE de tous les réservoirs autorise l'hypothèse de la propagation de ce gène par transfert de plasmide. La caractérisation complète de ces derniers apportera certainement une réponse.

Les animaux et particulièrement la nourriture issue des animaux de rente ont été considérés comme des voies d'acquisition importantes d'EBLSE pour les humains conduisant à la mise en place de plans de régulation de la consommation d'antibiotiques comme les plans EcoAntibio en France¹⁹⁹. Cependant, la majorité des résultats des études caractérisant les transferts des EBLSE entre les compartiments humains, environnementaux et animaux montrent que, dans les pays développés, la nourriture n'est pas une source majeure de contamination pour l'Homme. Ceci suggère que la diminution de la consommation d'antibiotiques en médecine humaine est le facteur principal à considérer pour faire diminuer la colonisation et les infections par les EBLSE chez l'Homme. Cependant, la régulation de la consommation antibiotique en médecine vétérinaire reste un enjeu important. Cette diminution pourrait avoir un effet indirect sur la santé humaine en diminuant la quantité et la diversité des gènes de résistance chez les animaux et le développement de nouvelles résistances qui pourraient devenir problématiques pour l'Homme dans le futur.

Le problème de la résistance aux antibiotiques est cependant un problème qui doit être considéré à l'échelle mondiale^{14,325}. Certaines zones du globe constituent de potentiels *hot-spot* d'émergence et de diffusion de la résistance qui pourraient toucher les pays européens. Ceci concerne notamment les pays en voie de développement où la situation pourrait être complètement différente de celle décrite précédemment. La diffusion des BLSE commence seulement à être décryptée dans certains de ces pays. Ainsi, une étude équatorienne montre l'existence d'une clonalité entre des isolats humains, de chiens et de poulets. La prédominance des gènes *bla*_{CTX-M-55} et *bla*_{CTX-M-65} contraste avec les gènes majoritaires en Europe³²⁶. Cependant, cette étude n'est probablement pas représentative de la situation en Equateur étant donné la faible taille de l'échantillon considéré. De plus, les plasmides n'ont pas été caractérisés, limitant les conclusions sur les transmissions entre les réservoirs. A Hanoï (Vietnam), pays à revenu intermédiaire de la tranche inférieure, la comparaison d'isolats

cliniques d'Ec-BLSE collectés à ceux isolés de poulets, de porcs, et dans l'environnement des abattoirs a cependant montré que les isolats cliniques différaient génétiquement des isolats d'origine animale¹⁹⁶. Ces résultats sont particulièrement intéressants car le Vietnam est un pays où le taux de colonisation par EBLSE dans la population générale est élevé et en progression. Ainsi, la prévalence du portage digestif de EBLSE est passée de 34,4% en 2007 à 48,1% dans la période 2009 – 2011¹⁹⁶. Compte tenu de ces chiffres, il était ainsi imaginable que la contribution de la nourriture dans la contamination humaine soit plus importante qu'en Europe, cette étude montre que ce n'est pas forcément le cas, Hanoï étant une ville développée qui ne reflète pas la situation rencontrée dans d'autres pays.

Huyn *et al.* ont récemment décrit la prévalence de portage de *K. pneumoniae* (en incluant tous les espèces du complexe *K. pneumoniae* comme *K. variicola* ou *K. quasipneumoniae*) dans une cohorte de patientes enceintes vivant au Cambodge, au Sénégal et à Madagascar, dans des zones urbaines et rurales³²⁷. Il ont montré que 0,7% des femmes étaient colonisées par Kp-BLSE au Sénégal, contre 14,4% au Cambodge et 8,4% à Madagascar, avec une prédominance du gène *bla*_{CTX-M-15} dans ces souches de Kp-BLSE (60%)³²⁷. Sands *et al.* ont par ailleurs récemment montré que *K. pneumoniae* était l'espèce la plus isolée dans les septicémies néonatales dans sept pays en voie de développement d'Afrique et d'Asie du Sud. De plus, $\geq 80\%$ des BGN isolées dans cette étude étaient résistantes au céfotaxime ou au ceftriaxone³²⁸. Dans certains pays, comme le Bangladesh, la situation est alarmante. Rousham *et al.* ont récemment décrit une prévalence de portage digestif d'Ec-BLSE de 67,5% chez des individus adultes, de 68% dans la volaille. Le gène *bla*_{CTX-M-1} prédominait largement dans les isolats humains (83,7%), de volaille (77,8%) et d'eaux usées (78,2%)³²⁹. Une caractérisation des plasmides des isolats collectés dans ces études est cependant nécessaire pour confirmer les liens entre les différents réservoirs.

Nadimpalli *et al.* décrivent également une situation catastrophique dans les bidonvilles bangladais, indiens, kenyans ou péruviens. Leur étude met en avant un nombre important de problèmes auxquels sont confrontés les habitants de ces zones³³⁰. Les bidonvilles sont en effet confrontés à des densités de populations très élevées pouvant dépasser les 125 000 personnes par km² ^{331–333}. A titre d'exemple, la densité de population dans la ville de New-York (NY, USA) est d'environ 10 000 personnes par km² ³³³. La densité de population dans les bidonvilles continue d'augmenter et pourrait doubler d'ici 2050³³⁴. Les bidonvilles sont donc de véritables *hot-spot* de transmission bactérienne dans lesquels l'usage des antibiotiques est anarchique. En plus de la surpopulation, il existe d'autres problèmes comme la proximité avec les animaux qui favorise les échanges bactériens ou encore des problèmes d'alimentation en eau potable et un

manque d'installations sanitaires³³⁵. Les habitants des bidonvilles vivent, mangent et travaillent donc dans des zones où les déchets humains et animaux s'accumulent et où l'eau de boisson, la nourriture et les sols sont contaminés, à la fois par leurs propres déchets, mais également par les déchets des villes se trouvant en amont qui se déversent dans les bidonvilles³³⁰. Les facteurs évoqués ci-dessus favorisant donc la sélection et les échanges bactériens, les zones telles que les bidonvilles pourraient devenir des sources d'émergence de nouvelles BMR qui pourraient diffuser aisément à travers le monde, comme déjà observé pour certaines résistances, tant la mondialisation a rendu les déplacements à travers le globe faciles^{336,337}.

L'amélioration des conditions de vie dans ces zones semble donc cruciale pour endiguer l'émergence et la diffusion de la résistance dans les années à venir. Il faudrait pour cela développer l'accès à l'eau potable et les infrastructures sanitaires dans les pays en voie de développement mais également encadrer et réguler la consommation des antibiotiques³²⁵. Il y a donc là un premier enjeu plus politique que scientifique. S'il est certain qu'un soutien politique est nécessaire pour améliorer les conditions sanitaires, les chances pour que ce soutien provienne du même pays paraissent minces. A l'heure actuelle, il ne paraît pas non plus imaginable de réussir à convaincre les représentants politiques des pays développés à investir plus massivement dans le développement d'infrastructures dans d'autres pays pour éviter de futures pandémies. Dans leur étude, Collignon *et al.* ont corrélé facteurs anthropogéniques et socio-économiques à l'antibiorésistance et montrent que la mise en place de mesures sanitaires est nécessaire pour contrôler l'antibiorésistance ou encore que la gouvernance d'un pays et son niveau de corruption sont corrélés avec la résistance aux antimicrobiens³³⁸.

Si des infrastructures de traitement des eaux usées et d'accès à l'eau potable sont mises en place, leur impact pourra être facilement évalué en comparant la prévalence de certains pathogènes (les EBLSE par exemple) dans les zones avec et sans infrastructures. Le développement du WGS pourrait également faciliter la caractérisation génétique des BMR et la compréhension de leur diffusion. La surveillance des eaux usées comme évoqué précédemment serait un moyen efficace de détecter l'émergence ou la propagation de certaines BMR dans les zones comme les bidonvilles.

5.2.3 Le concept *One Health* : l'importance d'une vue globale

On peut parler de problématique *One Health* quand la santé d'un écosystème affecte la santé d'un autre écosystème et où la santé humaine est impliquée¹⁴. Par exemple, la contamination de l'environnement par les antibiotiques utilisés en médecine humaine peut être définie comme un problème *One Health*. En revanche, comme nous l'avons vu, les EBLSE issues de la santé animale semblent avoir un impact limité (ou tout du moins indirect) sur la santé humaine, au moins dans les pays développés.

Le concept *One Health* englobe cependant un grand nombre d'autres problématiques. Le problème des EBLSE se pose également pour les EPC, dont la diffusion est devenue un problème de santé publique majeur⁴¹. Comme les EBLSE, les EPC diffusent soit par transmission d'un clone de patient à patient, soit par le transfert des plasmides contenant les gènes de résistance. León-Sampedro *et al.* ont récemment montré qu'au sein d'hôpitaux, la fréquence de THG médié par des plasmides pOXA-48 de *K. pneumoniae* vers *E. coli* était élevée mais qu'il y avait peu de diffusion clonale d'*E. coli* entre les patients¹³¹. Les auteurs ont également découvert que la fréquence de THG au sein même des patients était très élevée, suggérant que des transferts de plasmides ont lieu dans l'intestin de chaque patient colonisé¹³¹. Ces résultats confirment que les prochaines études *One Health* sur la diffusion de la résistance doivent se focaliser sur la diffusion des gènes et pas seulement sur la diffusion des clones, comme préconisé par la théorie du gène égoïste (*selfish gene theory*)³³⁹. Finalement, la caractérisation de la structure des populations ne donne qu'une vision approximative de la diffusion de la résistance. Une réponse précise à la question des transferts entre les différents réservoirs, posée par le concept *One Health*, ne pourra être apportée qu'en considérant les transferts au niveau du gène et pas seulement au niveau du clone. Par exemple, *K. pneumoniae* pourrait constituer un réservoir de gènes de résistance important et être fréquemment impliqué dans l'acquisition de nouvelles résistances pour *E. coli*. Dans le futur, la surveillance moléculaire de la diffusion de la résistance devra s'effectuer en considérant toutes les espèces pouvant contribuer au flux de gènes pour une espèce donnée³⁴⁰.

Le problème de la résistance aux antimicrobiens ne se limite pas uniquement aux infections humaines. La pollution massive par les antibiotiques, les biocides, les métaux lourds ou autres substances pouvant sélectionner des résistances à ces composés pourrait déséquilibrer les communautés microbiennes de toute la biosphère et ainsi perturber les écosystèmes environnementaux³⁴¹. On sait aujourd'hui que la majorité des écosystèmes sont pollués et que

les niveaux de pollution sont généralement élevés dans les écosystèmes avec un niveau d'anthropisation élevé et plus faibles dans des zones reculées sans activité anthropogénique, comme les pôles⁵⁴. De nombreuses publications ont documenté la contamination des rivières, eaux souterraines, eaux côtières ou les sols par les BMR, les supports de la résistance aux antibiotiques ou les substances pouvant sélectionner cette résistance^{170,342-344}. Bien que la contamination de ces environnements soit fréquente et que les microbiomes des humains, des animaux, des plantes, des environnements aquatiques et terrestres soient interconnectés, Hernando-Amado *et al.* soulignent que la transmission entre les réservoirs est limitée par l'adaptation de certaines lignées d'espèces bactériennes à certains hôtes (par exemple, les souches d'*E. coli* responsables d'infections extra-intestinales chez les humains)²⁹⁴. Cependant, l'expansion des zones urbaines, la destruction des habitats et la sélection de variétés végétales et animales d'intérêt économique sont responsables d'une diminution de la diversité et d'une augmentation de la densité de populations monospécifiques provoquant une homogénéisation des hôtes qui pourrait favoriser la dissémination de la résistance aux antibiotiques via des zoonoses¹⁴. Les zoonoses sont fréquentes et de nombreux pathogènes responsables de maladies infectieuses chez les humains ont une origine animale³⁴⁵. La constante expansion des territoires urbains au détriment de la conservation des habitats naturels de certaines espèces, augmentant les contacts entre les animaux sauvages et les humains, mais également l'intensification des élevages, la diminution de la diversité ainsi que les changements climatiques pourraient faciliter le passage des pathogènes entre les réservoirs et donc augmenter considérablement le risque de zoonoses. L'émergence des récentes zoonoses, notamment liées à des virus, comme les maladies liées aux virus de type coronavirus, Zika ou encore Ebola sont le reflet de ces changements liés aux activités humaines. Les échanges internationaux ont ensuite permis à certains de ces virus de diffuser⁵⁴. Dans les années à venir, il serait judicieux d'évaluer l'impact que les activités humaines pourront avoir sur les écosystèmes ou sur l'émergence de nouveaux pathogènes afin de privilégier la conservation des écosystèmes plutôt que l'expansion infinie de l'Homme.

6. CONCLUSION

La démocratisation des analyses de données de WGS simplifie la caractérisation rapide des souches et des éléments génétiques porteurs des gènes de résistance et pourrait permettre de surveiller efficacement les résistances qui circulent dans la communauté, notamment dans les pays en voie de développement. Même si la mise en place de procédures standardisées pour l'analyse des données de WGS est nécessaire, cette technique reste la plus discriminante, la rendant incontournable en épidémiologie bactérienne.

En Europe, les transferts d'EBLSE entre les différents réservoirs (Homme, animaux, environnement) sont rares. La diminution de la résistance bactérienne aux antibiotiques sera ainsi principalement due à une diminution de la consommation antibiotique en santé humaine. Les transmissions interhumaines constituent une voie de dissémination privilégiée pour les BMR. La compréhension des facteurs liés au portage intestinal pourrait faciliter la compréhension de la diffusion des BMR dans la communauté.

Enfin, la compréhension de la diffusion de l'antibiorésistance nécessite de considérer non seulement les transmissions de clones bactériens mais aussi les transferts intra- et inter-espèces d'éléments génétiques mobiles et de gènes. Pour comprendre l'émergence de la résistance, il faut considérer toutes les voies d'acquisition de gènes de résistance chez les espèces cliniquement importantes comme *E. coli*. Les prochaines études devront explorer les dynamiques d'échange inter-espèce avec des outils adaptés pour comprendre et prévenir l'émergence de nouvelles bactéries pathogènes résistantes.

7. MATERIEL ET METHODES

7.1 Design des études

7.1.1 Projet MODERN

Le projet MODERN (*Understanding and modelling reservoirs, vehicles, and transmission of ESBL-producing Enterobacteriaceae in the community and long-term care facilities*) est un projet financé par le programme Européen JPI-AMR (*Joint programming initiative on antimicrobial resistance*). L'objectif du projet était d'identifier les réservoirs et de comprendre les dynamiques de transmission des EBLSE dans cinq villes européennes : Besançon (France), Genève (Suisse), Séville (Espagne), Tübingen (Allemagne) et Utrecht (Pays-Bas). Plusieurs volets composaient cette étude. Ainsi, la prévalence, les réservoirs et les dynamiques de transmission des EBLSE ont été déterminés dans des établissements de long séjour (WP1) et dans la communauté (WP2). Nous avons prélevé les selles de résidents d'établissements de long séjour, de patients porteurs d'EBLSE à leur sortie de l'hôpital et des membres de leur famille afin d'identifier les potentiels événements de transmission intrafamiliaux. Enfin, les EBLSE ont été recherchées dans des prélèvements environnementaux et des échantillons de nourriture (WP3) afin d'identifier les liens potentiels entre le réservoir humain, l'environnement et la nourriture. Le laboratoire d'Hygiène Hospitalière du CHU de Besançon a participé à tous les volets de l'étude MODERN et était responsable de la coordination et de la valorisation du WP3 portant sur la diffusion des EBLSE dans l'environnement et dans la nourriture. Ce manuscrit se concentrera ainsi sur cette partie. La publication traitant de la transmission des EBLSE dans la communauté (WP2) est présentée dans les travaux complémentaires.

7.1.2 Colonisation de résidents d'EHPADs par *P. aeruginosa*

Cette étude est une étude prospective et multicentrique conduite entre novembre 2017 et avril 2019 dans 20 EHPADs. Elle est composée de deux cohortes différentes : la cohorte I, incluant 18 établissements situés dans la région Bourgogne-Franche-Comté³⁴⁶ et la cohorte II (étude ancillaire du projet MODERN) incluant un établissement situé à Besançon (France) et deux situés à Tübingen (Allemagne). Les résidents inclus ont exprimé leur consentement écrit ou oral avant le début l'étude. Le protocole de l'étude a été validé par des comités d'éthique : 'Comité de Protection des Personnes – Ouest III', France (référence : 2017-A02640-53) ; 'Comité d'Etude Clinique' de l'hôpital universitaire de Besançon, France (référence : 2017-A00276-

47) ; et 'Ethik-Kommission' de l'hôpital universitaire de Tübingen, Allemagne (référence : 818/2017BO1).

La cohorte I (Figure 23A) visait à mesurer la prévalence de portage intestinal de *P. aeruginosa* des résidents de 18 EHPADs de Bourgogne-Franche-Comté (Est de la France). Un échantillon de selles a été obtenu pour chaque résident de la cohorte I. Pour cette cohorte, les échantillons de selles ont été collectés lors de l'étude R'EHPAD conduite au laboratoire et dont les résultats concernant les EBLSE ont été publiés³⁴⁶. Les isolats de *P. aeruginosa* collectés lors de cette étude ont été inclus à notre projet.

La cohorte II (Figure 23B) avait pour but de déterminer la prévalence du portage intestinal de *P. aeruginosa* par les résidents de trois EHPADs et de suivre l'acquisition de *P. aeruginosa* par les résidents non porteurs. Pour cette cohorte, des échantillons de selles ont été collectés huit fois (au départ de l'étude et après 1, 4, 12, 20, 21, 24 et 32 semaines). Des échantillons d'eau provenant des siphons des lavabos situés dans les salles de bain des résidents ont été prélevés à deux reprises (au départ de l'étude et après 20 semaines). Des points d'eau de boisson ont été prélevés à Besançon.

7.1.3 Diffusion d'*E. coli* dans les environnements peu anthropisés

Cette étude, conduite en 2015-2016 par le laboratoire, se proposait d'étudier la contamination par *E. coli* de zones humides associées à des rivières. Une première publication a mis en relation contamination bactérienne, saisonnalité et paramètres physico-chimiques de l'eau¹⁶⁵. Je n'ai pas participé à la campagne de prélèvements de cette étude, mais uniquement caractérisé les souches qui avaient déjà été isolées. La partie de l'étude traitée dans ce manuscrit visait à caractériser phénotypiquement et génétiquement les isolats de *E. coli* précédemment collectés dans les zones humides.

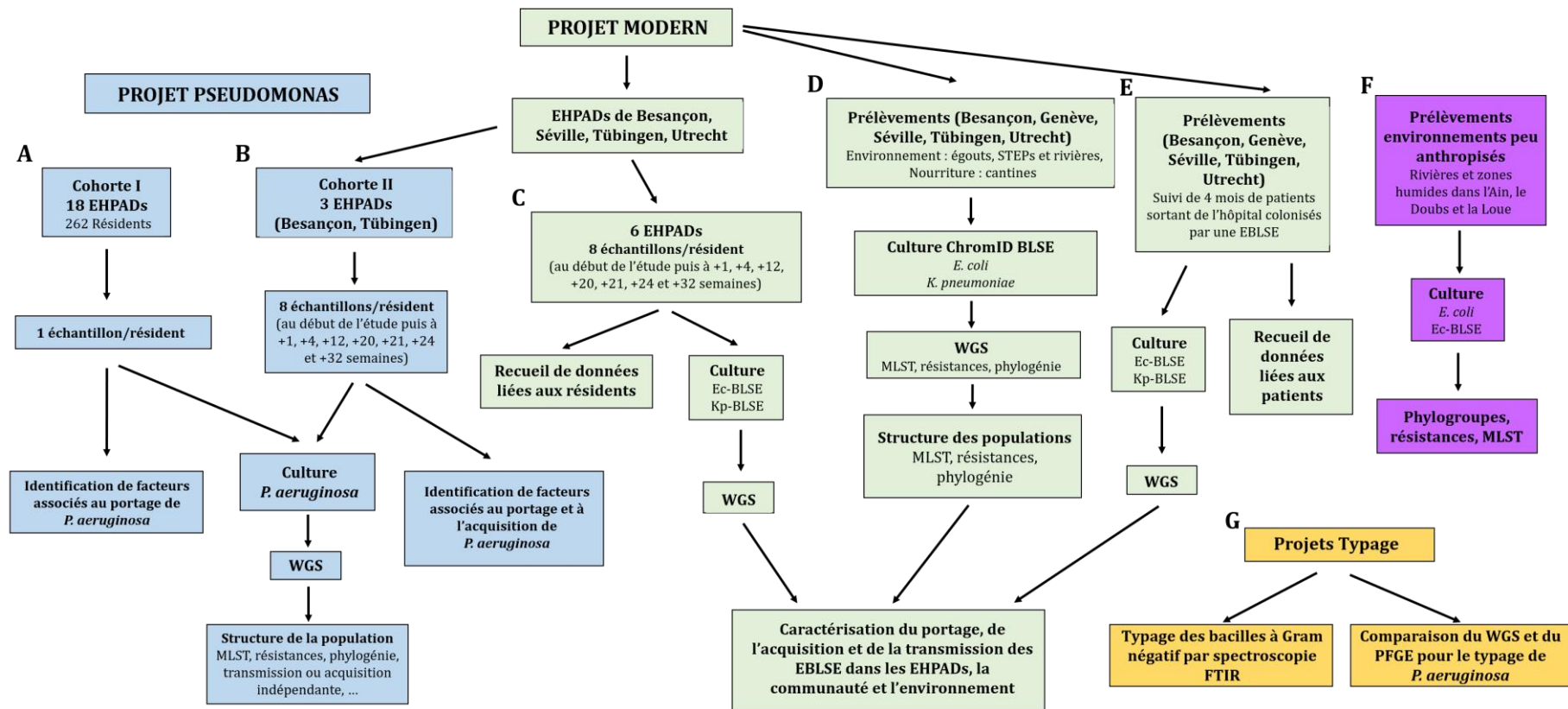


Figure 23. Projets menés au cours du doctorat. Panels A et B : colonisation de résidents vivant en établissements de long séjour par *P. aeruginosa*. Panels C, D et E : Projet JPI-AMR MODERN. A. Cohorte I : Détermination de la prévalence de *P. aeruginosa* dans 18 établissements de long séjour de Bourgogne-Franche-Comté. L'échantillonnage et le recueil des données ont été effectués au préalable et les isolats de *P. aeruginosa* ont été inclus à notre étude. B. Cohorte II : Détermination de la prévalence et de l'acquisition de *P. aeruginosa* par les résidents de trois établissements de long séjour. C. Détermination de la prévalence de colonisation Ec-BLSE et Kp-BLSE par les résidents de six établissements de long séjour. D. Comparaison des populations d'Ec-BLSE et de Kp-BLSE retrouvées dans la nourriture et dans l'environnement à l'aide de données de WGS. E. Détermination de la durée de colonisation par EBLSE et des événements de transmission intrafamiliaux par le suivi de patients positifs à EBLSE à leur sortie de l'hôpital. F. Caractérisation de la structure de la population et des gènes *bla*_{BLSE} d'isolats d'*E. coli* collectés à partir de zones humides associées à trois rivières. G. Deux projets de typage ont été menés pendant la thèse en parallèle des projets principaux. Le premier testait les performances d'un nouvel automate de spectroscopie FTIR. Le second comparait le pouvoir discriminant du WGS et le PFGE. Les publications issues de ces projets sont présentées dans les travaux complémentaires.

7.2 Echantillonnage et culture

7.2.1 Echantillons de selles

Le portage intestinal de *P. aeruginosa* a été déterminé en prélevant des échantillons de selles fraîches pour chaque résident. Les échantillons de selles ont été collectés dans des pots pour coprologie (Sarstedt, Marnay, France) et ont été analysés au laboratoire dans un délai <24 h. Chaque échantillon de selles a été étalé sur gélose contenant du cétrimide (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et incubé 18 – 24h à $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Les isolats ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF puis conservés à -80°C .

7.2.2 Echantillons de nourriture

La contamination d'échantillons de nourriture par EBLSE a été évaluée en collectant des échantillons issus de la restauration collective (cuisines de quatre établissements de long séjour) et de supermarchés dans cinq villes européennes : Besançon (France), Genève (Suisse), Séville (Espagne), Tübingen (Allemagne) et Utrecht (Pays-Bas). Dans les établissements de long séjour, au moins quatre échantillons de viandes et quatre échantillons de légumes ont été collectés huit fois sur une période de 32 semaines (Figure 23D). Parallèlement, des échantillons de viandes et de légumes ont été collectés entre janvier 2018 et août 2019 dans 35 supermarchés répartis entre cinq villes : 8 à Besançon, 14 à Tübingen, 3 à Séville, 6 à Utrecht et 4 à Genève. Pour chaque échantillon de nourriture, 25 g ont été incubés dans un milieu d'enrichissement contenant du tryptone soja (Oxoid Ltd, Basingstoke, Angleterre) supplémenté par de la vancomycine 8 mg/L et du cefotaxime 0,25 mg/L pendant une nuit à $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Dix μL ont ensuite été platés sur gélose sélective ChromID BLSE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et incubés 24h à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ afin de sélectionner uniquement les bactéries productrices de BLSE. Les isolats ont ensuite été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et un maximum de trois isolats de *E. coli* et/ou de *K. pneumoniae* présentant des morphotypes différents par prélèvement ont été conservés à -80°C .

7.2.3 Environnement pollué par l'Homme

La contamination de l'environnement pollué par l'Homme par les EBLSE a été évaluée en collectant des échantillons huit fois sur une période de huit mois (Figure 23D) dans cinq villes européennes : Besançon (France), Genève (Suisse), Séville (Espagne), Tübingen (Allemagne) et Utrecht (Pays-Bas). Dans chaque ville, les égouts du ou des établissements de long séjour

associés à l'étude JPI-AMR MODERN, les eaux usées entrant dans la STEP et la rivière ~200 m en aval de la STEP, à au moins 5 m de la rive (Figure 24). Deux-cents mL d'eau ont été collectés pour chaque échantillon provenant des égouts et des STEPs et 500 mL d'eau ont été collectés pour les échantillons provenant des rivières. Pour chaque échantillon provenant des égouts ou des STEPs, 100 μ L d'une dilution au 1/10 et d'une dilution au 1/100 ont été plâtes sur géloses sélectives ChromID BLSE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Les échantillons collectés dans les rivières ont été filtrés sur des membranes Microfil V (Millipore, Molsheim, France) de 0,45 μ m et celles-ci ont été déposées sur géloses ChromID BLSE puis incubées à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24h. Les isolats ont ensuite été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et un maximum de trois isolats de *E. coli* et/ou de *K. pneumoniae* présentant des morphotypes différents par prélèvement ont été conservés à -80°C .

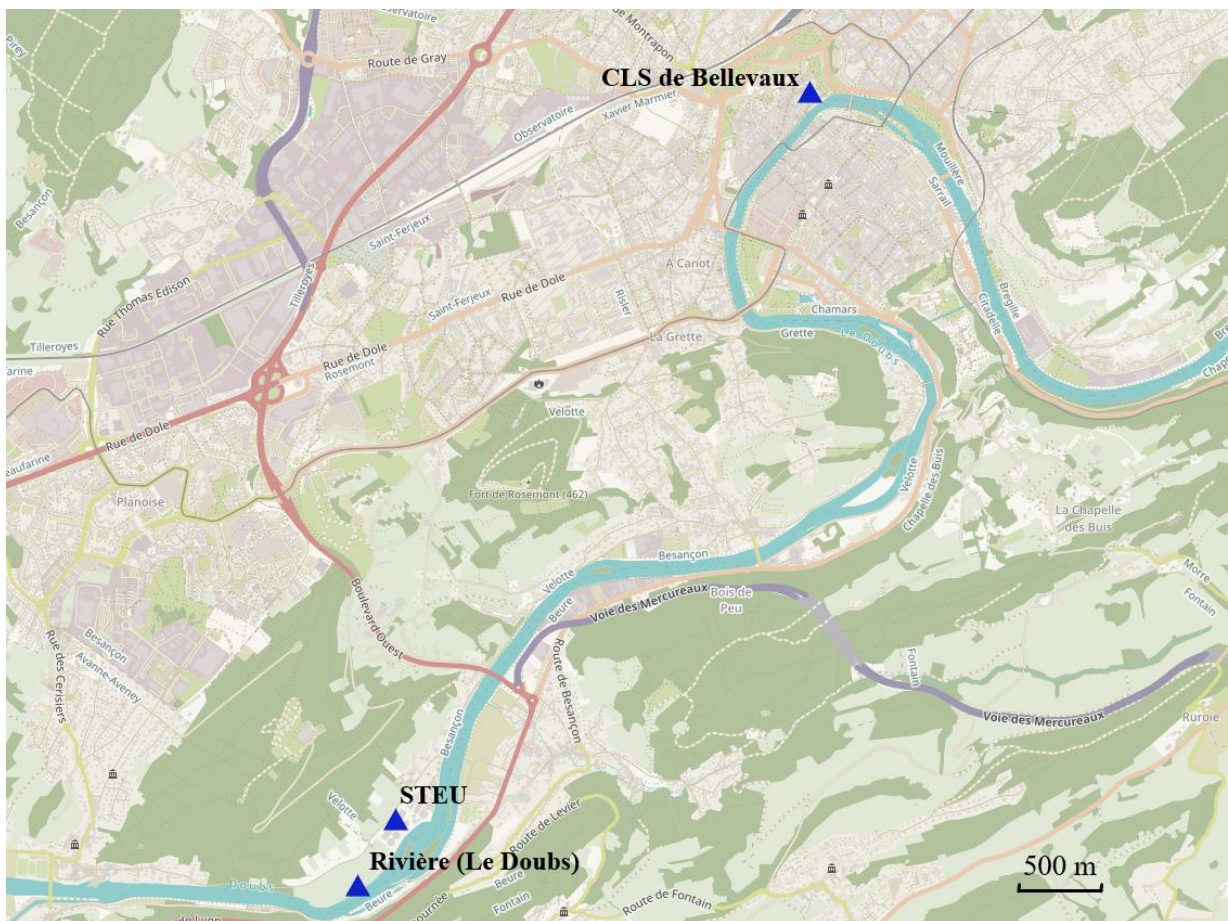


Figure 24. Emplacement des trois points de prélèvements de l'environnement à Besançon (France) pour le projet MODERN. Etablissement de long séjour de Bellevaux, prélèvement des égouts recevant les eaux usées ; STEU, station de traitement des eaux usées.

7.2.4 Zones humides et rivières associées

Des prélèvements d'eau ont été effectués dans 16 zones humides situées le long des plaines alluviales de l'Ain, du Doubs et de la Loue (Figure 25). Un point par rivière a également été prélevé afin de comparer les rivières et les zones humides. Pour chaque rivière et pour chaque zone humide associées, 250 mL d'eau ont été collectés chaque mois pendant un an (de mars 2015 à mars 2016). Pour chaque échantillon, 100 mL d'eau ont été filtrés sur des membranes 0,45 µm et celles-ci ont été déposées sur géloses Drigalski (Oxoid Ltd, Basingstoke, Angleterre) afin de sélectionner les entérobactéries et sur géloses sélective ChromID BLSE (Figure 23F). Les colonies poussant sur géloses Drigalski et sur gélose sélective des EBLSE ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF et tous les isolats identifiés comme *E. coli* et présentant des morphotypes différents ont été conservés à -80°C. Comme mentionné dans le design de l'étude, cette partie a été effectuée au laboratoire avant mon arrivée.

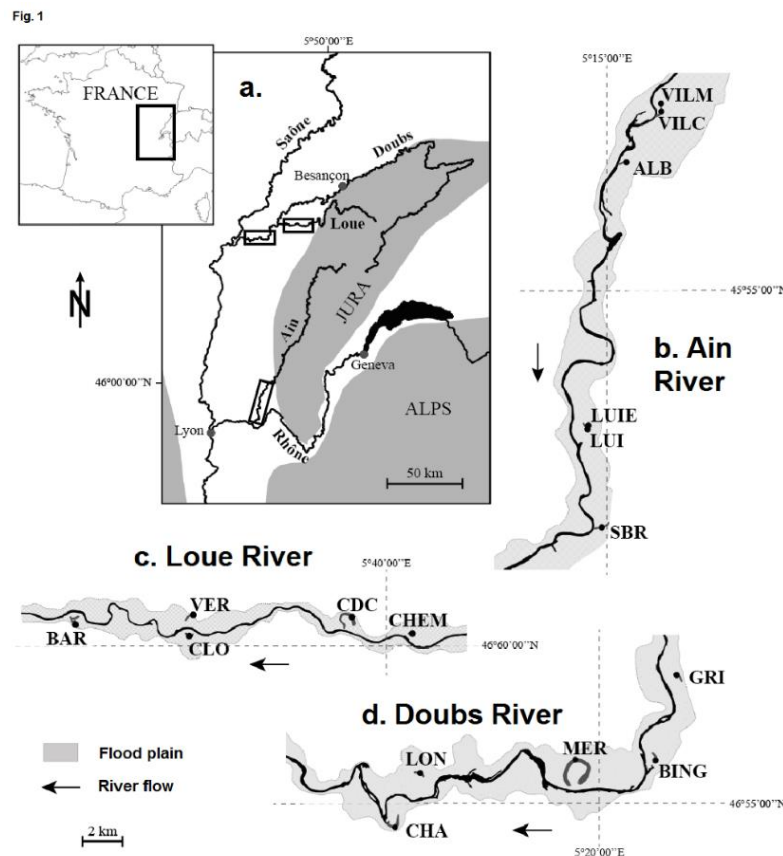


Figure 25. Emplacement des 16 zones humides de l'étude. Le carré en haut à gauche représente l'emplacement des trois hydrosystèmes en France. (a) Détail du réseau de rivières étudié. (b) Détail de la plaine alluviale de l'Ain. (c) Détail de la plaine alluviale de la Loue. (d) Détail de la plaine alluviale du Doubs.

7.2.5 Conservation des isolats

Tous les isolats bactériens d'intérêt ont été congelés dans des cryotubes contenant 1 mL de milieu de conservation cœur-cervelle (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) supplémenté de 30% de glycérol. Les bactéries ont été prélevées à l'aide d'une oëse de 10 µL et re-suspendues dans le milieu de conservation. Les tubes ont ensuite été placés dans un congélateur à une température de -80°C au Centre de Ressources Biologiques – Filière Microbiologie de Besançon (CRB-FMB).

7.3 Recueil de données et analyse des facteurs de risque

Lors des cohortes I et II visant à déterminer la prévalence de portage intestinal de *P. aeruginosa* par des résidents d'EHAPDs, les métadonnées ont été recueillies afin d'identifier les facteurs associés au portage (cohorte I et II) et à l'acquisition (cohorte II) de *P. aeruginosa*. Le recueil des données liées à la cohorte I a été effectué, comme les prélèvements de selles, au préalable par le laboratoire. Les données recueillies pour la cohorte I sont présentées dans le Tableau 4 et le Tableau 5. Pour la cohorte II, les caractéristiques de l'établissement ont été recueillies et des questionnaires ont été remplis pour chaque résident à l'inclusion dans l'étude. Des questionnaires de suivi ont ensuite été complétés pour chaque résident à chaque semaine de prélèvement. Les données recueillies dans le cadre de cette étude sont présentées dans le Tableau 6 et le Tableau 7.

Characteristics of nursing homes (NHs) in cohort I	n (%) or median (interquartile range)
Housing capacity	78.4 (38 - 120)
Number of physicians	9.5 (4 - 15)
Sectorization of care during the day	11 (61.1)
Sectorization of care during the night	6 (33.3)
Existence of a preferential list of ATB	8 (44.4)
Existence of an institutional ATB policy	13 (72.2)
NH linked to a larger healthcare institution	8 (44.4)
Existence of an in-house pharmacy	9 (50.0)
Intervention of an infection control nurse from the regional mobile team	13 (72.2)
Existence of a route for waste disposal	18 (100)
Existence of protocols regarding ESBLE	11 (61.1)
Bedpan washer disinfectant	6 (33.3)
ABHR available close to the patient	18 (100)
Single-use gloves available	18 (100)
Single-use apron available	18 (100)
Staff training in universal hygiene precautions	15 (83.3)
Staff training in hand hygiene	16 (88.9)
Information to resident regarding hand hygiene	11 (61.1)

Tableau 4. Caractéristiques des 18 EHPADs de la cohorte I.

	<i>P. aeruginosa</i> carriers (n=123) n (%) or median (interquartile range)	Non-<i>P. aeruginosa</i> carriers (n=139) n (%) or median (interquartile range)
Female gender	91 (44.8)	112 (55.2)
Age, years	89 (73 - 99)	88 (62 - 98)
Duration of stay (days)	1029 (405 - 2188)	677 (286 - 1432)
Previous hospitalization in preceding 12 months	38 (30.9)	36 (25.9)
Route of excreta disposal		
Private bathroom	61 (49.6)	79 (56.8)
Shared bathroom	10 (8.1)	11 (7.9)
Commode chair	15 (12.2)	23 (16.5)
Incontinence pads	97 (78.9)	89 (64.0)
Medical history		
Immunodeficiency	8 (6.5)	8 (5.8)
Diabetes	20 (16.3)	15 (10.8)
Urinary incontinence	105 (85.4)	94 (67.3)
Fecal incontinence	72 (58.5)	59 (42.4)
Bed rest	10 (8.1)	11 (7.9)
Exposure to an invasive medical device (the day of the survey)	9 (7.3)	7 (5.0)
Prior exposure to ATB in preceding 6 months	52 (42.3)	54 (38.8)

Fluoroquinolones	3 (2.4)	7 (5.0)
Amoxicillin	11 (8.9)	17 (12.2)
Amoxicillin-clavulanate	11 (8.9)	13 (9.3)
3GC	17 (13.8)	14 (10.1)

Tableau 5. Caractéristiques des 262 résidents de la cohorte I en fonction de leur statut de porteur digestif de *P. aeruginosa*.

	Belleveaux	Samariter-Stift	Luisse-Wetzels-Stift
Number of beds	264	80	120
Amount of single rooms with private bathroom	50	66	104
Amount of single rooms without private bathroom	32	0	0
Amount of double rooms with private bathroom	0	7	8
Amount of double rooms without private bathroom	91	0	0
Number of nursing staff working in the LTCF in total	221	39.86	78
Nurse/patient ratio	0.17	0.18	0.16
Availability of community rooms for the residents	yes	yes	yes
Availability of common sanitary facilities	yes	yes	yes
Meals taken in private rooms	no	no	no
Meals taken in community rooms	yes	yes	yes
Meals taken out of the NHs	yes	no	no
Meals prepared in the kitchen of the NHs	yes	yes	yes
Sink in every room	yes	yes	yes
Hand sanitizer dispenser in every room	yes	no	no
Hand sanitizer dispensers in public rooms and public toilets	yes	yes	yes
Hygiene trainings for the nursing staff on a regular basis	yes	yes	yes
Hygiene trainings for the cleaning staff on a regular basis	yes	yes	yes
Residents screened at entry for MRSA	yes	no	no
Residents known to be colonized with multiresistant pathogens registered	yes	no	yes
Isolation rooms for residents colonized with multiresistant pathogens	yes	no	no
Defined cleaning standard for isolation rooms	yes	no	no
Records of administered antibiotics	yes	yes	yes

Tableau 6. Caractéristiques des trois EHPADs de la cohorte II.

	Non-<i>P. aeruginosa</i> carriers (n=114) n (%) or median (interquartile range)	<i>P. aeruginosa</i> carriers (n=53) n (%) or median (interquartile range)
Male gender	17 (14.9)	14 (26.4)
Age, years	86 (80 - 92)	88 (83 - 92)
BMI	23.7 (19.6 - 27.8)	24.5 (20.9 - 27.5)
Duration of stay (days)	888 (443 - 1342)	656 (315 - 1138)
Wheelchair bound	60 (52.6)	30 (56.6)
Private bathroom	61 (53.5)	23 (43.4)
Living with partner	0	2 (3.8)
Assistance for personal hygiene	107 (93.9)	51 (96.2)
Assistance for using toilets	88 (77.2)	42 (79.3)
Previous hospitalization in preceding 12 months	1 (1.0)	0
Eating habits		
Omnivore	112 (98.2)	53 (100)
Vegetarian	1 (0.9)	0
Artificial nutrition	1 (0.9)	0
Medical history		
Diabetes	24 (21.2)	13 (24.5)
Vascular disease	80 (70.8)	39 (73.58)
Pulmonar disease	17 (15.0)	4 (7.5)
Renal failure	10 (8.8)	5 (9.4)
Liver disease	3 (2.6)	0
Infected with HIV	0	0
Hemiplegia	9 (7.6)	3 (5.7)
Malignancy	8 (7.1)	4 (7.5)
Fecal incontinence	86 (76.1)	41 (77.4)
Medical device		
Central venous catheter	1 (100)	0
Percutaneous feeding tube	1 (0.9)	1 (1.9)
Mechanical ventilation	0	0
Stoma	1 (0.9)	1 (1.9)
Current urinary catheter	2 (1.9)	1 (1.9)
Urinary catheter in the preceding 12 months	2 (1.9)	0
ATB at study inclusion	4 (3.5)	2 (3.8)
Fluoroquinolones	0	0
Amoxicillin	0	1 (1.9)
Amoxicillin-clavulanate	1 (0.9)	1 (1.9)
3GC	1 (0.9)	0
Azithromycin	3 (2.6)	0
Fosfomycin	1 (0.9)	0
Prior exposure to ATB in preceding 12 months	52 (45.6)	27 (50.9)
Fluoroquinolones	6 (5.3)	2 (3.8)
Amoxicillin	10 (8.8)	3 (5.7)
Amoxicillin-clavulanate	15 (13.2)	7 (13.2)
3GC	13 (11.4)	11 (20.7)
Carbapenems	1 (0.9)	0
Azithromycin	6 (5.3)	1 (1.9)
Fosfomycin	10 (8.8)	6 (11.3)
Ciprofloxacin	2 (1.7)	2 (3.8)
Other	19 (16.7)	11 (20.7)

Tableau 7. Caractéristiques des 167 résidents de la cohorte II en fonction de leur statut de porteur digestif de *P. aeruginosa*.

7.4 Caractérisation phénotypique des souches

7.4.1 Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Tous les isolats de l'étude ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex 100 LT ; Bruker Daltonik GmbH, Brême, Allemagne) avant d'être conservés ou avant séquençage de leurs génomes. La technique consiste à déposer une colonie bactérienne sur un spot de la cible MALDI-TOF puis de le recouvrir de matrice HCCA (Bruker Daltonik GmbH). La matrice va charger positivement les protéines de l'échantillon. Après séchage, la plaque est insérée dans le spectromètre. Les spectres de masse sont générés à l'aide d'un laser, qui va désorber les protéines de l'échantillon, qui seront séparées en fonction de leurs masses et de leurs charges dans le tube de vol. Ainsi, une protéine de masse élevée aura un temps de vol plus élevé et atteindra le détecteur moins rapidement qu'une protéine de masse faible. La base de données intégrée à l'appareil va ensuite identifier l'espèce à laquelle le spectre correspond. Les différentes étapes d'acquisition des spectres sont représentées sur la Figure 26.

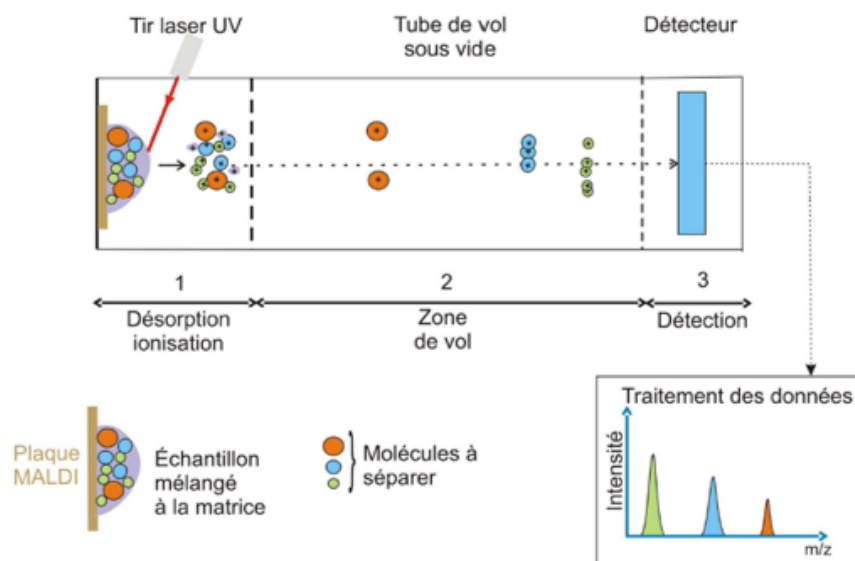


Figure 26. Principe de l'acquisition des spectres par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Image tirée d'une fiche technique sur l'identification des microorganismes par spectrométrie de masse, de Rémi Moreda, Académie de Montpellier.

7.4.2 Antibiogrammes

La sensibilité aux antibiotiques des isolats bactériens collectés lors des différents projets a été testée par la technique de diffusion en gélose selon les recommandations du CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et de l'EUCAST (*European*

Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Les panels d'antibiotiques utilisés pour les entérobactéries et *P. aeruginosa* sont détaillés dans le Tableau 8. Chaque antibiogramme a été réalisé à partir d'une culture fraîche de bactéries incubée 24 h à $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Une suspension bactérienne a été ajustée à 0,5 McF (correspondant à environ 10^8 UFC/mL) dans de l'eau stérile à partir de colonies de même morphotype. Un écouvillon a ensuite été plongé dans la suspension bactérienne, l'excès de liquide a été éliminé puis la totalité de la gélose a été écouvillonnée, dans trois sens différents. Les disques d'antibiotiques (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) ont ensuite été déposés à l'aide d'un distributeur. Les diamètres d'inhibition ont été mesurés après une incubation de 24 h à $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Les isolats bactériens ont été classés comme sensibles, intermédiaires ou résistants à chaque antibiotique selon les recommandations de l'EUCAST (https://eucast.org/clinical_breakpoints/).

Antibiotique(s)	Dose (μg)	Abréviation	Germes ciblés
Amoxicilline + Acide clavulanique	20/10	AMC30	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Amoxicilline	20	AMO20	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Triméthoprim + Sulfaméthoxazole	1,25/23,75	SXT25	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Céfotaxime	5	COX5	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Ticarcline + Acide clavulanique	75/10	TCC85	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Amikacine	30	AKN30	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Ticarcline	75	TIC75	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Céfalexine	30	CXN30	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Ertapénème	10	ETP10	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Ofloxacin	5	OFX5	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Céfoxitine	30	FOX30	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Tobramycine	10	TMN10	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Pipéracilline + Tazobactam	30/6	PTZ36	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Céfépime	30	FEP30	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Ceftazidime	10	CZD10	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Ciprofloxacine	5	CIP5	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Pipéracilline	30	PIL30	<i>P. aeruginosa</i>
Méropénème	10	MEM10	<i>P. aeruginosa</i>
Imipénème	10	IPM10	<i>P. aeruginosa</i>

Tableau 8. Liste des différents antibiotiques testés sur les trois espèces bactériennes.

7.4.3 Tests de synergies

La production de BLSE a été confirmée phénotypiquement par des tests de synergies par rapprochement de disques (RDD) comme recommandé par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, v2.0, septembre 2018). Les géloses ont été ensemencées de la même manière que pour les antibiogrammes. Les disques de céfotaxime 5

μg , de ceftazidime 10 μg et de céfépime 30 μg (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) ont été déposés à 30 mm du disque d'amoxicilline – acide clavulanique 20/10 μg (AMC30) et un disque de céfotaxime 5 μg a été déposé à 20 mm du disque d'AMC30. Les géloses ont ensuite été incubées 24 h à $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Un résultat positif (production d'une BLSE par la bactérie) est indiqué par un motif dit « en bouchon de champagne » autour d'un ou de plusieurs disques de céphalosporines. Dans cette zone, l'acide clavulanique inhibe l'activité de la BLSE et permet à la céphalosporine de retrouver son activité.

7.5 Techniques de biologie moléculaire

7.5.1 Extractions d'ADN

Les isolats bactériens ont été décongelés sur géloses MH (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et incubés à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ sur la nuit. Afin d'exclure les potentielles contaminations, les isolats ont été à nouveau identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF avant extraction. Les échantillons d'ADN séquencés en WGS ont été extraits à l'aide des kits *QIAamp DNA Minikit* et *DNeasy UltraClean Microbial Kit* (Qiagen, Hilden, Allemagne) en suivant les recommandations du fabricant. Avant d'être amplifié par PCR, l'ADN bactérien a été extrait par boiling³⁴⁷.

7.5.2 PCR et amorces

L'ADN a été amplifié par PCR sur un thermocycleur C1000 *Touch* (Bio-Rad, Hercules, Californie, États-Unis). Les mix réactionnels ont été préparés à l'aide du kit Multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) en suivant les recommandations du fabricant. Le programme commence par une dénaturation des brins d'ADN (95°C , 10 min); suivie de 30 cycles composés de : dénaturation (95°C , 15 s), hybridation des amorces (température variant en fonction des amorces, 15 s), élongation de l'ADN (72°C , 30 s – 1 min); puis une étape d'élongation finale (72°C , 5 min).

Les amorces utilisées et leurs températures d'hybridation sont détaillées dans le Tableau 9.

Amorce	Séquence (5' - 3')	Cible(s)	Taille du produit (pb)	Référence
Détermination des phylogroupes d'<i>E. coli</i>				
AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	<i>arpA</i>	400	Clermont et al., 2013 ¹⁰⁶
ArpA1.r	TCTCCCATAACCGTACGCTA			Clermont et al., 2004 ³⁴⁸
chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	<i>chuA</i>	288	Clermont et al., 2013
chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			Clermont et al., 2000 ³⁴⁹
yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG	<i>yjaA</i>	211	Clermont et al., 2013
yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG			Clermont et al., 2013
TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	TspE4.C2	152	Clermont et al., 2013
TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC			Clermont et al., 2013
ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	<i>arpA</i>	301	Lescat et al., 2012 ³⁵⁰
ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATCCCAAGAG			Lescat et al., 2012
trpAgpC.1	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	<i>trpA</i>	219	Lescat et al., 2012
trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCACGCCC			Lescat et al., 2012
trpBA.f	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	<i>trpA</i>	489	Clermont et al., 2008 ³⁵¹
trpBA.r	GCAACGCGGCTGGCGGAAG			Clermont et al., 2008
ybgD.1	TATGCGGCTGATGAAGGATC	<i>ybgD</i>	177	Clermont et al., 2019 ¹⁰⁷
ybgD.2	GTTGACTAAGCGCAGGTCGA			Clermont et al., 2019
cfaB.1	CTAACGTTGATGCTGCTCTG	<i>cfaB</i>	384	Clermont et al., 2019
cfaB.2	TGCTAACTACGCCACGGTAG			Clermont et al., 2019
Identification des gènes <i>bla</i>_{BLSE}				
CTX-M1A	CTTCCAGAATAAGGAATC	<i>bla</i> _{CTX-M} groupe 1	907	Bonnet et al., 2001 ³⁵²
CTX-M1B	CCGTTTCCGCTATTACAA			Bonnet et al., 2001
CTX-M2A	TGACTCAGAGCATTSGCCGCT	<i>bla</i> _{CTX-M} groupe 2	864	Bonnet et al., 2001
CTX-M2B	CGYGGGTTACGATTTTCGCGYGC			Bonnet et al., 2001
CTX-M9A	TGGTGACAAAGAGARTGCAACGG	<i>bla</i> _{CTX-M} groupe 9	873	Bonnet et al., 2001
CTX-M9B	ACAGCCCYTYGGCGATGATTCT			Bonnet et al., 2001
OS-5	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	<i>bla</i> _{SHV}	785	Cao et al., 2002 ³⁵³
OS-6	GATTTGCTGATTTGCTCGG			Cao et al., 2002
TEM-A	ATAAAATTCTTGAAGAC	<i>bla</i> _{TEM}	1076	Mabilat et al., 1990 ³⁵⁴
TEM-B	TTACCAATGCTTAATCA			Mabilat et al., 1990
MLST <i>E. coli</i>				
adk-P1	ATTCTGCTTGGCGCTCCGG	<i>adk</i>	583	Wirth et al., 2006 ⁵⁰
adk-P2	CCGTCAACTTTCGCGTATT			Wirth et al., 2006
fumC-P1	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	<i>fumC</i>	806	Wirth et al., 2006
fumC-P2	GTACGCAGCGAAAAAGATTC			Wirth et al., 2006
gyrB-P1	TCGGCGACACGGATGACGGC	<i>gyrB</i>	911	Wirth et al., 2006
gyrB-P2	ATCAGGCCTTCACGCGCATC			Wirth et al., 2006
icd-P1	ATGGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCAC	<i>icd</i>	878	Wirth et al., 2006
icd-P2	GGACGCAGCAGGATCTGTT			Wirth et al., 2006
mdh-P1	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCG	<i>mdh</i>	932	Wirth et al., 2006
mdh-P2	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTC			Wirth et al., 2006
purA-P1	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	<i>purA</i>	816	Wirth et al., 2006
purA-P2	CATACGGTAAGCCACGCAGA			Wirth et al., 2006
recA-P1	CGCATTTCGCTTTACCCTGACC	<i>recA</i>	780	Wirth et al., 2006
recA-P2	TCTCGATCAGCTTCTCTTT			Wirth et al., 2006

Tableau 9. Liste des amorces utilisées lors des différents projets.

7.5.3 Détermination des phylogroupes *d'E. coli*

La méthode de Clermont^{106,107} a permis d'assigner les isolats d'*E. coli* à un des huit phylogroupes existants (A, B1, B2, C, D, E, F ou G). Les phylogroupes ont été déterminés en fonction de la présence/absence de quatre gènes (*arpA*, *chuA*, *yjaA*, et TspE4.C2) identifiés par PCR quadruplex. Les isolats avec des profils identiques ont été discriminés par des PCRs additionnelles. Le gène *trpA* a été amplifié par une PCR spécifique de l'allèle du groupe C pour différencier les isolats appartenant aux phylogroupes A et C. Le gène *arpA* a été amplifié par une PCR spécifique de l'allèle du groupe E pour différencier les isolats appartenant aux phylogroupes D et E. Enfin, les gènes *cfab* (spécifique du phylogroupe F) et *ybgD* (spécifique du phylogroupe G) ont permis de différencier les isolats appartenant aux phylogroupes B2, F et G. Des profils particuliers ont permis de différencier *E. coli* et *Escherichia cryptic clades*.

7.5.4 Identification des gènes *bla_{BLSE}*

Les gènes *bla_{BLSE}* ont été identifiés par PCR et séquençage. Les gènes *bla_{CTX-M-groupe 1}*, *bla_{CTX-M-groupe 9}*, *bla_{CTX-M-groupe 2}* ont été amplifiés par des PCRs spécifiques³⁵². Chez les isolats *bla_{CTX-M}* négatifs, les gènes *bla_{SHV}*³⁵³ et *bla_{TEM}*³⁵⁴ ont été recherchés par PCR. Après amplification, les produits de PCR ont été purifiés par précipitation à l'éthanol puis les séquences nucléotidiques de tous les isolats ont été déterminées par séquençage selon la méthode de Sanger.

7.5.5 Vérification et purification des produits PCR

Chaque produit de PCR a été déposé dans un gel d'agarose 1,5% et une migration (100 V, 1 h) a été effectuée. Le gel d'agarose a ensuite été placé 15 min dans le BET puis révélé aux UV. Les produits de PCR devant être séquencés par la méthode de Sanger ont été purifiés par précipitation à l'éthanol. Quarante µL de produit PCR mélangés à 100 µL d'éthanol 96% et 4 µL d'acétate de sodium (3M). Le mélange a ensuite été placé pendant au moins 1 h à -80°C puis centrifugé (16000 g, 4°C) 30 min. Le surnageant a ensuite été éliminé, 200 µL d'éthanol 70% ont été ajoutés et le mélange a été centrifugé (16000 g, 4°C) pendant 15 min. Le surnageant a de nouveau été éliminé et le culot a été séché puis re-suspendu dans 100 µL d'eau stérile.

7.5.6 Séquençage par la méthode de Sanger

Le séquençage de nos échantillons a été effectué par les techniciens du Plateau de Biologie Moléculaire du pôle PC-BIO du CHU de Besançon. L'ADN a été amplifié avec le kit *BigDye*

Terminator v3.1 (Fisher Scientific, Illkirch, France) en suivant les recommandations du fabricant. Les amplicons ont ensuite été purifiés à l'aide du kit de purification d'ADN NucleoSEQ (Macherey-Nagel, Hoerd, France) en suivant les recommandations du fabricant puis lus sur un séquenceur RUO Applied Biosystems 3500 (Fisher Scientific, Illkirch, France). La technique consiste à amplifier la séquence d'intérêt en préparant un milieu réactionnel contenant une seule amorce (sens ou antisens) et des ddNTPs marqués par fluorescence en plus des dNTPs classiques. L'incorporation d'un ddNTP va stopper la polymérisation du brin d'ADN. Ainsi, des fragments d'ADN de toutes les tailles se terminant par un ddNTP seront générés. Les fragments vont ensuite être séparés par électrophorèse capillaire et passer devant un laser devant lequel les ddNTPs vont émettre une fluorescence. Le séquenceur va reconnaître la fluorescence spécifique à chaque nucléotide et ainsi déterminer l'enchaînement des nucléotides qui composent la séquence d'ADN³⁵⁵.

7.5.7 Séquençage Illumina

Les génomes des isolats de *P. aeruginosa* ont été séquencés par le centre de génomique de l'Université du Minnesota (<https://genomics.umn.edu/>) aux Etats-Unis. Les isolats d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* ont été séquencés par le laboratoire de microbiologie médicale et d'hygiène de l'hôpital universitaire de Tübingen en Allemagne. Dans les deux cas, les bibliothèques ont été préparées avec le kit *Nextera DNA Library Preparation Kit* (Illumina, San Diego, CA, USA). Les génomes ont ensuite été séquencés sur une plateforme Illumina NextSeq (*E. coli* et *K. pneumoniae*) ou sur une plateforme Illumina NovaSeq 6000 (*P. aeruginosa*), générant dans les deux cas des *reads paired-end* de 150 pb.

7.6 Traitement des données de séquençage

7.6.1 Gènes associés à la résistance

Les séquences générées par la méthode de Sanger ont été analysées avec le logiciel Geneious R11 11.1.5 (Biomatters, Auckland, Nouvelle-Zélande). Les séquences des gènes associés à la résistance bactérienne ont été comparées aux séquences de référence téléchargées sur NCBI en utilisant l'outil d'alignement de Geneious (*pairwise/multiple align*).

Pour les génomes séquencés entièrement, les gènes associés aux résistances chromosomiques ou acquises ont été identifiés à l'aide de ResFinder v3.1 ou v4.0³⁵⁶.

7.6.2 MLST

Pour les isolats d'*E. coli* collectés lors de l'étude de la contamination des zones humides, les STs ont été déterminés en utilisant le schéma MLST existant⁵⁰. Les séquences générées par la méthode de Sanger ont été comparées aux séquences des gènes de ménage disponibles sur Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>). Afin d'analyser la distribution des STs récupérés dans les zones humides et leurs rivières associées, les sept allèles de 4195 STs ont été extraits d'Enterobase et concaténés. Les 4195 STs ont ensuite été comparés en construisant un arbre phylogénétique à l'aide de FastTree v2.1³⁵⁷ basé sur un modèle GTR. Les sous-arbres phylogénétiques contenant uniquement les isolats de phylogroupes B2 et D ont ensuite été extraits à l'aide du package ggtree^{358,359}. Les STs retrouvés en clinique ou dans des eaux usées de STEU ont été extraits de résultats publiés^{149,312,360}. Nous avons comparé leur distribution sur les arbres phylogénétiques à celle des isolats retrouvés dans les trois plaines alluviales. Pour les génomes d'*E. coli*, de *K. pneumoniae* et de *P. aeruginosa* séquencés entièrement, les STs ont été déterminés par MLST *in silico*³⁶¹.

7.6.3 Détermination des phylogroupes d'*E. coli in silico*

Les phylogroupes d'*E. coli* ont été déterminés *in silico* en utilisant un programme basé sur la méthode PCR de Clermont³⁶². A partir de données assemblées (contigs), une PCR *in silico* est réalisée et le phylogroupe est déterminé en fonction des fragments d'ADN amplifiés.

7.6.4 Assemblage *de novo*

Les bordures des séquences brutes ont été coupées avec Trimmomatic v0.35³⁶³, en gardant un minimum de 80 pb et assemblées *de novo* avec SPAdes v3.13.0³⁶⁴.

7.6.5 Phylogénie

Les *core genome* d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* ont été définis en utilisant des schémas du serveur de nomenclature cgMLST (<https://www.cgmlst.org/ncs>) et nous avons utilisé pyMLST (<https://github.com/bvalot/pyMLST>) pour l'analyse de cgMLST. Les gènes présents dans au moins 95% des isolats ont été alignés. Pour *E. coli*, un arbre BioNJ basé sur les différences des gènes du *core genome* a été construit avec SplitsTree5³⁶⁵ avec un modèle de calcul des distances HKY85. Pour *K. pneumoniae* un arbre de maximum de vraisemblance a été construit avec un modèle GTR en utilisant FastTree 2.1³⁵⁷. Un réseau a ensuite été construit avec le package

igraph³⁶⁶ sur R 3.6.2 pour relier les isolats d'*E. coli* dont les génomes avaient <10 gènes du *core genome* différents.

Le *core genome* de *P. aeruginosa* a été déterminé avec Spine³⁶⁷. Les séquences de phages ont été recherchées avec phaster.ca et supprimées pour l'analyse du *core genome*. Les appels de variants ont été effectués à l'aide de GATK v.3.2-2³⁶⁸ et de SAMtools v.0.1.19³⁶⁹. Des arbres de maximum de vraisemblance ont été construits avec RAxML v.8.2.6³⁷⁰ avec un modèle GTR. Nous avons visualisé et annoté les arbres phylogénétiques avec iTOL v5³⁷¹.

7.6.6 Plasmides

Les groupes d'incompatibilité (Inc) plasmidique des plasmides présents dans les génomes d'*E. coli* ont été identifiés avec PlasmidFinder²⁹⁵. Cet outil compare les séquences brutes ou assemblées des génomes d'intérêt à sa base de données contenant les séquences des réplicons plasmidiques connus en utilisant BLAST.

Nous avons ensuite utilisés mlplasmids³²¹ pour déterminer si les contigs portant les gènes *bla*_{BLSE} étaient portés par des plasmides ou par le chromosome. Mlplasmids classifie les contigs comme chromosomiques ou plasmidiques en se basant sur les profils de *k*-mer des chromosomes et des plasmides, qui sont généralement différents. Cet outil a été mis au point par apprentissage automatique en utilisant des séquences d'origines connues (plasmidiques ou chromosomiques).

8. TRAVAUX COMPLEMENTAIRES

8.1 Typage rapide de bacilles à Gram-négatif responsables d'épidémies hospitalières par spectroscopie FTIR

8.1.1 Résumé

Le typage des pathogènes bactériens épidémiques dans les hôpitaux repose sur des techniques basées sur l'ADN, souvent longues et coûteuses, réalisées en rétrospectif. L'identification rapide des pathogènes épidémiques dans la routine des laboratoires de microbiologie accélérerait les procédures de contrôle des infections qui limitent la contamination des nouveaux patients. L'IR-Biotyper (Bruker Daltonics GmbH) est un nouvel appareil de typage basé sur la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) qui génère des spectres, visant à typer les micro-organismes en 3 heures. Cette technique discrimine les isolats en explorant les différences des polysaccharides à la surface des cellules. Dans ce travail, nous avons évalué la capacité de la spectroscopie FTIR à reconnaître les clones de bacilles à Gram négatif responsables des épidémies hospitalières. Des isolats de *P. aeruginosa* (n = 100), *K. pneumoniae* (n = 16), *E. cloacae* (n = 23) et *A. baumannii* (n = 20) ont été typés par MLST, par PFGE, et par spectroscopie FTIR. La congruence des résultats de spectroscopie FTIR a été comparée à celle de la MLST et du PFGE en calculant l'indice de Rand ajusté et le coefficient de Wallace ajusté. Nous avons constaté que la spectroscopie FTIR regroupait avec précision les isolats de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *E. cloacae* appartenant aux mêmes STs. Les performances de la spectroscopie FTIR était légèrement inférieure pour *A. baumannii*. De plus, la spectroscopie FTIR regroupait correctement les isolats de *P. aeruginosa* appartenant au même pulsotype. Dans l'ensemble, l'IR-Biotyper peut rapidement (en moins de 3 h) détecter la propagation des clones de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, et *A. baumannii*. L'utilisation de cette technique par les laboratoires de microbiologie clinique peut aider à lutter contre la propagation des clones épidémiques par la mise place rapide de mesures pour contrôler les infections.



Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy Can Quickly Type Gram-Negative Bacilli Responsible for Hospital Outbreaks

Daniel Martak^{1,2}, Benoît Valot², Marlène Sauget^{1,2,3}, Pascal Cholley^{1,2}, Michelle Thouverez^{1,2}, Xavier Bertrand^{1,2} and Didier Hocquet^{1,2,3*}

¹ Laboratoire d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France, ² UMR 6249, Laboratoire Chrono-Environnement, Centre National de la Recherche Scientifique-Université de Franche-Comté, Besançon, France, ³ Centre de Ressources Biologiques – Filière Microbiologique de Besançon, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Bing Gu,
Xuzhou Medical University, China

Reviewed by:

M. Oves,
King Abdulaziz University,
Saudi Arabia
Matthieu Eveillard,
Université d'Angers, France

*Correspondence:

Didier Hocquet
dhocquet@chu-besancon.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 22 February 2019

Accepted: 07 June 2019

Published: 26 June 2019

Citation:

Martak D, Valot B, Sauget M,
Cholley P, Thouverez M, Bertrand X
and Hocquet D (2019)
Fourier-Transform InfraRed
Spectroscopy Can Quickly Type
Gram-Negative Bacilli Responsible
for Hospital Outbreaks.
Front. Microbiol. 10:1440.
doi: 10.3389/fmicb.2019.01440

The typing of epidemic bacterial pathogens in hospitals relies on DNA-based, expensive, and time-consuming techniques, that are often limited to retrospective studies. However, the quick identification of epidemic pathogens in the routine of the microbiology laboratories would expedite infection control procedures that limit the contamination of new patients. IR Biotyper (Bruker Daltonics GmbH) is a new typing machine based on Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy which generates spectra, aiming at typing the micro-organisms within 3 h. This technique discriminates the isolates by exploring the differences of the surface cell polysaccharides. In this work, we evaluated the ability of the FTIR spectroscopy to recognize Gram-negative bacilli clones responsible for hospital outbreaks. Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 100$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 16$), *Enterobacter cloacae* ($n = 23$), and *Acinetobacter baumannii* ($n = 20$) were typed by the reference methods Multi-Locus Sequence Typing (defining sequence types – STs) along with or without pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (defining pulsotypes), and by FTIR spectroscopy. The congruence of FTIR spectroscopy clustering was compared to those of MLST and PFGE by Adjusted Rand index and Adjusted Wallace coefficient. We found that FTIR spectroscopy accurately clustered *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, and *E. cloacae* isolates belonging to the same ST. The performance of the FTIR spectroscopy was slightly lower for *A. baumannii*. Furthermore, FTIR spectroscopy also correctly clustered *P. aeruginosa* isolates having a similar pulsotype. Overall, the IR Biotyper can quickly (in less than 3 h) detect the spread of clones of *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, and *A. baumannii*. The use of this technique by clinical microbiology laboratories may help to tackle the spread of epidemic clones by the quick implementation of infection control measures.

Keywords: Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR, Gram-negative bacilli, hospital outbreak, bacterial typing

INTRODUCTION

Gram-negative bacilli are involved in the four most frequent healthcare-associated infections (i.e., urinary tract infections, surgical site infections, pneumonias, and bloodstream infections) (Peleg and Hooper, 2010). Among these bacterial species, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Acinetobacter baumannii* often acquire antibiotic resistance mechanisms allowing them to tackle the last generation treatments (Friedman et al., 2016). Infection control aims at limiting the spread of multidrug-resistant bacterial strains. Such outbreaks could be controlled with reinforced hygiene control measures that are quickly implemented after early detection of cross-transmissions (Woodford et al., 2011).

The quick detection of pathogen cross-transmissions in healthcare settings remains challenging despite the large choice of molecular typing methods available. Hence, multilocus sequence typing (MLST) defines sequence types (STs) by the combination of the alleles of fragments of seven housekeeping genes (Jolley and Maiden, 2014; Kimura, 2018). Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has successfully typed several bacterial subgroups (Siegrist et al., 2007; Berrazeg et al., 2013; Novais et al., 2014; Sauget et al., 2014; Cabrolier et al., 2015; Sousa et al., 2015) but its lack of robustness and the absence of a user-friendly software make it difficult to use routinely (Sauget et al., 2017). The highly discriminating whole genome sequencing (WGS) is becoming the new gold standard (Bertelli and Greub, 2013). However, Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), which clusters the isolates at the clonal level after macrorestriction of the total DNA (Talon et al., 1996), has been used for decades and is still used to investigate local outbreaks. These highly accurate techniques are laborious, time consuming and require trained staff. Hence, a quick and reliable typing technique that detects pathogen cross-transmissions in the routine of the clinical microbiology laboratory is still needed.

Fourier-Transform Infrared (FTIR) spectroscopy generates spectra based on the absorption of the infrared light by the different chemical components (i.e., lipids, proteins, or polysaccharides) of the whole bacterial cell. The absorption will be different depending on the components of the cell. The high variability of the surface cell makes the polysaccharide region (1300–800 cm^{-1}) dominated by carbohydrates interesting for FTIR spectroscopy investigations. FTIR spectroscopy can identify species from the genus *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, and *Klebsiella* (Quintelas et al., 2018). FTIR spectroscopy has also been used to type pathogens such as *Listeria monocytogenes* (Rebuffo-Scheer et al., 2007), *Staphylococcus aureus* (Johler et al., 2016), *Yersinia enterocolitica* (Kuhm et al., 2009), *Escherichia coli* (Dawson et al., 2014), or *K. pneumoniae* (Dinkelacker et al., 2018). However, this technique only started being implemented in microbiology laboratories recently (Novais et al., 2018).

In this work, we determined the discriminatory power of a marketed FTIR spectroscopy machine, using MLST and PFGE as typing references. We focused our study on Gram negative pathogens frequently involved in hospital outbreaks (i.e., *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, and *A. baumannii*).

We also tested the benefit of the machine in the routine of the microbiology laboratories by simulating a prospective study.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Isolates

We used 159 clinical isolates of *P. aeruginosa* ($n = 100$), *K. pneumoniae* ($n = 16$), *E. cloacae* ($n = 23$), and *A. baumannii* ($n = 20$) (Supplementary Table 1). The isolates were retrieved from outbreaks that occurred in hospitals from 11 French cities and are completed by outgroup isolates. All isolates were identified by MALDI-TOF MS (Microflex LT; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) with a log value ≥ 2 according to the manufacturer's recommendations and stored at -80°C at the Centre de Ressources Biologiques – Filière Microbiologique at the University Hospital of Besançon (Biobank BB-0033-00090) until further analysis.

Molecular Genotyping

All isolates were typed by MLST using previously described schemes (Curran et al., 2004; Diancourt et al., 2005, 2010; Brisse et al., 2009; Miyoshi-Akiyama et al., 2013) (Supplementary Table 1). Of note, we used MLST 'Pasteur' scheme for *A. baumannii* typing. Although MALDI-TOF MS hardly differentiates *A. baumannii* from *A. pittii* or *A. nosocomialis*, the typeability of these isolates by *A. baumannii*-specific MLST scheme confirmed the identification of the isolates of our collection. In addition, 80 isolates of *P. aeruginosa* were genotyped by PFGE (CHEF DRIII, Bio-Rad) after total DNA restriction with *DraI* (Roche Diagnostics) (Slekovec et al., 2012). We used Bionumerics software (Applied Math, Kortrijk, Belgium) to calculate a DNA similitude matrix based on Dice coefficient for pairwise isolate comparisons. The dendrogram was built with the UPGMA (unweighted pair group using arithmetic averages) hierarchical algorithm. *S. aureus* NCTC 8325 strain was the reference for inter-experiment comparison. The pulsotypes were determined according to international recommendations (Tenover et al., 1995).

Sample Preparation for FTIR Spectroscopy Analysis

The samples were prepared in a room where temperature was $24 \pm 1.5^\circ\text{C}$ and hygrometry was $46 \pm 8\%$. Bacterial isolates were cultured on Mueller-Hinton agar (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) for 24 ± 1 h at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ and a loopful of bacterial cells was suspended in 50 μL of ethanol. Suspensions were mixed before addition of 50 μL of water. The suspensions were homogenized and 15 μL of each suspension were dropped in triplicate on a silicon plate (Bruker Optics-Daltonics GmbH) and dried for 25 ± 5 min at $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Spectra Acquisition, Processing, and Analysis

Spectra were recorded in transmission mode in a spectral range of 4,000–400 cm^{-1} (mid-IR) using an IR spectrometer (Bruker

Optics-Daltonics GmbH). Spectra were acquired, visualized, and processed by OPUS v7.5 software (Bruker Optics GmbH). Data from the area of polysaccharides ($1,300\text{--}800\text{ cm}^{-1}$) were vector normalized, and the second derivative was used to amplify differences between isolates. IR Biotyper Client Software v1.5 (Bruker Daltonik GmbH) built dendrograms using Euclidian distance and average linkage clustering method.

Clustering Concordance

The clusters obtained by MLST or PFGE were compared with those obtained by IR Biotyper with Adjusted Rand index (AR) and Adjusted Wallace coefficient (AW) with 95% confidence intervals (CI) (Carriço et al., 2006). AR compares partitions with no consideration for the reference method and evaluates the congruence between two typing methods. In comparison, AW takes into account inter-cluster distances and assesses the directional agreement between typing methods (Carriço et al., 2006; Pinto et al., 2008; Severiano et al., 2011). In other words, AR and AW equal to 1 reflect a perfect correlation between the two typing methods. The optimal cut-offs of each species was defined by maximizing AR between MLST and FTIR results.

Simulating a Prospective Study

To evaluate the FTIR spectroscopy in the routine of microbiology laboratories, we simulated a prospective study over 2 weeks. A total of 80 isolates of *P. aeruginosa* were analyzed. Sixty-one were retrieved from 13 independent outbreaks in four cities, and 19 non-epidemic isolates were used as outgroups. In order to simulate the daily work of a clinical laboratory, epidemic isolates (i.e., from the same ST and sharing the same pulsotype) were analyzed by FTIR spectroscopy in independent experiments ran on eight different days (Table 1).

Reproducibility

Since FTIR spectroscopy techniques are known to be very sensible to variations in culture media, incubation time, temperature, and hygrometry, we assessed the reproducibility of the technique by analyzing 20 isolates of *P. aeruginosa* four times independently on separate days (Dec. 8th, 2017; May 4th, 9th, and 15th, 2018).

RESULTS

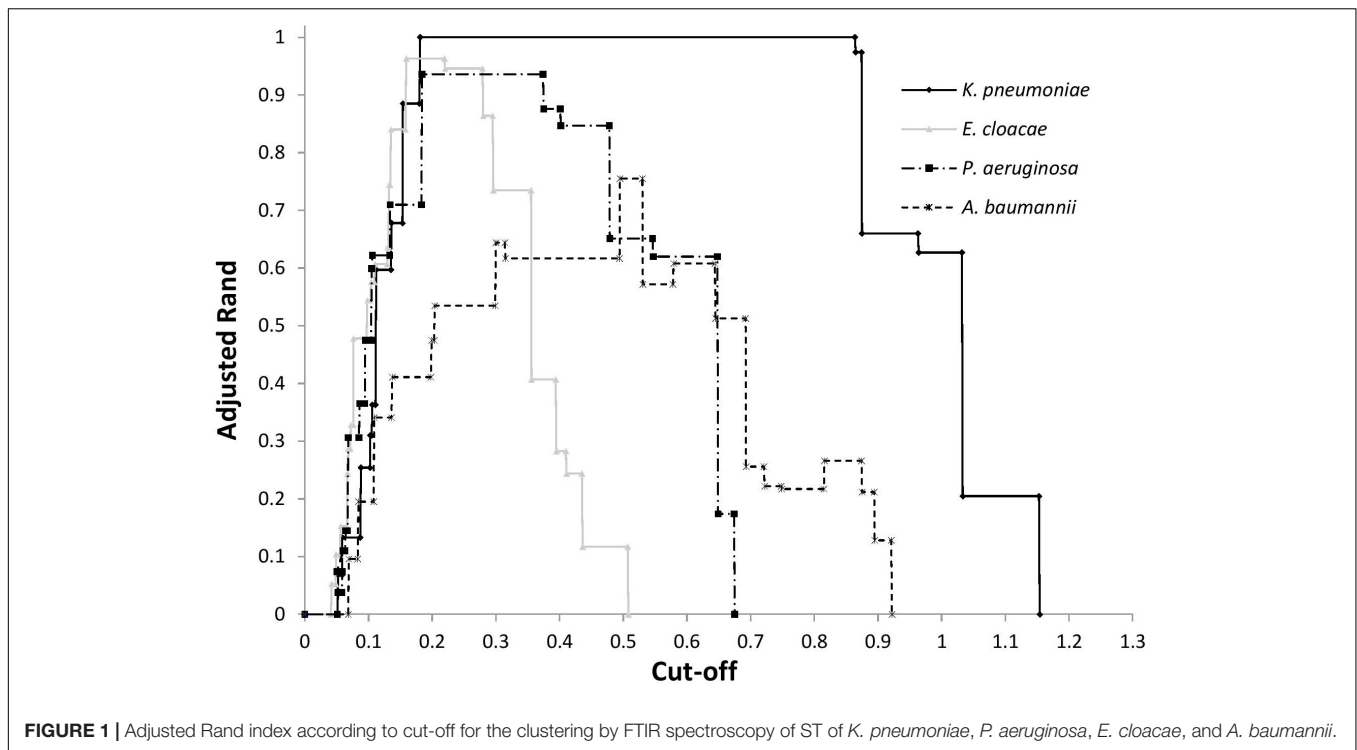
Microbial Typing

After FTIR spectra acquisition, dendrograms were built for each species. To assess the concordance between typings with MLST and FTIR spectroscopy, AR was calculated at different cut-off of clustering (Figure 1). For *K. pneumoniae*, the optimal cut-off ranged from 0.181 to 0.864 with perfect clustering (AR, 1.000) of the six different STs (Figure 2A). FTIR spectroscopy distributed the 16 isolates in six clusters corresponding to six different STs. For *P. aeruginosa*, the optimal cut-off varied from 0.184 to 0.374 (AR, 0.936) with one misclassified ST395 isolate (Figure 2B). The optimal cut-off for *E. cloacae* ranged from 0.159 to 0.219 (AR, 0.963) with two misclassified isolates (Figure 2C). For *A. baumannii*, the optimal cut-off ranged from 0.495 to 0.530

TABLE 1 | Temporal distribution of the isolates of *P. aeruginosa* typed by FTIR spectroscopy during 8 days.

Pulsotype (ST)	<i>P. aeruginosa</i> isolates analyzed							
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
A (ST308)		A1				A2	A3	A4, A5
B (ST175)	B1		B2		B3, B4			B5
C (ST395)	C1	C2, C3				C4		C5
D (ST244)	D1		D2, D3		D4			
E (ST708)					E1, E2	E3	E4	E5
F (ST560)	F1			F2	F3	F4, F5		
G (ST274)				G1, G2	G3		G4	G5
H (ST679)			H1, H2	H3			H5	
I (ST111)		I1	I2				I3, I4	
J (ST207)		J1						
K (ST175)		K1		K2				
L (ST233)		L2, L3				J3	L5, L6	
M (ST235)	M1, M2		M3	M4		L4		
Outgroups	O1, O2, O3	O4, O5	O6, O7, O8	O9, O10, O11	O12, O13	O14, O15	O16, O17	O18, O19

The isolates of the different pulsotypes were typed on different days to simulate the reality of the clinical laboratory. For ease of reading, each pulsotype (A to M) was assigned with a different color (retrieved in Figure 3). Outgroups are numbered from O1 to O19.



with a lower global concordance with MLST (AR, 0.755) for which three isolates were misclassified (**Figure 2D**). Hence, one ST2 isolate did not cluster with the other ST2 isolates and one ST1253 isolate clustered with a ST253 isolate.

Then, we evaluated the capacity of FTIR spectroscopy to detect a given ST type and vice versa by calculating AW (**Table 2**). For *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *E. cloacae*, the AW of 1.000 indicated that two isolates clustered by FTIR spectroscopy always belonged to the same ST. The inverse was not true for *P. aeruginosa* and *E. cloacae* with the AW of 0.929 and 0.879, respectively. For *A. baumannii*, the concordance is lower than for other species. Hence, two isolates clustered by FTIR spectroscopy were most probably of the same ST (AW, 0.915) but the inverse is clearly not true with an AW of 0.642.

Reproducibility

To assess the reproducibility of the FTIR spectroscopy, 20 isolates of *P. aeruginosa* were typed four times independently on separate days. The dendrograms built from these four independent experiments showed the same clustering (AR, 0.936) than that obtained for evaluation of microbial typing (**Figure 2B**), with only one ST395 isolate misclassified. These results indicate a good reproducibility of FTIR spectroscopy analysis.

Robustness and Adaptation to the Clinical Lab Routine

To assess the ability of the FTIR spectroscopy to detect cross-transmissions of Gram-negative bacilli in the daily work of a clinical laboratory, 61 isolates of *P. aeruginosa* from 13 outbreaks were tested together with 19 outgroup isolates over 8 days

(**Table 1**). Optimal cut-off was determined by calculating AR for all clusters. **Figure 3** shows that FTIR spectroscopy adequately clustered the isolates of seven outbreaks (F-ST560, G-ST274, H-ST679, I-ST111, J-ST207, K-ST175, and L-ST233). For four other outbreaks (C-ST395, D-ST244, E-ST708, and M-ST235), one isolate was misclassified. For the outbreak B-ST175, two isolates were misclassified. The five isolates retrieved from the outbreak A-ST308 scattered throughout the FTIR dendrogram. Overall, the optimal cut-off for the clustering of epidemic *P. aeruginosa* isolates was 0.189 (AR, 0.824). This optimal cut-off was used to calculate AW, which indicated that two isolates clustered by FTIR spectroscopy were most probably from the same outbreak (AW, 0.965) while the opposite was less true (AW, 0.719).

DISCUSSION

Discriminatory Power

We assessed here the discriminatory power of FTIR spectroscopy by typing four Gram-negative bacterial species implicated in hospital outbreaks. Overall, the discriminatory power of the FTIR spectroscopy is high for three of the four Gram-negative species tested (*E. cloacae*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa*), in agreement with other studies on other *Enterobacteriaceae* such as *Escherichia coli* (Davis et al., 2012; Sousa et al., 2013), *Klebsiella oxytoca* (Dieckmann et al., 2016), and *Yersinia enterocolitica* (Kuhm et al., 2009). We found that FTIR spectroscopy can type isolates of Gram-negative bacilli responsible for hospital outbreaks in 3 h. This contrasts with the current reference

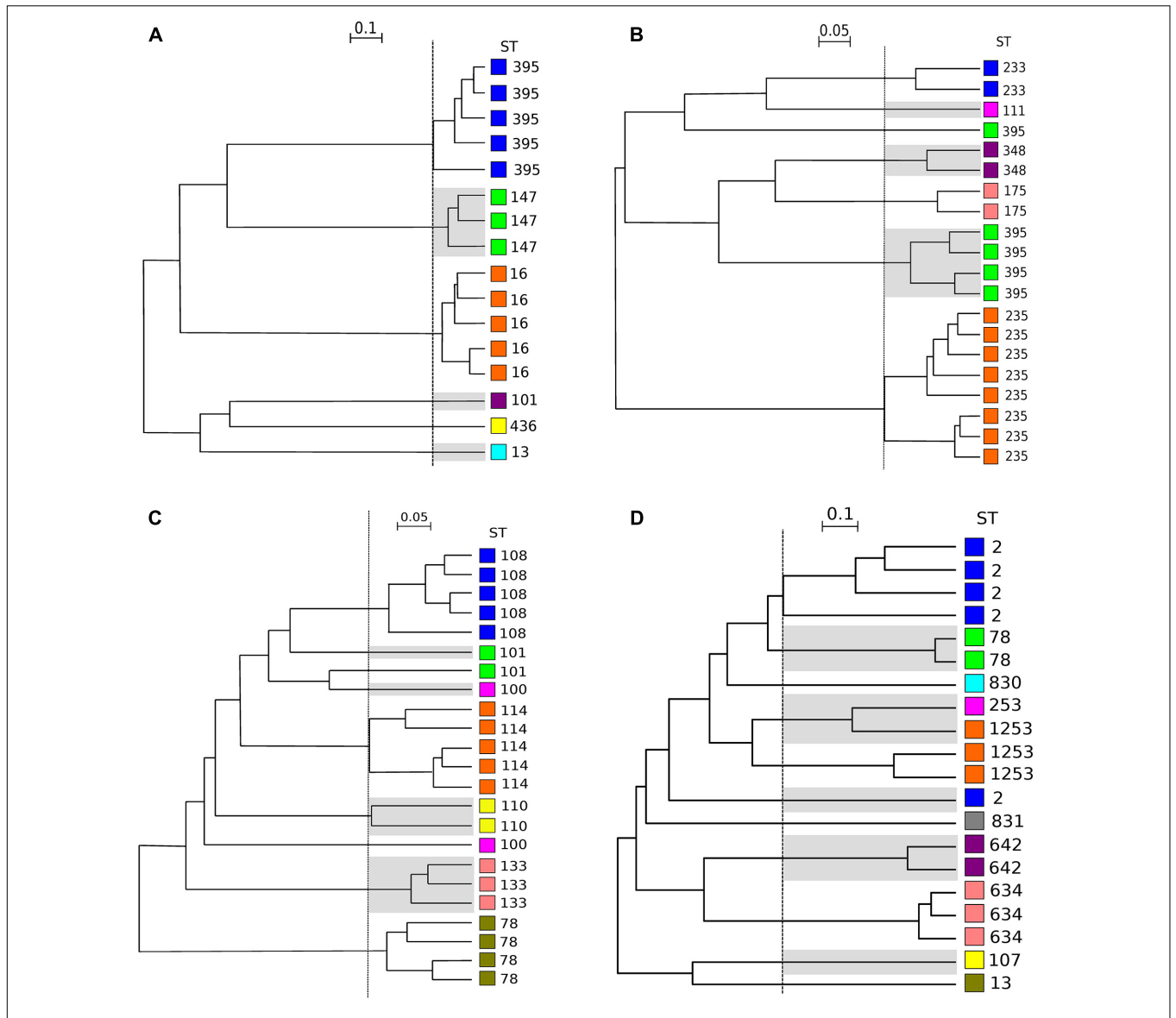


FIGURE 2 | Dendrograms obtained by clustering FTIR spectra for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *A. baumannii*. The vertical dashed lines represent the cut-off values. **(A)** Clustering obtained for 16 isolates of *K. pneumoniae* (cut-off, 0.220). **(B)** Clusters obtained for 20 isolates of *P. aeruginosa* (cut-off, 0.221). **(C)** Clusters obtained for 23 isolates of *E. cloacae* (cut-off, 0.159). **(D)** Clusters obtained for 20 isolates of *A. baumannii* (cut-off, 0.495). ST is given for each isolate. For ease of reading, one out of two clusters are shaded and each ST was assigned with a different color (independent from those of **Figure 3** and **Table 1**).

TABLE 2 | Adjusted Rand (AR) and Adjusted Wallace (AW) coefficients with 95% CI calculated to compare FTIR spectroscopy (IRBT, Bruker Optics, Germany) and MLST for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, and *A. baumannii*.

Species	Adjusted Rand	Typing method	Adjusted Wallace coefficients (95% CI) when compared with	
			FTIR	MLST
<i>P. aeruginosa</i>	0.936	FTIR		1.000 (1.000–1.000)
		MLST	0.879 (0.735–1.000)	
<i>K. pneumoniae</i>	1.000	FTIR		1.000 (1.000–1.000)
		MLST	1.000 (1.000–1.000)	
<i>E. cloacae</i>	0.963	FTIR		1.000 (1.000–1.000)
		MLST	0.929 (0.878–0.979)	
<i>A. baumannii</i>	0.755	FTIR		0.915 (0.830–1.000)
		MLST	0.642 (0.338–0.947)	

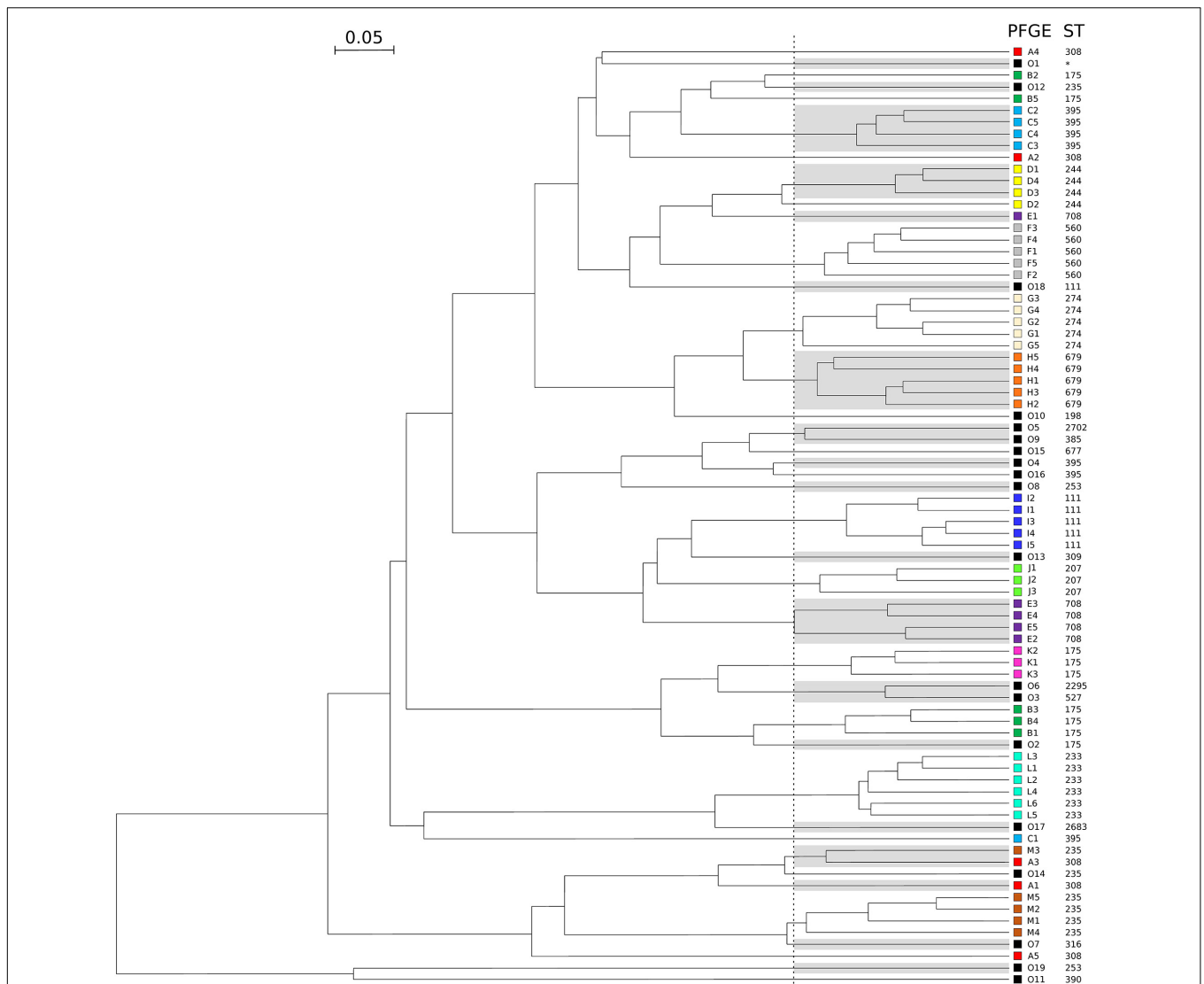


FIGURE 3 | Dendrogram obtained by clustering the FTIR spectra of 80 isolates of *P. aeruginosa* during a simulated prospective study. The vertical dashed line represents the cut-off value. Pulsotypes and ST are given for each isolate. For ease of reading, one out of two clusters are shaded and each pulsotype was assigned with a different color (same than in **Table 1**). Outgroups are numbered from O1 to O19 and colored in black. The star indicates a ST not determined.

methods (i.e., MLST and PFGE) that require time and highly trained staff.

The results were compared to MLST and PFGE, two reference methods (Li et al., 2009; Larsen et al., 2012) for bacterial typing, by calculating AR and AW. FTIR spectroscopy correctly clustered isolates from the same ST for *K. pneumoniae* (AR, 1.000), *E. cloacae* (AR, 0.946) and *P. aeruginosa* (AR, 0.936). The performance of the FTIR spectroscopy was slightly lower for *A. baumannii* (AR, 0.755).

Using AW, we demonstrated that two isolates clustered by FTIR spectroscopy most likely shared the same ST. For *K. pneumoniae*, our results confirmed the high discriminatory power of FTIR spectroscopy reported in a recent study in which the authors found a good correlation between the clustering

based on single nucleotide polymorphism and that based on FTIR spectroscopy (Dinkelacker et al., 2018).

Here, we report for the first time a high correlation for *E. cloacae* typing between FTIR spectroscopy and MLST, with only four isolates of two different STs which clustered separately, leading to a perfect AW but to a lower AR value (0.963) (**Figure 2C**).

Likewise, only one *P. aeruginosa* isolate was misclassified by FTIR spectroscopy. The genome of this isolate (namely DHS01) had undergone a 131-kb chromosomal deletion in comparison to those of the other isolates of the ST395 outbreak (**Figure 2B**; Petitjean et al., 2017). Such a large deletion, which encompasses genes involved in biofilm formation, virulence, adherence, and motility (Petitjean et al., 2017), could have modified the

FTIR spectrum of the isolate thus accounting for the isolate misclassification.

The usefulness of FTIR spectroscopy is less obvious for *A. baumannii*. Despite the good correlation between MLST and FTIR spectroscopy reported in the literature (Sousa et al., 2014), our results are a little bit less conclusive for this species than for the three other species tested. Since ST1253 is a single locus variant of ST2 (and consequently belongs to clonal complex CC2), we expected a clusterisation of isolates from these two STs, which were actually separate in the FTIR dendrogram. This presumably relies on the low discriminatory power of the Pasteur MLST scheme, which imperfectly reflects the high diversity of the CC2 (Graña-Miraglia and Castillo-Ramírez, 2019). To confirm the interest of FTIR spectroscopy in *A. baumannii* typing, FTIR spectroscopy has to be compared with more discriminant methods (i.e., WGS).

Optimal Cut-Off Determination

For each dendrograms, IR Biotyper software automatically calculated a cut-off, which is the product of the Simpson's index of diversity and the mean coherence of a parameter defined by the user (e.g., ST, pulsotype) (Hunter and Gaston, 1988). Since this cut-off was sub-optimal, we recalculated an optimal cut-off that provided the best AR. AR suitably determines the optimal cut-off since it compares the two typing methods without considering one as the reference (Hubert and Arabie, 1985). Unfortunately, we could not define a unique suitable cut-off for the four bacterial species tested. Hence, optimal cut-offs (i.e., which differentiated isolates at the ST level) depended on the bacterial species considered and ranged from 0.159 for *E. cloacae* to 0.495 for *A. baumannii* (Figure 1). For a given bacterial species, optimal cut-off probably depends on the genetic diversity of the population. The large range obtained for *K. pneumoniae* may be due to the low number of isolates tested ($n = 16$). Nevertheless, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *E. cloacae* had a similar optimal cut-off range (Figure 1). This cut-off range should be tested with other Gram-negative species to assess the possibility of setting up a cut-off suitable for different Gram-negative species.

Reproducibility

Fourier-Transform Infrared spectroscopy is known to be a very sensible method with a high variability (Baker et al., 2014). We assessed the reproducibility of the method by repeating the analysis of 20 isolates of *P. aeruginosa* four times independently on separate days. FTIR spectroscopy clustering was highly reproducible with AR of 0.936 and AW always equal to 1.000. In particular, identical dendrograms were obtained by FTIR spectroscopy typing done 6 month apart, demonstrating the reliability of the method. The small variations of hygrometry ($\pm 8\%$) and temperature ($\pm 1.5^\circ\text{C}$) under which we tested the IR Biotyper are presumably crucial to keeping the performances of the method. In addition, the evaluation of

the data exportability will require reproducibility tests on different machines.

Prospective Situation

In order to test the robustness of the FTIR spectroscopy and its usefulness in the routine, we simulated a prospective study where *P. aeruginosa* isolates would be collected days after days. We found that FTIR spectroscopy accurately clustered isolates by outbreaks (as defined by PFGE; AR, 0.824), even though they were analyzed independently over 8 days. Hence, two isolates clustered by FTIR spectroscopy most probably belonged to the same clone (AW, 0.965), while the opposite was less true (AW, 0.719). In other words, FTIR spectroscopy clusters clonal isolates with a good specificity, but with a lower sensibility.

In contrast with the widely used typing methods (MLST, PFGE, and WGS) that only allow retrospective analysis, the FTIR spectroscopy could become a valuable tool that quickly identifies epidemic isolates in the flow of the laboratory routine. It will help seeking the sources of outbreaks and quickly implementing appropriate infection control measures. Although these measures are often implemented without molecular documentation, FTIR spectroscopy can help detect unsuspected outbreaks (of wild-type strains) or rule out wrong outbreaks (of isolates sharing an antibiotic resistance profile). FTIR spectroscopy could also help track environmental contamination sources by establishing a link between clinical and environmental isolates. Furthermore, FTIR spectroscopy can help see if a reinfected patient is colonized with the same or with a new strain. The marketed Bruker IR Biotyper has the potential to be implemented in a clinical lab routine with a quick and easy preparation of the samples and a user-friendly software.

FTIR Spectroscopy

The performances of the technique could even be enhanced with the exploration of other spectral areas (proteins and lipids). Gold standard methods for bacterial typing such as MLST, PFGE, and WGS are DNA-based techniques while FTIR spectroscopy typing relies on carbohydrate composition. WGS data could help understanding the genomic variations between isolates that modify carbohydrate composition and subsequently impact the FTIR spectrum. In addition, other bacterial species should be tested to extend the list of species-specific cut-offs. Recommendations about culture conditions (i.e., media and growth conditions) and air parameters during sample preparation (i.e., hygrometry and temperature) would further help the implementation of the method in clinical laboratories.

CONCLUSION

We found here that the FTIR spectroscopy accurately clustered *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*

isolates belonging to the same clones. The easiness of use, the short turnaround time, and the user-friendly software make FTIR spectroscopy adapted to the routine of the clinical laboratory. The quick bacterial typing with FTIR spectroscopy could help to tackle the spread of pathogens that threaten the weakest patients.

DATA AVAILABILITY

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DM, MS, XB, and DH conceived and designed the experiments. DM, PC, and MT carried out the experiments. DM and BV analyzed the data. DM, BV, XB, and DH wrote the manuscript.

REFERENCES

- Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., et al. (2014). Using fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat. Protoc.* 9, 1771–1791. doi: 10.1038/nprot.2014.110
- Berrazeg, M., Diene, S. M., Drissi, M., Kempf, M., Richet, H., Landraud, L., et al. (2013). Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One* 8:e61428. doi: 10.1371/journal.pone.0061428
- Bertelli, C., and Greub, G. (2013). Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 803–813. doi: 10.1111/1469-0691.12217
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., et al. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 4:e4982. doi: 10.1371/journal.pone.0004982
- Cabroler, N., Saugey, M., Bertrand, X., and Hocquet, D. (2015). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1395–1398. doi: 10.1128/JCM.00210-215
- Carrico, J. A., Silva-Costa, C., Melo-Cristino, J., Pinto, F. R., de Lencastre, H., Almeida, J. S., et al. (2006). Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2524–2532. doi: 10.1128/JCM.02536-2535
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., and Dowson, C. G. (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5644–5649. doi: 10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004
- Davis, R., Paoli, G., and Mauer, L. J. (2012). Evaluation of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometrics as a rapid approach for subtyping *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *Food Microbiol.* 31, 181–190. doi: 10.1016/j.fm.2012.02.010
- Dawson, S. E., Gibreel, T., Nicolaou, N., AlRabiah, H., Xu, Y., Goodacre, R., et al. (2014). Implementation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid typing of uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 983–988. doi: 10.1007/s10096-013-2036-2030
- Diancourt, L., Passet, V., Nemeč, A., Dijkshoorn, L., and Brisse, S. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 5:e10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034

FUNDING

IR Biotyper and reagents were kindly provided by Bruker Daltonik GmbH. The work was supported by the University Hospital of Besançon (CELIA project, 2018). DM was supported by a grant from the European Community (JPI-EC-AMR, 2016-029).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Guillaume Bois-Salvaro from Bruker Daltonik for his technical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01440/full#supplementary-material>

- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A. D., and Brisse, S. (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4178–4182. doi: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005
- Dieckmann, R., Hammerl, J. A., Hahmann, H., Wicke, A., Kleta, S., Dabrowski, P. W., et al. (2016). Rapid characterisation of *Klebsiella oxytoca* isolates from contaminated liquid hand soap using mass spectrometry. FTIR and Raman spectroscopy. *Faraday Discuss.* 187, 353–375. doi: 10.1039/c5fd00165j
- Dinkelacker, A. G., Vogt, S., Oberhettinger, P., Mauder, N., Rau, J., Kostrzewa, M., et al. (2018). Typing and species identification of clinical *Klebsiella* isolates by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 56, e843–18. doi: 10.1128/JCM.00843-18
- Friedman, N. D., Temkin, E., and Carmeli, Y. (2016). The negative impact of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 416–422. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.002
- Graña-Miraglia, L., and Castillo-Ramírez, S. (2019). Inaccurate multilocus sequence typing of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 186–187. doi: 10.3201/eid2501.180374
- Hubert, L., and Arabie, P. (1985). Comparing partitions. *J. Classif.* 2, 193–218. doi: 10.1007/BF01908075
- Hunter, P. R., and Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466.
- Johler, S., Stephan, R., Althaus, D., Ehling-Schulz, M., and Grunert, T. (2016). High-resolution subtyping of *Staphylococcus aureus* strains by means of Fourier-transform infrared spectroscopy. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 189–194. doi: 10.1016/j.syapm.2016.03.003
- Jolley, K. A., and Maiden, M. C. (2014). Using MLST to study bacterial variation: prospects in the genomic era. *Future Microbiol.* 9, 623–630. doi: 10.2217/fmb.14.24
- Kimura, B. (2018). Will the emergence of core genome MLST end the role of in silico MLST? *Food Microbiol.* 75, 28–36. doi: 10.1016/j.fm.2017.09.003
- Kuhm, A. E., Suter, D., Felleisen, R., and Rau, J. (2009). Identification of *Yersinia enterocolitica* at the species and subspecies levels by fourier transform infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5809–5813. doi: 10.1128/AEM.00206-209
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., et al. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1355–1361. doi: 10.1128/JCM.06094-6011
- Li, W., Raoult, D., and Fournier, P.-E. (2009). Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 892–916. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x

- Miyoshi-Akiyama, T., Hayakawa, K., Ohmagari, N., Shimojima, M., and Kirikae, T. (2013). Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One* 8:e66358. doi: 10.1371/journal.pone.0066358
- Novais, Â, Freitas, A. R., Rodrigues, C., and Peixe, L. (2018). Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 427–448. doi: 10.1007/s10096-018-3431-3433
- Novais, Â, Sousa, C., de Dios Caballero, J., Fernandez-Olmos, A., Lopes, J., Ramos, H., et al. (2014). MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 1391–1399. doi: 10.1007/s10096-014-2071-2075
- Peleg, A. Y., and Hooper, D. C. (2010). Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *N. Engl. J. Med.* 362, 1804–1813. doi: 10.1056/NEJMra0904124
- Petitjean, M., Martak, D., Silvant, A., Bertrand, X., Valot, B., and Hocquet, D. (2017). Genomic characterization of a local epidemic *Pseudomonas aeruginosa* reveals specific features of the widespread clone ST395. *Microb. Genomics* 3:e000129. doi: 10.1099/mgen.0.000129
- Pinto, F. R., Melo-Cristino, J., and Ramirez, M. (2008). A confidence interval for the Wallace coefficient of concordance and its application to microbial typing methods. *PLoS One* 3:e3696. doi: 10.1371/journal.pone.0003696
- Quintelas, C., Ferreira, E. C., Lopes, J. A., and Sousa, C. (2018). An overview of the evolution of infrared spectroscopy applied to bacterial typing. *Biotechnol. J.* 13:1700449. doi: 10.1002/biot.201700449
- Rebuffo-Scheer, C. A., Schmitt, J., and Scherer, S. (2007). Differentiation of *Listeria monocytogenes* serovars by using artificial neural network analysis of fourier-transformed infrared spectra. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1036–1040. doi: 10.1128/AEM.02004-2006
- Sauget, M., Nicolas-Chanoine, M.-H., Cabrolier, N., Bertrand, X., and Hocquet, D. (2014). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 977–983. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.06.004
- Sauget, M., Valot, B., Bertrand, X., and Hocquet, D. (2017). Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends Microbiol.* 25, 447–455. doi: 10.1016/j.tim.2016.12.006
- Severiano, A., Pinto, F. R., Ramirez, M., and Carriço, J. A. (2011). Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3997–4000. doi: 10.1128/JCM.00624-11
- Siegrist, T. J., Anderson, P. D., Huen, W. H., Kleinheinz, G. T., McDermott, C. M., and Sandrin, T. R. (2007). Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *J. Microbiol. Methods* 68, 554–562. doi: 10.1016/j.mimet.2006.10.012
- Slekovec, C., Plantin, J., Cholley, P., Thouverez, M., Talon, D., Bertrand, X., et al. (2012). Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS One* 7:e49300. doi: 10.1371/journal.pone.0049300
- Sousa, C., Botelho, J., Grosso, F., Silva, L., Lopes, J., and Peixe, L. (2015). Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones under routine experimental conditions. *Front. Microbiol.* 6:481. doi: 10.3389/fmicb.2015.00481
- Sousa, C., Novais, Â, Magalhães, A., Lopes, J., and Peixe, L. (2013). Diverse high-risk B2 and D *Escherichia coli* clones depicted by fourier transform infrared spectroscopy. *Sci. Rep.* 3:3278. doi: 10.1038/srep03278
- Sousa, C., Silva, L., Grosso, F., Lopes, J., and Peixe, L. (2014). Development of a FTIR-ATR based model for typing clinically relevant *Acinetobacter baumannii* clones belonging to ST98, ST103, ST208 and ST218. *J. Photochem. Photobiol. B* 133, 108–114. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.02.015
- Talon, D., Cailleaux, V., Thouverez, M., and Michel-Briand, Y. (1996). Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hosp. Infect.* 32, 135–145.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., et al. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.
- Woodford, N., Turton, J. F., and Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 736–755. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Martak, Valot, Sauget, Cholley, Thouverez, Bertrand and Hocquet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

8.2 Projet MODERN

8.2.1 Résumé et objectifs de l'étude

Lorsque l'on s'intéresse à la résistance bactérienne en général, la multirésistance des entérobactéries est actuellement un des problèmes les plus urgents en raison de leur poids clinique considérable et de leur influence sur l'utilisation des antibiotiques. Les BLSE ont une grande importance clinique puisqu'elles représentent la cause majeure de la résistance bactérienne chez les entérobactéries. Alors que la transmission des EBLSE a bien été étudiée dans les hôpitaux, les données dans la communauté sont peu abondantes. La transmission des EBLSE est complexe dans les foyers et parmi les patients admis dans les services de réadaptation. Certains produits alimentaires sont souvent contaminés par des EBLSE, mais leur rôle dans la colonisation des humains est sujet à débat. De plus, une vue complète de l'épidémiologie des EBLSE manque. Le projet MODERN (*Understanding and modelling reservoirs, vehicles, and transmission of ESBL-producing Enterobacteriaceae in the community and long-term care facilities*) est un projet Européen impliquant cinq villes : Besançon (France), Genève (Suisse), Séville (Espagne), Tübingen (Allemagne) et Utrecht (Pays-Bas). Les objectifs du projet étaient de caractériser les réservoirs, les dynamiques de transmission et les facteurs de risque d'acquisition d'EBLSE dans les établissements de long séjour et au sein des foyers dans des pays Européens avec taux de résistance différents, déterminer la fréquence et l'impact épidémiologique de la contamination des eaux usées et de la nourriture par les EBLSE, déchiffrer l'épidémiologie moléculaire des EBLSE dans différentes niches/populations et notamment les relations clonales des isolats, ainsi que les éléments génétiques mobiles, et leur relation avec les données épidémiologiques cliniques.

8.2.2 Acquisition et transmission d'EBLSE dans les foyers après la sortie de l'hôpital de patients index positifs à l'ESBL

Publié dans *Clinical Microbiology and Infection* en 2021.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Original Article

Household acquisition and transmission of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) -producing *Enterobacteriaceae* after hospital discharge of ESBL-positive index patients

Maria E. Riccio¹, Tess Verschuuren², Nadine Conzelmann³, Daniel Martak⁴, Alexandre Meunier⁴, Elena Salamanca^{5,6}, Mercedes Delgado^{5,6}, Julia Guther⁷, Silke Peter⁷, Julian Paganini⁸, Romain Martischang¹, Julien Sauser¹, Marlieke E.A. de Kraker¹, Abdessalam Cherkaoui⁹, Ad C. Fluit⁸, Ben S. Cooper¹⁰, Didier Hocquet⁴, Jan A.J.W. Kluytmans², Evelina Tacconelli^{3,11}, Jesús Rodríguez-Baño^{5,6}, Stephan Harbarth^{1,*} on behalf of the MODERN WP2 study group[†]

¹ Infection Control Programme and WHO Collaborating Centre on Patient Safety, University of Geneva Hospitals and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland

² Julius Centre for Health Sciences and Primary Care, University Medical Centre Utrecht, Utrecht, the Netherlands

³ Infectious Diseases, Department of Internal Medicine I, University Hospital Tübingen, Tübingen, Germany

⁴ Infection Control Unit, University Hospital of Besançon, Besançon, France

⁵ Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine Unit, Virgen Macarena University Hospital, Sevilla, Spain

⁶ Department of Medicine, University of Sevilla/Biomedicine Institute of Sevilla, Sevilla, Spain

⁷ Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University Hospital Tübingen, Tübingen, Germany

⁸ Department of Medical Microbiology, University Medical Centre Utrecht, Utrecht, the Netherlands

⁹ Bacteriology Laboratory, Geneva University Hospital, Geneva, Switzerland

¹⁰ Centre for Tropical Medicine & Global Health, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, United Kingdom

¹¹ Infectious Diseases Division, Department of Diagnostic and Public Health, University Hospital Verona, Verona, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 August 2020

Received in revised form

20 November 2020

Accepted 19 December 2020

Available online xxx

Editor: P.T. Tassios

Keywords:

Acquisition

Extended-spectrum β -lactamase

Household

Prospective cohort study

Transmission

ABSTRACT

Objectives: This study aimed to determine rates and risk factors of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-PE) acquisition and transmission within households after hospital discharge of an ESBL-PE-positive index patient.

Methods: Two-year prospective cohort study in five European cities. Patients colonized with ESBL-producing *Escherichia coli* (ESBL-Ec) or *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-Kp), and their household contacts were followed up for 4 months after hospital discharge of the index case. At each follow up, participants provided a faecal sample and personal information. ESBL-PE whole-genome sequences were compared using pairwise single nucleotide polymorphism-based analysis.

Results: We enrolled 71 index patients carrying ESBL-Ec ($n = 45$), ESBL-Kp ($n = 20$) or both ($n = 6$), and 102 household contacts. The incidence of any ESBL-PE acquisition among household members initially free of ESBL-PE was 1.9/100 participant-weeks at risk. Nineteen clonally related household transmissions occurred (case to contact: 13; contact to case: 6), with an overall rate of 1.18 transmissions/100 participant-weeks at risk. Most of the acquisition and transmission events occurred within the first 2 months after discharge. The rate of ESBL-Kp household transmission (1.16/100 participant-weeks) was higher than of ESBL-Ec (0.93/100 participant-weeks), whereas more acquisitions were noted for ESBL-Ec (1.06/100 participant-weeks) compared with ESBL-Kp (0.65/100 participant-weeks). Providing assistance for urinary and faecal excretion to the index case by household members increased the risk of ESBL-PE transmission (adjusted prevalence ratio 4.3; 95% CI 1.3–14.1).

* Corresponding author: Stephan Harbarth, Service de Prévention et Contrôle de l'Infection, Hôpitaux Universitaires de Genève, CH-1211 Genève 14, Switzerland.

E-mail address: stephan.harbarth@hcuge.ch (S. Harbarth).

† Other members of the MODERN WP2 study group are listed in the [study group](#) section.

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.024>

1198-743X/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article as: Riccio ME et al., Household acquisition and transmission of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) -producing *Enterobacteriaceae* after hospital discharge of ESBL-positive index patients, *Clinical Microbiology and Infection*, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.024>

Conclusions: ESBL-PE cases discharged from the hospital are an important source of ESBL-PE transmission within households. Most acquisition and transmission events occurred during the first 2 months after hospital discharge and were causally related to care activities at home, highlighting the importance of hygiene measures in community settings.

Clinical study registration: German Clinical Trials Register, DRKS-ID: DRKS00013250. **Maria E. Riccio, Clin Microbiol Infect 2021;•1**

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Transmission of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-PE) in the clinical setting has been extensively studied [1], but little is known about the risk and pathways of transmission in the community. A recent systematic review evaluating human-to-human ESBL-PE transmission between household contacts highlighted important limitations of previous studies [2]: low discriminatory power of previously applied typing methods for identifying ESBL-PE transmission events [3]; cross-sectional study design preventing the assessment of transmission dynamics over time; and no systematic assessment of ESBL-PE transmission paths and possible epidemiological determinants. Furthermore, only two studies focused on the likelihood of household transmission of ESBL-PE after hospital discharge of an ESBL-positive patient [4].

The aim of this study was to investigate ESBL-PE acquisition and transmission in household settings in five European cities with varying ESBL-PE baseline prevalence. Specifically, we attempted to determine the incidence and risk factors of ESBL-PE acquisition and transmission within families after hospital discharge of an ESBL-PE carrier.

Materials and methods

Study design

We conducted a prospective multicentre cohort study including ESBL-PE-positive patients and their household contacts from five university hospitals (Geneva, Sevilla, Tübingen, Utrecht, Besançon). The recruitment target was 20 households per centre (see Supplementary material, [Appendix S1](#)).

Population

Index cases were defined as intestinal ESBL-PE carriers discharged home into a household shared with at least one household contact. Household contacts were identified as any person sharing the same household with the index case at least three nights a week.

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria for the index cases were: to be ≥ 18 years old; to have a rectal swab or faecal sample at hospital discharge confirming intestinal colonization with ESBL-producing *Escherichia coli* (ESBL-Ec) and/or *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-Kp); and to provide informed consent. Patients were excluded if they were permanently institutionalized or impossible to follow up. After inclusion, index cases were excluded if they had negative rectal samples during the first two visits. Enrolled participants who

dropped out before collecting the first stool sample were also excluded.

Data collection

All participants were followed up for 4 months: at hospital discharge (baseline visit #1), 1 week (visit #2), 2 months (visit #3) and 4 months (visit #4). Questionnaires were filled out by all participants at visits #1, #2, #3, and #4. Collected variables concerned participants' health status, antibiotic intake, household conditions, dietary habits and lifestyle. All participants collected stool samples or rectal swabs themselves (or by a household contact) with Pro-cult™ 500 kit (Ability Building Centre, Rochester, MN, USA) and faeces containers or Eswabs (Copan Diagnostics, Brescia, Italy) at visit #1, #2, #3 and #4 (± 3 days). Collected information was transferred into a centralized REDCap database. The study was approved by each centre's institutional review board.

Microbiological methods

Selective culturing, enrichment broth, bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing were performed for each stool sample or rectal swab at each centre's microbiology laboratory, using standardized methods (as described in the Supplementary material, [Appendix S2](#)).

Sequencing analysis

The full genome of ESBL-PE isolates was sequenced with Next-Seq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA). DNA extraction was performed with DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The sequence type (ST) of each isolate was identified by using seven housekeeping genes, using MLST version 2.10 (<https://github.com/tseemann/mlst>). ESBL-encoding genes were identified by RESFINDER version 2.1 of the Center for Genomic Epidemiology [5]. Neighbour-joining core genome multi-locus sequence typing (cgMLST) trees were constructed with SeqSphere+ (Ridom, Münster, Germany) using the Enterobase scheme (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6961584/>) for *E. coli* (2513 genes) and *sensu lato* scheme for *K. pneumoniae* (2358 genes). After removing genes not present in all strains, trees were built by comparing 1863 and 2088 genes, respectively. For strains presenting the same cgMLST alongside a strong epidemiological link, pairwise single nucleotide polymorphism (SNPs) distances were estimated using the CFSAN pipeline [6].

Definitions

Genomes of ESBL-PE isolates were considered clonally related and closely related when having, respectively, a pairwise distance of ≤ 10 or 11–25 SNP differences [7]. Acquisition was defined as newly identified carriage of an ESBL-Ec or ESBL-Kp strain during

follow up, not previously detected in the gut flora of the concerned participant. Transmission was defined as the newly detected intestinal carriage of ESBL-Ec and/or ESBL-Kp of a clonally related isolate previously identified in another household member. Co-carriage was defined as the simultaneous carriage by two or more household members of a clonally related isolate at the same sampling time-point.

Data analysis

Overall and species-specific incidence rates of acquisition and transmission were estimated at the genotypic level. Time at risk of ESBL-PE acquisition was estimated as the number of days between baseline and the acquisition of the corresponding pathogen in a participant previously free of it, or the drop out of the participant, or end of follow up, whichever occurred first. The time at risk of a possible ESBL-PE transmission was estimated as the time between baseline (for index cases) or the date of the first positive sample (for household contacts), and the first detection date of a clonally related isolate previously identified in another household member. Incidence rates were calculated as the total number of acquisition or transmission events divided by the total number of participant-weeks at risk multiplied by 100.

Risk factors of acquisition and transmission were evaluated by univariable and multivariable mixed-effects Poisson regression models to compute prevalence ratios [8,9], accounting for the lack of independence between repeated samples, and multiple clustering effects. The multilevel structure of the data was composed of three levels: participant (four samples per participant), household and study site. Potential confounders were chosen on the basis of existing evidence, and were only scored if exposure preceded the event, with final model selection performed using a stepwise backward model selection based on Akaike's information criterion [10]. Analyses were performed using R (version 3.6.3.) and STATA version 15 (StataCorp., College Station, TX, USA).

Results

Recruitment and household characteristics

Between November 2017 and April 2019, 71 households were included in the study, with 71 index cases and 102 of 127 eligible household contacts (participation rate, 80%). During the 4-month follow up, 35 participants from 14 households dropped out (Fig. 1). Important characteristics of participating households are shown in Table 1. The mean age of all participants was 53 ± 21 years; 47% were female.

Profile of index cases and household contacts

Baseline characteristics of index cases and household contacts are presented in Table 2 and in the Supplementary material (Table S1). During the hospital stay, 32% ($n = 23$) of index cases had an ESBL-PE infection and 39% ($n = 28$) received antibiotics at hospital discharge.

ESBL-PE carriage and acquisition

At baseline, index cases were carrying ESBL-Ec ($n = 45$, 63%) or ESBL-Kp ($n = 20$, 28%) or both ($n = 6$, 8%). Among household contacts already positive at baseline ($n = 29$, 31%), 79% (23/29) were carrying the same ESBL-PE as their corresponding index case. Twenty-six percent (17/65) of household contacts with complete follow up acquired ESBL-PE (ESBL-Ec, 11; ESBL-Kp, 6). Most ESBL-PE acquisitions occurred during the first 2 months (1st week: 41%; 2nd

to 8th week: 29%). One-third of index cases ($n = 27$) were ESBL-PE negative at the end of follow up.

Genetic profiles

Overall, 38 different STs were observed for ESBL-Ec and 29 for ESBL-Kp (see Supplementary material, Fig. S1). Among ESBL-Ec strains, ST131 was the most frequent ST (46%). Less frequent STs were ST38 (6.9%), ST1193 (4%) and ST10 (3.6%). STs from ESBL-Kp showed a large heterogeneity (see Supplementary material, Fig. S2). Of 44 different ESBL-encoding genes identified, the most frequent was *bla*_{CTX-M-15}, detected in 142 ESBL-Ec and 79 ESBL-Kp isolates.

Clonally related co-carriage and transmission of related isolates

At baseline, 14 out of 29 positive household contacts had isolates clonally related to the index case. The overall prevalence of co-carriage of clonally related isolates was 34% (32/94) over the entire study period.

By combining epidemiological information with whole-genome sequencing data (Fig. 2), 19 clonally related transmission events were identified showing two possible directions: from the index case to his/her household contacts ($n = 13$) and vice versa ($n = 6$). Two additional closely related transmission events were identified for household BE07 from Besançon (18 to 24 SNP differences). The isolates belonged to ST80 and the intra-individual genome variability of the ESBL-Ec isolates retrieved from the index case throughout all sampling points ranged from 7 to 11 SNP differences. Most of the transmissions involved ESBL-Ec (14/21), with nine of them transmitted by the index case (Table 3 and see Supplementary material, Table S2). Fifteen of 21 (71%) transmission events occurred during the first 2 months of follow up. The phylogenetic trees of retrieved ESBL-Ec and ESBL-Kp strains are shown in the Supplementary material (Figs S3 and S4).

Incidence rates of household acquisition and transmission of ESBL-PE

The overall ESBL-PE acquisition rate was 1.9/100 participant-weeks at risk (Table 3). ESBL-Ec had a higher rate of acquisition than ESBL-Kp (1.06 versus 0.65/100 participant-weeks at risk; relative risk (RR) 1.65; 95% CI 0.69–3.95). The rate of any clonally related ESBL-PE transmission within households was 1.18 events/100 participant-weeks of follow up, with the corresponding figure for transmissions only from the index case to household contacts of 0.8/100 participant-weeks (Table 3). Although not statistically significant, a higher overall transmission rate was observed for ESBL-Kp than for ESBL-Ec (1.16 versus 0.93 per 100 participant-weeks at risk; RR 1.25; 95% CI 0.42–3.44) considering all possible transmission paths. A higher rate of ESBL-Kp transmission was also observed from index cases to household contacts (RR 1.87; 95% CI 0.52–6.49).

Risk factors for ESBL-PE acquisition and transmission

By univariable, mixed-effects Poisson regression, multiple explanatory factors were significantly associated with the risk of acquiring ESBL-PE among previously ESBL-PE-free household contacts (see Supplementary material, Table S3): (a) index case determinants: hemiplegia, faecal incontinence, previous abdominal infection, proton-pump inhibitor therapy, three or more antibiotic courses after discharge, additional hospitalizations, and assistance provided by household members, in particular for urinary and faecal excretion; (b) household member determinants:

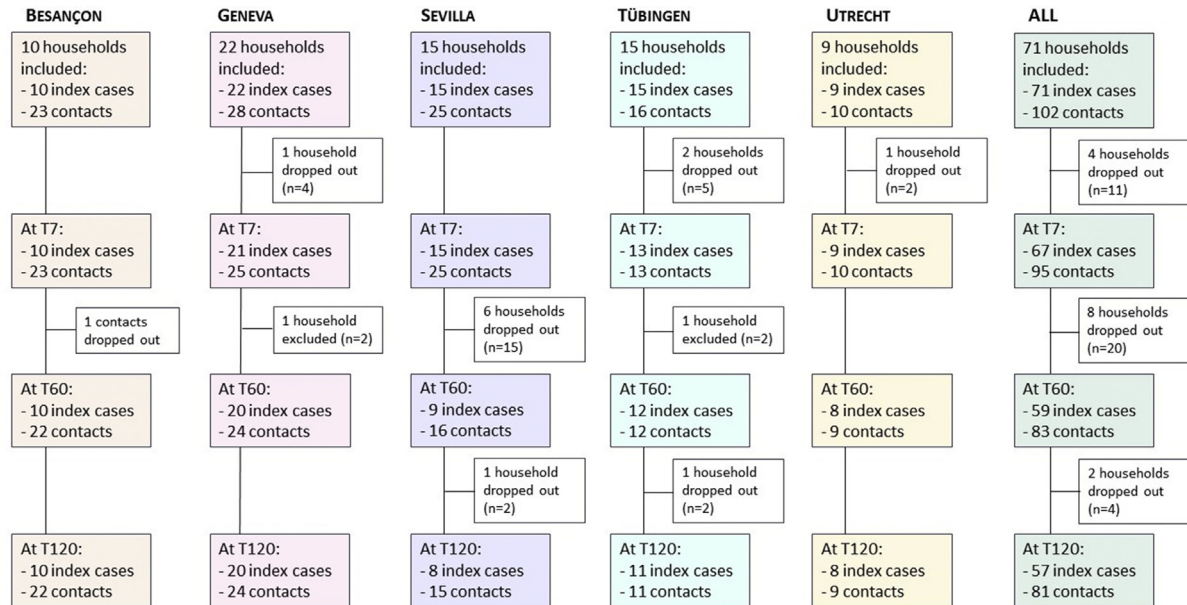


Fig. 1. Study flow diagram of study participants, by centre and overall.

Table 1
Characteristics of households included in the study

	ESBL-Ec n (%)	ESBL-Kp n (%)	ESBL-Ec and ESBL-Kp n (%)
Total n	45	20	6
Study site			
Besançon	7 (15.6)	3 (15.0)	0
Geneva	12 (26.7)	6 (30.0)	4 (66.7)
Sevilla	9 (20.0)	6 (30.0)	0
Tübingen	11 (24.4)	2 (10.0)	2 (33.3)
Utrecht	6 (13.3)	3 (15.0)	0
Number of participating household members			
2	33 (73.3)	14 (70.0)	5 (83.3)
3	7 (15.6)	3 (15.0)	1 (16.7)
>4	5 (11.1)	3 (15.0)	0
Children in the household			
<18 years	9 (20.0)	7 (35.0)	1 (16.7)
<5 years	3 (6.7)	4 (20)	0
Household exposure to at least two antibiotics during follow up			
T60	7 (15.6)	3 (15.0)	0 (0)
T120	7 (15.6)	1 (5.0)	0 (0)
Number of toilets in household			
>2	17 (39.5)	8 (40.0)	3 (60.0)
Bath separated from toilet	16 (36.4)	3 (15.0)	2 (33.3)
Surface area of living space (m ²), median ± SD	122.2 ± 69.7	154.2 ± 82.3	132 ± 45.7
Vegetarians in household	1 (2.3)	1 (5.0)	0

Abbreviations: ESBL, extended-spectrum β-lactamase; ESBL-Ec, ESBL-producing *Escherichia coli*; ESBL-Kp, ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*; ESBL-PE, ESBL-producing *Enterobacteriaceae*.

Data are reported as n (%), unless stated otherwise.

age >50 years, travel abroad, assistance provided by healthcare personnel, help requested for various activities, regular contact with domestic animals, meat and seafood exposure, as well as the number of antibiotic courses. By multivariable analysis in a parsimonious model, assistance provided by family members to the index case (adjusted prevalence ratio (aPR) 2.9; 95% CI 1.1–8.0) showed the strongest association with ESBL-PE household acquisition, whereas frequency of meat consumption (aPR 1.4; 95% CI 0.4–5.3) and antibiotic exposure (aPR 1.4; 95% CI 0.4–4.2) showed only weak evidence of a positive association.

Fourteen variables were found to be significantly associated with the risk of ESBL-PE transmission from the index case to

household members in the univariable analysis (see Supplementary material, Table S4): (a) index case determinants: higher education (protective), full autonomy (protective), malignancy, faecal incontinence, previous abdominal infection, urinary catheter, proton-pump inhibitor therapy, three or more antibiotic courses, two or more hospitalizations, and assistance provided by family members, in particular for urinary and faecal excretion; (b) household member determinants: spouse of index case, antibiotic intake and active helper of index case. In the final multilevel Poisson regression model, assistance provided by household members for urinary and faecal excretion was strongly associated with increased risk of ESBL-PE transmission (aPR 4.3; 95% CI 1.3–14.1),

Table 2
Main characteristics of ESBL-PE-positive index cases included in the study

	ESBL-Ec (n = 45)	ESBL-Kp (n = 20)	ESBL-Ec and ESBL-Kp (n = 6)
Demographic			
Age (years), median (range)	62 (21–89)	64 (28–96)	57.5 (51–83)
Female gender	16 (35.6)	9 (45.0)	2 (33.3)
Highest education			
Primary school	11 (24.4)	7 (35.0)	0
Secondary school	11 (24.4)	8 (40.0)	0
Technical school	11 (24.4)	4 (20.0)	0
University	5 (11.1)	1 (5.0)	5 (83.3)
Other/unknown	7 (15.6)	0	1 (16.6)
Antibiotic exposure in previous 12 months	19 (42.2)	8 (40.0)	1 (16.7)
Travel abroad in previous last 12 months	23 (52.3)	5 (25.0)	4 (66.7)
Dietary habits			
Omnivore	42 (97.7)	19 (95)	5 (83.3)
Weekly meat consumption	38.5 (86.0)	20 (100)	4 (67)
Vegetarian	1 (2.3)	1 (5.0)	0
Hospital length of stay			
1–7 days	19 (42.2)	3 (15.0)	3 (50.0)
8–14 days	10 (22.2)	6 (30.0)	1 (16.7)
15–28 days	8 (17.8)	6 (30.0)	0
>28 days	8 (17.8)	5 (25.0)	2 (33.3)
Co-morbidities			
Autoimmune disease	40 (88.9)	18 (90.0)	5 (83.3)
Cardiovascular disease	0	2 (10.0)	0
Chronic dermatological disease	20 (44.4)	7 (35.0)	2 (33.3)
Chronic renal failure	4 (8.9)	1 (5.0)	1 (16.7)
Chronic renal failure	7 (15.6)	1 (5.0)	0
Chronic obstructive pulmonary disease	3 (6.7)	2 (10)	0
Diabetes	14 (31.1)	3 (15.0)	0
Gastrointestinal disease	7 (15.6)	3 (15.0)	0
Chronic diarrhoea	1 (2.2)	0	0
Hepatic disease	4 (8.9)	2 (10.0)	0
Inflammatory bowel disease	3 (6.7)	2 (10)	0
Hemiplegia	0	1 (5.0)	0
Immunosuppression	5 (11.1)	4 (20.0)	1 (16.7)
Malignancy	14 (31.1)	9 (45.0)	1 (16.7)
Other	19 (42.2)	10 (50.0)	4 (66.7)
ESBL-PE infection during hospitalization			
Yes	15 (33.3)	5 (25.0)	3 (50.0)
No	26 (57.8)	13 (65.0)	3 (50.0)
Unknown	4 (8.9)	2 (10.0)	0
Antibiotics at discharge			
Yes	19 (42.2)	8 (40.0)	1 (16.7)
No	26 (57.8)	11 (55.0)	4 (66.7)
Unknown	0	1 (5.0)	1 (16.7)
Incontinence			
Urinary incontinence	6 (13.3)	6 (30.0)	0
Urinary incontinence	3 (6.7)	4 (20.0)	0
Faecal incontinence	2 (4.4)	2 (10.0)	0
Both	1 (2.2)	0	0
Indwelling device at discharge			
Intravascular	34 (75.6)	12 (60.0)	5 (83.3)
Intravascular	4 (8.9)	4 (20.0)	1 (16.7)
Urinary	1 (2.2)	2 (10.0)	0
Other	7 (15.6)	2 (10.0)	0
Patient autonomy			
Not completely autonomous	19 (42.2)	11 (55.0)	3 (50.0)
Needs support by family members	12 (26.7)	8 (40.0)	2 (33.3)
Help required for urinary or faecal excretion	2 (4.4)	6 (30.0)	0
Home care by healthcare personnel	12 (26.7)	5 (25.0)	1 (16.7)

Abbreviations: ESBL, extended-spectrum β -lactamase; ESBL-Ec, ESBL-producing *Escherichia coli*; ESBL-Kp, ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*; ESBL-PE, ESBL-producing *Enterobacteriaceae*.

Data are reported as n (%), unless stated otherwise.

whereas household antibiotic exposure showed weaker evidence of a positive association (aPR 2.1; 95% CI 0.7–7.0).

Discussion

The principal findings of this international cohort study were: (a) clonally related ESBL-PE household transmission after hospital discharge of an ESBL-PE carrier occurred in 19 of 94 participants; (b) most acquisition and transmission events were observed during the first 2 months; (c) other household members were potential sources of cross-transmission, but to a lesser degree; (d) the ESBL-

PE acquisition rate was higher than the transmission rate; so, exogenous acquisition events occurred even without intra-household transmission; (e) the rate of household transmission was higher for ESBL-Kp than for ESBL-Ec; and (f) assistance provided by family members for urinary and faecal excretion of the index case was the most important risk factor for ESBL-PE transmission.

A recent meta-analysis examining clonally related ESBL-PE among household members documented co-carriage proportions of 12% (95% CI 8%–16%), and acquisition rates ranging from 0.16 to 0.20 events/100 participant-weeks of follow up [2]. In contrast, our

	Sample #1					Sample #2					Sample #3					Sample #4					Index case to household contacts	Household contact to index case	MLST	Pairwise SNPs differences
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E				
BE02	■					■					■*					■*	*				A#3 to B#4		ST45	0
* BE07	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	A#3 to B#3 and D#3		ST80	18-24
BE09	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	A#1 to E#2		ST3268	3
GE02	■*					■*					■*	*				■*	*				A to B#3		ST1193	0
GE04	■*					■*					■*	*				■*	*					B#1 to A#2	ST405	0-1
GE05	■*					■*					■*	*				■*	*					B#2 to A#4	ST405	0
GE08	■*					■*					■*	*				■*	*					B#1/2 to A#3	ST127	4-6
GE10	■*					■*					■*	*				■*	*				A to B#3		ST1193	2-4
GE12	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	A#1 to B#2 & C#2		ST1537	0
GE15	■*					■*					■*	*				■*	*				A to B#3		ST1537	2-3
GE17	■*					■*					■*	*				■*	*					B#1 to A#3	ST131	4-6
GE21	■*					■*					■*	*				■*	*				A#1 to B#2		ST31	8
SE06	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*		C#1 to A#3	ST17	8
SE08	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	A/B to C#4		ST131	4
SE09	■*					■*					■*					■*						B#1 to A#2	ST131	0
SE10	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	A to D#2		ST323	0
SE14	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	■*	A to B#4		ST469	7
TU06	■*					■*					■*					■*					A to B#4		ST131	4
TU12	■*					■*					■*					■*					A to B#4		ST131	1

Household's members A B C D E ■ KP ■ EC ■ KP-EC ■ Negative ■ Censored * Clonally related isolates

Fig. 2. Transmission events of clonally related and closely related isolates of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) -producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, with direction of the transmission pathways. The figure gives the sequence type of the transmitted strains and pairwise single nucleotide polymorphism (SNP) differences between the isolates concerned. Each line of the table contains the information for a single household. Each square box represents a sample from a participant at a given sampling time-point (i.e. #1, #2, #3, #4). Red and green colours correspond to samples positive with ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*, respectively. Grey colour corresponds to samples that were negative for ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. Transmission events were identified in two directions: from index case (A) to household members (B to E) and from household contacts to index case. Red boxes (with *) represent clonally related ESBL-producing *E. coli* strains and green boxes (with *) represent clonally related ESBL-producing *K. pneumoniae*. MLST, multilocus sequence type.

Table 3
Crude numbers and incidence rates of acquisition and transmission events, based on core genome multi-locus sequence typing with pairwise single nucleotide polymorphism differences

	Acquisitions from any source			Transmissions in any direction			Transmissions from index case to household contacts		
	ESBL-Ec	ESBL-Kp	ESBL-PE	ESBL-Ec	ESBL-Kp	ESBL-PE	ESBL-Ec	ESBL-Kp	ESBL-PE
Crude number	13	12	17	12	7	19	7	6	13
Incidence rate (per 100 participant-weeks at risk)	1.06	0.65	1.90	0.93	1.16	1.18	0.53	1.00	0.80

Abbreviations: ESBL, extended-spectrum β -lactamase; ESBL-Ec, ESBL-producing *Escherichia coli*; ESBL-Kp, ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*; ESBL-PE, ESBL-producing *Enterobacteriaceae*.

study observed higher co-carriage proportions (34%) and 10-fold higher acquisition rates (1.9 events per 100 participant-weeks at risk). The higher proportion of co-carriage in the present study might have been influenced by sampling and detection methods, as the use of enrichment broths and selection of multiple colonies per sample might have improved the yield. Furthermore, it may reflect a higher risk of ESBL-PE transmission within enrolled households before study participation. The differences in acquisition rates depend on the length of follow up: longer follow up periods result in smaller rates. Indeed, 12-month follow-up studies found lower acquisition rates in contrast to shorter follow-up studies, which reported acquisition rates of up to 1.74 closely related ESBL-PE/100 person-weeks [2,8,11]. Furthermore, the higher proportion of infected, dependent and antibiotic-treated index cases in our study might have increased early transmission risk for household members compared with previous studies.

The incidence of ESBL-Ec acquisition was higher than the rate for ESBL-Kp. In contrast, household transmission rates were higher for ESBL-Kp compared with ESBL-Ec. This apparent contradiction is explained by the acquisition of ESBL-Ec from a wide range of

sources (e.g. food, animals, travel) [12,13], whereas transmission, as defined here, only involved human-to-human transfer. Similar observations have also been described for healthcare settings, suggesting that biological differences between bacterial species could explain higher ESBL-Kp transmission rates [14,15]. An alternative explanation might be the slightly higher intra-species diversity of ESBL-Ec within households (mean number of different STs observed per family 1.6 in ESBL-Ec versus 1.3 in ESBL-Kp). Furthermore, the frequency and intensity of human interactions may facilitate transmission of ESBL-Kp, especially among elderly patients [16]. Indeed, in our study, index patients carrying ESBL-Kp were sicker and more dependent on external care, leading to increased proximity and risk of transmission.

As *Enterobacteriaceae* are colonizers of the intestinal tract, the faecal-oral route plays an important role in the transmission chain. As in healthcare settings, where hand hygiene has been shown to be a key factor to reduce pathogen transmission [17], general hygiene measures rather than decreased intake or inappropriate handling of contaminated food may become an important preventive measure to reduce ESBL-PE transmission within

households, especially if family members provide assistance to a sick relative [18].

Hitherto, no previous study with these design characteristics and high-resolution typing methods has been conducted in high-income settings to ascertain putative transmission events within entire families, although ESBL-PE acquisition and transmission in the community or low-income settings has previously been investigated [11,12,19–24]. Therefore, the present study provides a solid methodological foundation for future studies and prioritization of infection control interventions in the community setting.

Several limitations of this study merit consideration. First, not all members living in the same household participated in the study, omitting possible transmission events. Fortunately, the participation rate was high enough (80%) to draw meaningful conclusions. Second, by choosing not more than four colonies from a faecal sample, clonally distinct strains might have been missed, introducing a possible selection bias and underestimating the true transmission rate. As observed in a few participants (16%), each host may carry several ESBL-Ec strains simultaneously. However, we hypothesize that isolates not retrieved might present a low inoculum with lower transmission risk compared with dominating ESBL-Ec strains. Third, we did not yet conduct plasmid typing, which is part of a complementary investigation, providing a more comprehensive picture of ESBL transmission in the community, especially for *E. coli*. Fourth, the role of intermediate vectors (i.e. animal) or environmental reservoirs (i.e. surfaces, water) in ESBL-PE transmission was not directly examined, but was assumed as part of direct human-to-human transmission. However, fomite-mediated transmission was accounted for in the estimation of exogenous risk factors by collecting relevant epidemiological information. Fifth, participants' intestinal load of ESBL-PE was not quantified, preventing the consideration of the inoculum effect as an independent risk factor. However, the bacterial load is influenced by several factors that were collected and accounted for in the analysis (e.g. antibiotic exposure, hospital length of stay).

In summary, ESBL-PE carriers discharged from the hospital were an important source of ESBL-PE transmission within households. Most acquisition and transmission events occurred during the first 2 months after hospital discharge. They were associated with care activities at home, highlighting the importance of hygiene measures to prevent community spread.

Previous presentations

Preliminary results of this study were presented online at the 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Paris, France in April 2020 (abstract #6380). Preliminary results of this study were also presented at the 5th International Conference on Prevention & Infection Control, in Geneva, Switzerland, in September 2019 (abstract #O35).

MODERN WP2 study group (in addition to the authors listed above)

Geneva: Caroline Brossier, Elodie von Dach, Gesuele Renzi, Jacques Schrenzel.

Tübingen: Stefanie Bunk, Siri Goepel, Florian Hölzl, Michael Eib, Ingo B. Autenrieth.

Sevilla: Álvaro Pascual.

Besançon: Xavier Bertrand.

Utrecht: Jelle Scharringa.

Oxford: Patrick Musicha.

Transparency declaration

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. SH reports personal fees from Sanofi, outside the submitted work. SP reports advisory board and speaker honoraria from Biomérieux, Illumina and IDbyDNA outside the submitted work. All other authors have nothing to disclose.

Role of the funding source

This study was part of a Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance collaborative research project, under the 2016 Joint Call framework (*Transnational Research Projects on the Transmission Dynamics of Antibacterial Resistance*). It received funding from the following national research agencies: Instituto de Salud Carlos III (grant no. AC16/00076), Netherlands Organization for Health Research and Development (grant no. AC681055), Swiss National Science Foundation (grant no. 40AR40-173608), German Federal Ministry of Education and Research (grant no. 01KI1830) and Agence Nationale de la Recherche (grant no. ANR-16-JPEC-0007-03).

As part of a separate research project, Marlieke de Kraker has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement nos 115523, 115620 and 115737 (Combating Bacterial Resistance in Europe projects (COMBACTE)), resources of which are composed of financial contribution from the European Union's 7th Framework Programme (FP7/2007±2013) and the European Federation of Pharmaceutical Industries and associations' in-kind contribution. Also, Elena Salamanca, Mercedes Delgado and Jesús Rodríguez-Baño received support for research from by the Plan Nacional de I+D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0001), co-financed by the European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe', Operative Programme Intelligence Growth 2014-2020.

Author contributions

All co-authors contributed to the study design or conduct. SH, ET, MEAK, JRB, MER and RM wrote the study protocol. SH, JRB, JAJWK, ET, DH and BSC obtained funding. MER, ES, TV, DM, AM and NC contributed to recruitment and enrolment of participants in their local institution. AC, ACF, SP, JG, MD, DM, AM and DH performed or supervised the microbiological analyses in their local centres. JAJWK, ACF, SP and JG provided a standardized procedure for whole-genome sequencing. JAJWK and ACF supervised sequencing. MER, RM, JS, MEAK, BC and SH performed or contributed with their expertise to statistical analyses. MER, TV and JP performed genetic analyses. SH, JRB, JAJWK, ET and DH supervised the study in their local institution as principal investigators. SH and MER coordinated activities among the centres. MER, RM and SH drafted the manuscript and all authors reviewed and contributed to the manuscript. SH coordinated the project.

Acknowledgements

We would like to thank all the patients and their families, as well as hospital and laboratory personnel involved in the study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.024>.

References

- [1] Tschudin-Sutter S, Lucet J-C, Mutters NT, Tacconelli E, Zahar JR, Harbarth S. Contact precautions for preventing nosocomial transmission of extended-spectrum β lactamase-producing *Escherichia coli*: a point/counterpoint review. *Clin Infect Dis* 2017;65:342–7.
- [2] Martischang R, Riccio ME, Abbas M, Stewardson AJ, Kluytmans JAJW, Harbarth S. Household carriage and acquisition of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: a systematic review. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2020;41:286–94.
- [3] Kluytmans-van den Bergh MF, Rossen JW, Bruijning-Verhagen PC, Bonten MJ, Friedrich AW, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Whole-genome multilocus sequence typing of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2016;54:2919–27.
- [4] Lohr IH, Rettedal S, Natas OB, Naseer U, Oymar K, Sundsfjord A. Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* following a nosocomial outbreak. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:1043–8.
- [5] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2640–4.
- [6] Davis S, Pettengill J, Luo Y, Payne J, Shpuntoff A, Rand H, et al. CFSAN SNP Pipeline: an automated method for constructing SNP matrices from next-generation sequence data. *PeerJ Comput Sci* 2015;1:e20.
- [7] Schurch 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;24:350–4.
- [8] Stewardson AJ, Vervoort J, Adriaenssens N, Coenen S, Godycki-Cwirko M, Kowalczyk A, et al. Effect of outpatient antibiotics for urinary tract infections on antimicrobial resistance among commensal *Enterobacteriaceae*: a multinational prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:972–9.
- [9] Samore MH, Tonnerre C, Hannah EL, Stoddard GJ, Borotkanics RJ, Haddadin B, et al. Impact of outpatient antibiotic use on carriage of ampicillin-resistant *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1135–41.
- [10] Vrieze SI. Model selection and psychological theory: a discussion of the differences between the Akaike information criterion (AIC) and the Bayesian information criterion (BIC). *Psychol Methods* 2012;17:228–43.
- [11] Haverkate MR, Platteel TN, Fluit AC, Cohen Stuart JW, Leverstein-van Hall MA, Thijsen SFT, et al. Quantifying within-household transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2017;23:46. e1–e7.
- [12] Arcilla MS, van Hattem JM, Haverkate MR, Bootsma MCJ, van Genderen PJJ, Goorhuis A, et al. Import and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Infect Dis* 2017;17:78–85.
- [13] Perez-Rodriguez F, Mercanoglu Taban B. A State-of-art review on multi-drug resistant pathogens in foods of animal origin: risk factors and mitigation strategies. *Front Microbiol* 2019;10:2091.
- [14] Kluytmans-van den Bergh MFQ, Bruijning-Verhagen PCJ, Vandenbroucke-Grauls C, de Brauwier E, Buiting AGM, Diederens BM, et al. Contact precautions in single-bed or multiple-bed rooms for patients with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Dutch hospitals: a cluster-randomised, crossover, non-inferiority study. *Lancet Infect Dis* 2019;19:1069–79.
- [15] Maechler F, Schwab F, Hansen S, Fankhauser C, Harbarth S, Huttner BD, et al. Contact isolation versus standard precautions to decrease acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriales* in non-critical care wards: a cluster-randomised crossover trial. *Lancet Infect Dis* 2020;20:575–84.
- [16] Duval A, Obadia T, Boelle PY, Fleury E, Herrmann JL, Guillemot D, et al. Close proximity interactions support transmission of ESBL-K. *pneumoniae* but not ESBL-E. *coli* in healthcare settings. *PLoS Comput Biol* 2019;15:e1006496.
- [17] Luangsanatip N, Hongsuwan M, Limmathurotsakul D, Lubell Y, Lee AS, Harbarth S, et al. Comparative efficacy of interventions to promote hand hygiene in hospital: systematic review and network meta-analysis. *BMJ* 2015;351:h3728.
- [18] Day MJ, Hopkins KL, Wareham DW, Toleman MA, Elviss N, Randall L, et al. Extended-spectrum beta-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;19:1325–35.
- [19] Rodriguez-Bano J, Lopez-Cerero L, Navarro MD, Diaz de Alba P, Pascual A. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1142–9.
- [20] Valverde A, Grill F, Coque TM, Pintado V, Baquero F, Canton R, et al. High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. *J Clin Microbiol* 2008;46:2796–9.
- [21] Lo WU, Ho PL, Chow KH, Lai EL, Yeung F, Chiu SS. Faecal carriage of CTXM type extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms by children and their household contacts. *J Infect* 2010;60:286–92.
- [22] Mihaila L, Wyplosz B, Clermont O, Garry L, Hipeaux MC, Vittecoq D, et al. Probable intrafamily transmission of a highly virulent CTX-M-3-producing *Escherichia coli* belonging to the emerging phylogenetic subgroup D2 O102-ST405 clone. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1537–9.
- [23] Hilty M, Betsch BY, Bogli-Stubler K, Heiniger N, Stadler M, Kuffer M, et al. Transmission dynamics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the tertiary care hospital and the household setting. *Clin Infect Dis* 2012;55:967–75.
- [24] Maataoui N, Langendorf C, Berthe F, Bayjanov JR, van Schaik W, Isanaka S, et al. Increased risk of acquisition and transmission of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in malnourished children exposed to amoxicillin. *J Antimicrob Chemother* 2020;75:709–17.

8.3 Contamination des zones humides des plaines alluviales du Doubs, de la Loue et de l'Ain par *K. pneumoniae* et *E. coli* pathogènes ou résistants aux antibiotiques

Résumé

La survie et la multiplication des bactéries pathogènes pour l'homme et résistantes aux antibiotiques dans les écosystèmes sont des phénomènes de plus en plus préoccupants mais qui ont été peu explorés. Les zones humides peuvent être contaminées par les flux d'eau provenant des rivières et peuvent présenter des conditions environnementales favorisant la survie et la multiplication des bactéries. Pour tester cette hypothèse, nous avons échantillonné 16 zones humides situées le long de trois rivières du Massif du Jura, en France. La contamination bactérienne des eaux des zones humides et des rivières ainsi que les caractéristiques physico-chimiques de l'eau ont été mesurés mensuellement sur un cycle d'un an. Nous avons évalué l'abondance de trois espèces pathogènes : *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. Les concentrations d'Ec-BLSE ont également été mesurées. Nos données montrent que les rivières transportent à la fois les isolats d'*E. coli* totaux, les Ec-BLSE et les isolats de *K. pneumoniae* vers les zones humides. Les Ec-BLSE ont peu survécu dans les zones humides, alors que les *E. coli* totaux et *K. pneumoniae* ont probablement rencontré des conditions physico-chimiques favorables à leur survie et à leur multiplication dans ces habitats. La concentration de *K. pneumoniae* a atteint son maximum en été dans les zones humides chaudes et peu profondes.

RESEARCH ARTICLE

Occurrence and ecological determinants of the contamination of floodplain wetlands with *Klebsiella pneumoniae* and pathogenic or antibiotic-resistant *Escherichia coli*

Charles P. Henriot^{1,2,*}, Daniel Martak^{1,3}, Quentin Cuenot¹, Christophe Loup¹, H el ene Masclaux¹, François Gillet^{1,2}, Xavier Bertrand^{1,3}, Didier Hocquet^{1,3,4} and Gudrun Bornette¹

¹ UMR CNRS 6249 Chrono-environnement, Université Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon, France, ²  cole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Route Cantonale, 1015 Lausanne, Suisse, ³ Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon, 3 boulevard A. Fleming, 25030 Besançon, France and ⁴ Centre de Ressources Biologiques Filière Microbiologie de Besançon, Centre Hospitalier Régional Universitaire, 25000 Besançon, France

*Corresponding author: UMR CNRS 6249 Chrono-environnement, Université Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon, France. Tel: +33 381666818; E-mail: charles.henriot@univ-fcomte.fr

One sentence summary: Hydrological connectivity and ecological conditions may favour the dispersal and survival of human-associated bacteria in rivers and their floodplains.

Editor: Martin Hahn

ABSTRACT

The survival and multiplication of human pathogenic and antibiotic-resistant bacteria in ecosystems is of increasing concern but has been little explored. Wetlands can be contaminated by water fluxes from rivers and may present environmental conditions leading to bacterial survival and multiplication. To test this hypothesis, we sampled 16 wetlands located along three rivers of the Jura Massif, France. The bacterial contamination of the wetland and river waters was measured monthly over a one-year cycle together with the water physico-chemical characteristics. We assessed the abundance of three pathogenic species: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The concentrations of *E. coli* producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL *E. coli*) or belonging to the phylogenetic group B2 (*E. coli* B2–more pathogenic) were also measured. We found that rivers carried total *E. coli*, ESBL *E. coli*, and *K. pneumoniae* to wetlands. ESBL *E. coli* poorly survived in wetlands, whereas total *E. coli* and *K. pneumoniae* possibly met favourable physico-chemical conditions for survival and multiplication in these habitats. *K. pneumoniae* peaked in summer in warm and shallow wetlands. Total *E. coli* and *E. coli* B2 potentially reached wetlands through sources other than rivers (hillslope groundwater or leaching from contaminated fields).

Received: 29 January 2019; Accepted: 20 June 2019

  FEMS 2019. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Keywords: antibiotic-resistance; pathogens; ecological niche; public health; wetlands; hydrological connectivity

INTRODUCTION

Human activities frequently release bacteria into the environment through point sources (e.g. wastewater treatment plants (WWTPs) and farms) and non-point sources (e.g. rainwater runoff, sewage sludge and manure). Some of these bacteria can be pathogenic to humans, and others are resistant to antibiotics, leading to sanitation issues and consequent risk (Gupta, Hooton and Stamm 2001; Rodríguez-Baño et al. 2008).

Pathogenic bacteria generally spread through water contaminated by human or cattle faeces (Cabral 2010). They mostly originate from municipal sewage (Cabral 2010) and agricultural practices that spread manure (Guan and Holley 2003; Cabral 2010) and contaminated sewage sludge (Niu and Phanikumar 2015; Su et al. 2015; Chen et al. 2016) in agricultural lands. Pathogens contaminate most areas of the environment, including agricultural watersheds (Jamieson et al. 2004), reservoirs and lakes (Brookes et al. 2004) and groundwater (John and Rose 2005). The Environmental Protection Agency of the United States of America (USA EPA), which monitors the quality of water bodies, estimated that pathogenic bacteria contaminated more than 480 000 km of rivers and shorelines, and two million ha of lakes in the USA (USA EPA 2010).

Antibiotic-resistant bacteria originate from hospitals (Hocquet, Muller and Bertrand 2016), WWTP effluents (Young, Juhl and O'Mullan 2013; Amos et al. 2014) and sewage sludge and animal slurry in farmland (Byrne-Bailey et al. 2009). Soils, surface waters (e.g. seas and rivers) and sediments are contaminated by these bacteria, which harbour a large array of antibiotic resistance genes (ARGs; Leonard et al. 2015). Given the increasing global spread of antibiotic-resistant bacteria, contaminated ecosystems have to be monitored.

The dispersal of bacteria in floodplains depends upon their survival during vertical (from soil to groundwater), lateral (from rivers to wetlands) and longitudinal water fluxes (via the upstream and downstream flow of river water). Their survival relies on both abiotic (e.g. ecosystem characteristics and pollutants such as antibiotics or chemicals (Lim and Flint 1989; Beaudreau et al. 2001; Joint et al. 2002; Jonsson and Agerberg 2015)) and biotic parameters (e.g. competition with autochthonous microbial communities and predation (Flint 1987; Beaudreau et al. 2001)). Some authors have observed the spread of contamination in rivers (Chu et al. 2014), and others have proposed models of bacterial mobility in streams (Niu and Phanikumar 2015). Thus, freshwater ecosystems, particularly rivers, are suspected to play an important role in the dispersion of human-associated bacteria into the environment and to serve as reservoirs that can potentially lead to human contamination. However, little is known about bacterial dispersion throughout entire hydrologic networks, and riverine annexes have generally been excluded from previous studies; this paper proposes to remedy this.

Floodplain wetlands are particularly vulnerable to bacterial contamination because they are connected to potentially contaminated rivers through overflows and backflows during floods and through seepage water that flows from rivers to wetlands through coarse sediment (Bornette et al. 1998; Amoros and Bornette 2002). The functioning of floodplain wetlands (in terms of the kinetics and intensity of the biological activity from microorganisms to animal and plant macroorganisms as well as the structure and complexity of food webs) is directly governed by the geological and climatic environment in addition to the

hydrogeological, geomorphological and anthropogenic contexts (Bornette et al. 2008). These features control the connectivity of wetlands with their hydrological environment (aquifers, rivers) and the physico-chemical characteristics of the water (Amoros and Bornette 2002). Some studies have outlined the roles of nutrients and temperature in determining the bacterial community structure in riverine lakes (Kalcheva et al. 2016). However, these relationships (especially those concerning temperatures) vary between different studies and according to the bacteria that are considered (Beaudreau et al. 2001; Schulz and Childers 2011; Kalcheva et al. 2016).

Wetlands and rivers support human recreational activities such as fishing and bathing. Floodplain wetlands are abundant along rivers (Yang et al. 2016) and may constitute reservoirs for human-associated bacteria because they are potentially nutrient-rich and connected to contaminated rivers and groundwater. The role of natural environments in the transmission of antibiotic-resistant pathogens is poorly understood. However, contamination of water with antibiotic-resistant pathogens could present a risk for water users (Leonard et al. 2018). The role of such aquatic ecosystems in the dispersion of pathogenic and antibiotic-resistant bacteria into the environment should therefore be assessed.

The present study aimed to determine (i) whether river and wetland contamination are similar, which would suggest transversal dispersal between rivers and their riverine aquatic habitats and (ii) whether wetland contamination is related to wetland ecological characteristics in terms of the physico-chemical characteristics of water, including the thermal regime and the nutrient concentrations.

To achieve these objectives, the occurrence and abundance of bacteria and the physico-chemical characteristics of water were measured monthly for a year in 16 wetlands belonging to three river floodplains. This study focused on three bacteria of major concern for humans: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *E. coli* is one of the main pathogens responsible for community infections (Gupta, Hooton and Stamm 2001; Cabral 2010). *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* are markers of the contamination of wastewater networks due to hospital activity (Slekovec et al. 2012). *E. coli* and *P. aeruginosa* are also good markers of the overall level of bacterial resistance to antibiotics because they easily accumulate resistance determinants (Lautenbach et al. 2001; Slekovec et al. 2012; Hocquet, Muller and Bertrand 2016).

MATERIALS AND METHODS

Studied wetlands

The 16 wetlands studied were distributed along a wide gradient of eutrophication (in terms of nitrogen, phosphorus and organic carbon concentrations in the water) and thermal variability. They were distributed along the lower floodplains of three karstic rivers of the Jura Massif: the Ain, Doubs and Loue Rivers (Fig. 1). To compare the wetlands and rivers, we selected one river sampling station per floodplain that was located as close as possible to the sampled wetlands (Ain River: 45°57'50"N, 05°15'2"E; Doubs River: 46°55'22"N, 05°20'59"E; Loue River: 47°00'53"N, 05°29'39"E). The Ain River has an average monthly discharge of 109.2 m³.s⁻¹, the Doubs River has an average monthly discharge of 161.8 m³.s⁻¹ and the Loue River has

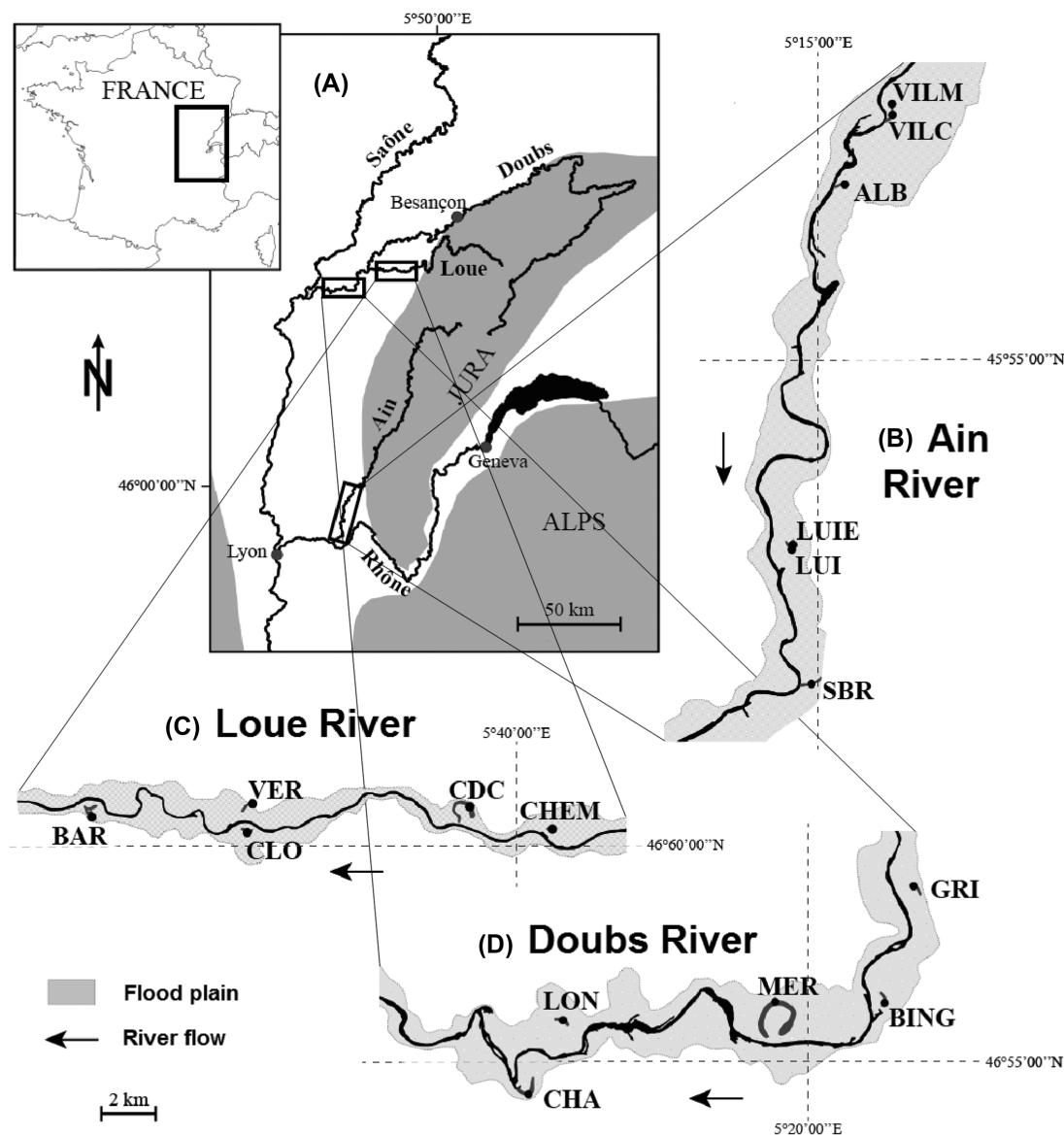


Figure 1. Locations of the 16 studied wetlands. The top left panel represents the locations of the three considered hydrosystems in France. **A.** Location of the river network under study on the map of France. Boxes indicate the locations of the river sections shown in panels b, c and d. The three other panels indicate the wetland locations along the three river sections. **B.** The Ain River, from upstream to downstream: VILM (Vilette Amont), VILC (Vilette Centre), ALB (L'Albarine), LUIE (Le Luizard Est), LUI (Le Luizard) and SBR (Sous-Bresse). **C.** The Loue River, from upstream to downstream: CHEM (Chemillière), CDC (Champs des Creux), CLO (Le Clos), VER (La Verne) and BAR (Le Baraquier). **D.** The Doubs River, from upstream to downstream: GRI (Grimonts), BING (Bras des Ingles), MER (Mératon), LON (Longepierre) and CHA (Charette).

an average monthly discharge of $49.0 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (www.eaufrance.fr, last consultation: 24 October 2017). The three hydrosystems are located in a temperate climate. All but one wetland remained aquatic during the summer. The substrate is usually fine-grained and ranges from silt to clay and/or peat.

Each wetland and river were sampled monthly over a one-year cycle to take into account seasonal hydrological and climatic variability. The sampling took place from April 2015 to March 2016 for physico-chemical characterisation and bacterial quantification.

Physico-chemical characteristics of the water

We measured nine parameters that have been demonstrated to be related to ecosystem functioning and/or to potentially

drive bacterial survival and multiplication: water temperature (Sakura 1993; Beaudreau et al. 2001; Bornette et al. 2008; Schulz and Childers 2011; Blaustein et al. 2013), electrical conductivity and pH (Maberly and Spence 1989; Bornette et al. 2008), dissolved oxygen (Doughari et al. 2012; Gu et al. 2012), nitrate, ammonium, phosphate and dissolved organic carbon (DOC) concentrations (Lim and Flint 1989; Coffin, Connolly and Harris 1993; Hong, Qiu and Liang 2010), and chlorophyll-a concentration (Arthaud et al. 2012).

Water temperature was measured daily at each solar hour using immersed probes (HOBO UTBI-001 Tidbit®, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA). One temperature probe was placed at the bottom of each site (16 wetlands and three rivers) at the beginning of the sampling period that automatically returned the temperature each solar hour during the

one-year cycle sampling period. Both the pH and the electrical conductivity (Robach et al. 1996) were measured *in situ* at a 10-cm water depth using a WTW pH sensor (SenTix® 41, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) and a WTW conductivity sensor (TetraCon® 325, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA), respectively. The dissolved oxygen was measured using a WTW oxygen sensor (CellOx® 325-3, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA). To determine the concentrations of nitrate, ammonium, phosphate and DOC, 500 ml of water was collected and filtered through 0.2-µm polycarbonate filters and analysed within 48 h of collection. The samples were kept at 4°C throughout the process. The P-phosphate (P-PO₄³⁻) concentration was measured using the molybdenum blue colouration method after acidification. The N-ammonium (N-NH₄⁺) concentration was measured using the indophenol blue method (Berthelot's reaction, Merck Spectroquant 14 752). The N-nitrate (N-NO₃⁻) concentration was measured using a Dionex ICS-1000 ion chromatograph. The DOC concentration was measured using a total organic carbon (TOC) analyser (Vario TOC Cube, Elementar, Stuttgart, Germany). To assess the chlorophyll-a concentration, 3 L of water was collected and then filtered through a 200-µm filter to remove zooplankton and any detritus, after which it was filtered through 0.7 µm filters. 0.7-µm filters were stored at -20°C until extraction (overnight at 4°C in acetone (90%)). The chlorophyll-a concentration was measured the next day using a spectrophotometer (the measurements were conducted at λ = 630, 645 and 663 nm (Yentsch and Menzel 1963)).

Connectivity between wetlands and rivers

To characterise the connectivity between rivers, groundwater and wetlands, we used the temperature, because it is the only physico-chemical parameter that was easily measurable and allowed comparison of connectivity among rivers (Sakura 1993; Brodie et al. 2007). Groundwater temperature is stable throughout the year, whereas the temperature of surface water varies greatly on a daily and seasonal basis (Kalbus, Reinstorf and Schirmer 2006). We measured the temperatures in rivers and wetlands according to the same protocol, so we were able to compare the values. Consequently, the connectivity between rivers, groundwater and wetlands was estimated based on the thermal contrast between each wetland and its connected river (Kalbus, Reinstorf and Schirmer 2006; Brodie et al. 2007; Kløve et al. 2011). The higher the thermal stability of the wetland compared to the river, the higher the connectivity between the wetland and groundwater was and the lower the connectivity between the wetland and the river was. For each wetland, linear regressions ($y = a x + b$) were calculated between the wetland (y) and river (x) temperatures, which were both taken monthly at 7:00 am (UTC) to avoid biases due to daily warming. The *a* (slope) value directly relates wetland and river temperatures and can thus be considered to be the thermal variation coefficient of the wetlands according to river temperature fluctuations (hereafter referred to as the 'connectivity index'). The *b* (intercept) value represents the thermal inertia of the wetlands. *a* and *b* are inversely related ($R^2 = 0.95$).

Bacterial sampling

Samples of water (250 ml) were collected in sterile conditions and stored at 4°C before analysis, which occurred within 8 h of collection. The total concentrations of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* were measured as previously described (Slekovec et al. 2012; Bréchet et al. 2014). Aliquots of water (100 ml) were

filtered through 0.45-µm membranes, which were then placed onto a Drigalski agar plate to measure the total *E. coli* and *K. pneumoniae* concentrations (Oxoid), a Cetrimide agar plate to measure the *P. aeruginosa* concentration (Bio-Rad) and a chromID ESBL agar plate to measure the concentration of *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), which are resistant to β-lactam antibiotics. When we suspected high bacterial concentrations, we plated 500 µl an additional of sample on the selective media. The plates were incubated for 24 h at 37°C. Colonies were counted and classified according to their phenotype. Each type of colony was identified using a MALDI-TOF MS spectrometer (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

For each morphotype of *E. coli* growing on chromID ESBL, the production of ESBL was detected using a synergy test following the recommendations of the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology (CA-SFM, <http://www.sfm-microbiologie.org/>, last consultation: 10 November 2018). We also assessed the activity of 16 antibiotics alone or with inhibitors (amoxicillin (AMX), amoxicillin-clavulanate (AMC), amikacin (AKN), cefalexin (CXN), cefepime (FEP), cefotaxime (COX), ceftazidime (CZD), ciprofloxacin (CIP), cotrimoxazole (SXT), ertapenem (ETP), ofloxacin (OFX), piperacillin-tazobactam (PTZ), ticarcillin (TIC), ticarcillin-clavulanate (TCC) and tobramycin (TMN)). The results were interpreted according to the EUCAST 2017 recommendations (www.eucast.org, last consultation: 10 November 2018). For each water sample, we stored an isolate representing each antibiotype in brain heart infusion broth supplemented with 30% glycerol at -80°C until further analysis. *E. coli* forms phylogroups with various pathogenic behaviours; *E. coli* sequence types belonging to the B2 phylogroup are the most pathogenic for humans (Tourret and Denamur 2016). All *E. coli* isolates, regardless of their antibiotype, were typed by phylogrouping as previously described (Clermont et al. 2013).

Consequently, the bacterial data set consisted of the concentrations of total *E. coli* (hereafter 'total *E. coli*'), ESBL-producing *E. coli* (hereafter 'ESBL *E. coli*'), *E. coli* phylogroup B2 (hereafter '*E. coli* B2'), *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* in each water sample. For all bacterial concentrations, the detection limit was 1 bacterium per 100 ml.

Statistical analyses

The normality and homoscedasticity of the data were tested using the Shapiro-Wilk test and Levene's test, respectively. The bacteriological data set was over-dispersed (variance >> mean).

We first analysed the bacterial abundances using Kruskal-Wallis rank sum tests to highlight significant bacterial variation through space and time. To do so, several potential levels of spatial variation were considered: (i) the total variability (across the 16 wetlands and three rivers), (ii) the contrast between rivers and wetlands, (iii) the variation among the whole set of wetlands (all 16 wetlands), (iv) the variation among the rivers (all three rivers), (v) the variation among the hydrosystems (the 16 wetlands and three rivers grouped according to hydrosystem) and (vi, vii and viii) the variation among wetlands within a given hydrosystem (among the wetlands of the Ain, Doubs and Loue hydrosystems, respectively). Concerning temporal variation, we considered either the individual months or seasons by grouping the months according to season (March to May for spring, June to August for summer, September to November for autumn and December to February for winter).

To identify which sites and dates had significantly lower or higher bacterial values than the others, after the Kruskal–Wallis tests, a pairwise comparison test was performed (Dunn's rank sum test). Dunn's test identifies any significantly different groups but does not order them. Therefore, to do this, we compared the bacterial abundances of the identified groups with the mean bacterial abundance of the other groups.

To determine the physico-chemical determinants of pathogenic bacteria survival in wetlands, we used negative binomial generalised linear models (nbGLMs) to decrease the over-dispersion of the bacterial data set (dispersion parameter < 1 after the application of a nbGLM). A nbGLM was used to successively analyse (i) the whole wetland data set to identify the wetlands and environmental characteristics associated with bacterial occurrence and abundance and (ii) the data from the wetlands where the bacterial abundance was significantly higher than that in the others according to the previously performed Dunn's tests to identify the environmental characteristics that allow bacterial survival and/or multiplication in these wetlands. The connectivity index (a) and the river flows were added as explanatory variables in the two nbGLMs. We compared the fitted nbGLMs with the corresponding null model by using an ANOVA function to determine the significance of the model. Finally, we had to take into account the relationships between the explanatory variables and bacterial contamination that are specific to wetlands, independently of an effect related to the river to which the wetland belongs. For example, if a river feeds wetlands with both nutrient-rich water and bacteria, these two parameters will obviously correlate in these wetlands, irrespective of what happens in that potential niche. We thus had to consider any 'river effect' that may affect the wetlands connected to a particular river. To do so, we used Spearman correlation tests. Correlations between the physico-chemical characteristics and bacterial contamination in wetlands that already existed in rivers were not taken into account when assessing which parameters may specifically regulate bacterial occurrence in wetlands, and were removed from the analysis.

The α value was set to 0.05. All analyses were performed with R 3.4.3 software (R Core Team packages 2017).

RESULTS

Connectivity between wetlands and rivers

CHEM was the most connected wetland, with a connectivity index > 1 (Table 1), meaning that its water is heated faster than the river water and that it is likely very poorly connected to the groundwater. VILM and ALB showed low thermal variation (Table 1), suggesting very high connectivity to the groundwater. The other wetlands were distributed between these two extremes (Table 1), illustrating that they are probably supplied by both river water and groundwater.

Spatio-temporal variability in the bacterial abundances

Over the study period, 224 samples were collected, as one wetland was dry on four sampling dates (LUIE). *E. coli*, ESBL *E. coli*, *E. coli* B2 and *K. pneumoniae* occurred in 150/224 (67.0%), 50/224 (22.3%), 38/224 (17.0%) and 47/224 (21.0%) of the samples, respectively. The spatial bacterial abundances of *E. coli*, ESBL *E. coli*, *E. coli* B2 and *K. pneumoniae* in wetlands and rivers are grouped and shown in Fig. 2. Unexpectedly, *P. aeruginosa* was only detected in four samples among the 224 tested (1.8%): one sample from VILC (1 CFU/100 ml, 28 April 2015), one sample from the Ain River (3

Table 1. Connectivity levels between wetlands and rivers based on the thermal contrast between a river and its associated wetlands. 'a' (slope) and 'b' (y-intercept) are indicated for each regression between wetland temperatures and river temperatures. Higher 'a' values indicate a higher thermal proximity between the wetland and its river, and so a higher connexion.

Floodplain	Wetland	a (connectivity index)	b	R ²
Ain	ALB	0.1828	9.8539	0.63
	LUI	0.528	5.7617	0.98
	LUIE	0.7316	3.0569	0.89
	SBR	0.8154	3.1248	0.95
	VILC	0.5667	5.2124	0.93
Doubs	VILM	0.2156	10.03	0.34
	BING	0.655	3.3996	0.94
	CHA	0.7945	2.3925	0.69
	GRI	0.6499	3.9977	0.85
	LON	0.6949	2.0662	0.87
Loue	MER	0.6784	5.0013	0.94
	BAR	0.577	5.239	0.83
	CDC	0.6218	4.7856	0.92
	CHEM	1.1187	-1.5346	0.95
	CLO	0.5815	4.4202	0.94
	VER	0.7669	2.2217	0.94

CFU/100 ml, 28 April 2015) and two samples from CHA (1 CFU/100 ml, 2 February 2016, and 1000 CFU/100 ml, 2 March 2016). Thus, *P. aeruginosa* was not considered in the statistical analyses.

The abundances of the bacterial groups (all groups but *P. aeruginosa*) did not differ among the rivers or the hydrosystems (a given river and its wetlands; Table 2).

Total *E. coli*

Spatially, the rivers were significantly more contaminated than the wetlands by total *E. coli* (Table 2). However, the total *E. coli* concentration did not differ among the wetlands (Table 2), although the wetlands differed in their connectivity to the rivers. Moreover, certain wetlands were more contaminated than their corresponding river on some dates (Fig. 2(A)); this was particularly true for SBR, which was more contaminated by total *E. coli* than the other wetlands in the Ain hydrosystem.

Total *E. coli* abundance did not increase during winter in wetlands, in contrast with its increase in rivers during this high-flow period (Table 2). We measured a peak in the total *E. coli* contamination in wetlands in September (Table 2 and Fig. 3(A)) during a peak of precipitation after a dry period in the three studied floodplains (Météo France, stations of Ambérieu-en-Bugey (station 01089001), Chamblanc (station 21131001) and Tavaux (station 39526003)).

ESBL *E. coli*

Regarding its spatial distribution, ESBL *E. coli* was always more abundant in rivers than in wetlands (Table 2 and Fig. 2(B)), even when the three hydrosystems were considered separately (Kruskal–Wallis *P*-values: Ain: < 0.01 , Doubs: < 0.05 , Loue: < 0.001). Moreover, ESBL *E. coli* concentrations were higher in CHA (the most connected wetland of the Doubs hydrosystem), GRI, CHEM (the most connected wetland of the Loue hydrosystem), LUI and VILC (the two most connected wetlands of the Ain hydrosystem; Table 2).

Figure S1 shows the distribution of the bacterial concentrations in each wetland on each sampling date according to

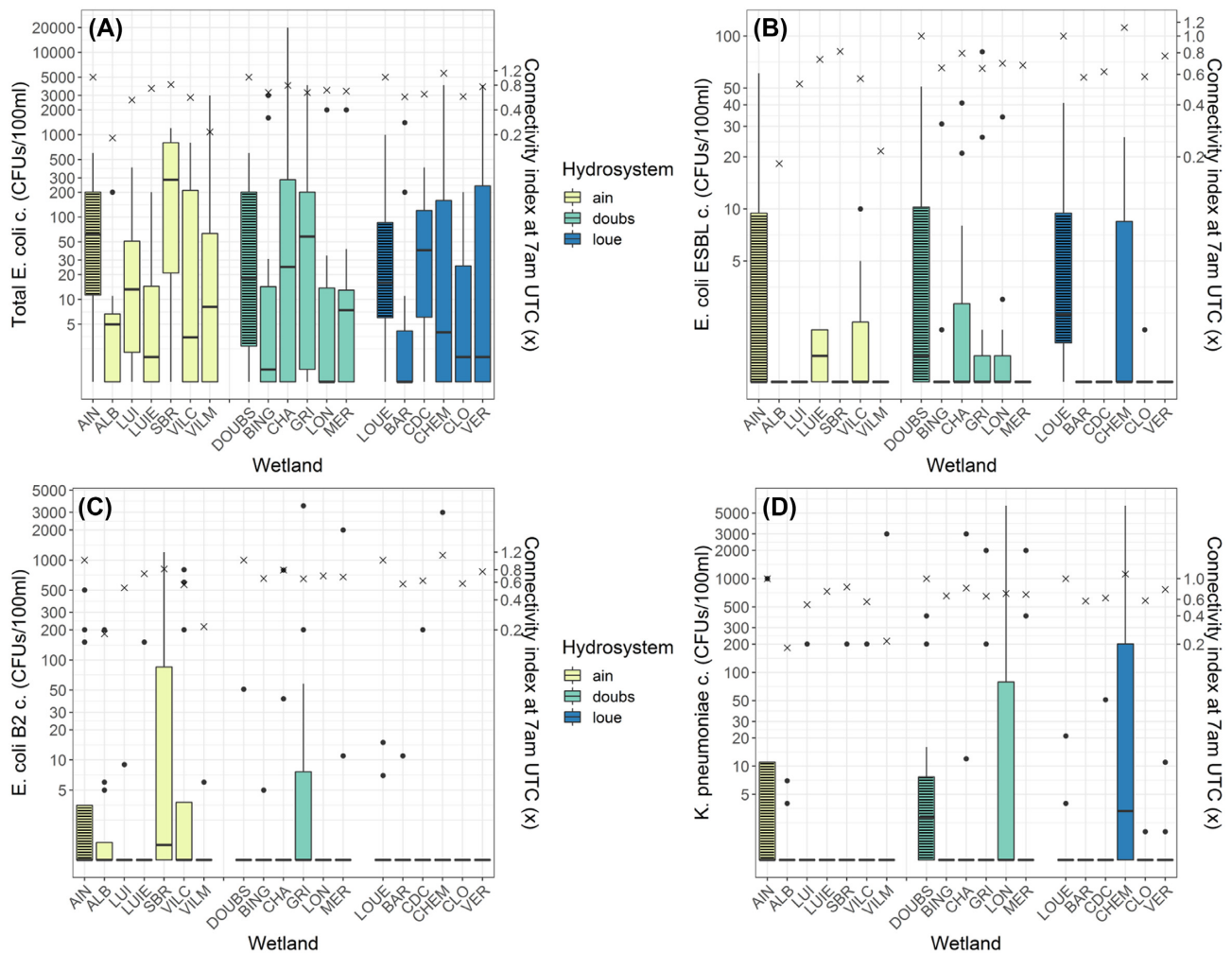


Figure 2. Concentrations (‘c.’) of pathogenic bacterial species in rivers and their wetlands. A. Total *E. coli*, B. ESBL *E. coli*, C. *E. coli* B2, and D. *K. pneumoniae* across space (sites) and according to the connectivity between wetlands and their associated rivers (connectivity index, crossed points on the graph). Logarithmic scale. Yellow: Ain sites, green: Doubs sites, blue: Loue sites. Cross-hatched boxplots represent the bacterial concentration of rivers. Dots represent boxplot outliers. Crosses represent the connectivity index of each site.

the temperature contrast between the wetland and its associated river on the same date. ESBL *E. coli* was more abundant in the water samples from wetlands that were thermally similar to their associated river, which highlighted their connection (Kruskal-Wallis test, P -value < 0.001 , and Dunn’s test significant for $|\Delta T| \leq 1^\circ\text{C}$, $\Delta T = T_{\text{wetland}} - T_{\text{river}}$).

Regarding the temporal dispersion, the ESBL *E. coli* abundance decreased during summer and increased during winter, specifically in February and March, when the whole data set and the wetland data set were considered (Table 2 and Fig. 3(B)).

E. coli phylogroup B2

In this study, the *E. coli* B2 concentrations did not vary spatially (Table 2).

Within the three rivers, we measured higher abundances of *E. coli* B2 in September (Table 2). In wetlands, *E. coli* B2 abundance did not vary according to months or seasons. In SBR (the wetland showing the highest *E. coli* B2 concentrations; Fig. 2(C)), contamination by *E. coli* B2 increased in September (without reaching a significant level; Kruskal-Wallis test, P -value = 0.069, and Dunn’s test), despite its low connectivity to the river.

Total *K. pneumoniae*

Spatially, *K. pneumoniae* was more abundant in rivers than in wetlands (Table 2). Moreover, CHEM and LON (2 wetlands highly connected to their river) contained more *K. pneumoniae* than the other wetlands (Table 2 and Fig. 2(D)).

Considering all wetlands of the three hydrosystems, *K. pneumoniae* was more abundant in August and September (Table 2, Fig. 3(D)).

Antibiotic resistance profiles of ESBL *E. coli*

The antibiotic resistance profiles of ESBL *E. coli* are shown in Table S1. Of the ESBL *E. coli* that were found, 50/50 (100%) were resistant to amoxicillin, 11/50 (22%) to amoxicillin-clavulanate, 47/50 (94%) to cefalexin, 15/50 (30%) to cefepime, 46/50 (92%) to cefotaxime, 3/50 (6%) to cefoxitin, 20/50 (40%) to ceftazidime, 26/50 (42%) to ciprofloxacin, 30/50 (60%) to cotrimoxazole, 26/50 (52%) to ofloxacin, 3/50 (6%) to piperacillin-tazobactam, 50/50 (100%) to ticarcillin, 29/50 (58%) to ticarcillin-clavulanate and 13/50 (26%) to tobramycin. The ESBL *E. coli* were fully susceptible to amikacin and ertapenem.

Table 2. Spatio-temporal variability in bacterial abundances. Significance of the Kruskal-Wallis test performed on bacterial abundances (P -value: $x > 0.05 > * > 0.01 > ** > 0.001 > ***$) followed by Dunn's tests if significant. In the table, the groups identified by Dunn's test are followed by their position according to the rest of the data (significantly higher (\uparrow) or lower (\downarrow) bacterial abundance).

Bacteria considered	Contrast between rivers and wetlands	Total variability	Variation among wetlands	Variation among rivers	Variation among hydrosystems	Variation among wetlands of the Ain hydrosystem	Variation among wetlands of the Doubs hydrosystem	Variation among wetlands of the Loue hydrosystem
Total <i>E. coli</i>	* river, \uparrow	x	x	x	x	x	* SBR, \uparrow	x
ESBL <i>E. coli</i>	*** river, \uparrow	*** Ain, \uparrow ; Doubs, \uparrow ; Loue, \uparrow ; CHA, \uparrow ; CHEM, \uparrow ; LUIE, \uparrow	*** CHA, \uparrow ; CHEM, \uparrow ; GRI, \uparrow ; LUIE, \uparrow ; VILC, \uparrow	x	x	x	x LUIE, \uparrow ; VILC, \uparrow	* CHEM, \uparrow
<i>E. coli</i> B2	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>K. pneumoniae</i>	** river, \uparrow	** Ain, \uparrow ; Doubs, \uparrow ; CHEM, \uparrow ; LON, \uparrow	* CHEM, \uparrow ; LON, \uparrow	x	x	x	x	** CHEM, \uparrow
TEMPORAL VARIABILITY – SEASONS								
Total <i>E. coli</i>	-	** summer, \downarrow	* summer, \downarrow	*** summer, \downarrow ; winter, \uparrow	-	x	** summer, \downarrow	* autumn, \uparrow
ESBL <i>E. coli</i>	-	*** summer, \downarrow ; winter, \uparrow	*** summer, \downarrow ; winter, \uparrow	*** summer, \downarrow ; winter, \uparrow	-	x	*** winter, \uparrow	* winter, \uparrow
<i>E. coli</i> B2	-	x	x	x	-	x	x	x
<i>K. pneumoniae</i>	-	x	x	x	-	* autumn, \uparrow	x	x
TEMPORAL VARIABILITY – MONTHS								
Total <i>E. coli</i>	-	* September, \uparrow	* September, \uparrow	* August, \downarrow ; November, \downarrow	-	x	x	x
ESBL <i>E. coli</i>	-	*** February, \uparrow ; March, \uparrow	** February, \uparrow ; March, \uparrow	* February, \uparrow	-	x	* December, \uparrow ; January, \uparrow ; February, \uparrow	x
<i>E. coli</i> B2	-	x	x	* September, \uparrow	-	x	x	x
<i>K. pneumoniae</i>	-	x	** August, \uparrow ; September, \uparrow	x	-	** August, \uparrow ; September, \uparrow	x	x

Physico-chemical determinants of pathogenic bacteria survival in wetlands

In the three rivers, the total *E. coli* abundances were negatively correlated with the river temperature (-0.41 , $P < 0.05$). The abundance of ESBL *E. coli* in the rivers was positively correlated with the phosphate (0.77 , $P < 0.001$), ammonium (0.35 , $0.01 < P < 0.05$), nitrate (0.41 , $P < 0.05$) and chlorophyll-a (0.48 , $P < 0.01$) concentrations and negatively correlated with the temperature (-0.46 , $P < 0.01$) and pH (-0.38 , $P < 0.05$). The *E. coli* B2 concentrations in the rivers did not correlate with any of the river water physico-chemical parameters. The *K. pneumoniae* concentrations in the river water were positively correlated with both the phosphate (0.92 , $P < 0.001$) and ammonium (0.46 , $P < 0.01$) concentrations.

The following results and discussions take into account the 'river effect' (from previous Spearman correlations obtained for the rivers; see Materials and Methods).

Within the 16 wetlands, the total *E. coli* concentration had positive regression coefficients with pH and the nitrate and phosphate concentrations (Table 3).

The ESBL *E. coli* concentration had a significant regression coefficient solely with the connectivity index in the 16 wetlands (Table 3). Among the wetlands highlighted previously based on the results of Dunn's test (Table 2), the ESBL *E. coli* concentrations were still highly related to connectivity in CHA, CHEM and GRI (Table 3).

The *E. coli* B2 concentration was not related to wetland connectivity with the river or water characteristics (Table 3). The corresponding nbGLM was not significant (Table 3).

The *K. pneumoniae* concentration had positive regression coefficients with both temperature and pH and a negative coefficient with dissolved oxygen in the 16 wetlands (Table 3). The

data from CHEM and LON (highlighted previously in Table 2) seemed to confirm these regression coefficients and additionally produced a significant and positive regression coefficient between the *K. pneumoniae* concentration and the nitrate concentration (Table 3). However, the nbGLM obtained for CHEM and LON was not significant (Table 3).

DISCUSSION

Connectivity between wetlands and rivers

The assessment of the connectivity between wetlands and rivers based on the thermal variability were generally congruent with the field observations. Only the connectivity of SBR with its river may have been over-estimated because this wetland is chemically similar to the groundwater (Bornette et al. 1998) but was partly dug out by farmers, leading to a strong increase in the hydraulic capacity of its upper section and favouring water stagnation and high temperature. Moreover, the assessment of the connectivity based on the thermal variability is also highly correlated (Pearson correlation) with the physical characteristics of the wetland waters such as pH ($r = 0.63$) and dissolved oxygen ($r = 0.57$). Indeed, pH is generally lower in groundwater than in rivers in the karstic environment of our study, and dissolved oxygen is generally lower, but more stable, in groundwater than in rivers. In contrast, the connectivity index was not correlated with the water conductivity.

Among the three hydrosystems, the Doubs wetlands were rather homogeneous in terms of connectivity, while the Ain wetlands were more heterogeneous and generally had low river connectivity, which is potentially due to the incision process taking place in the Ain River that increases connectivity between

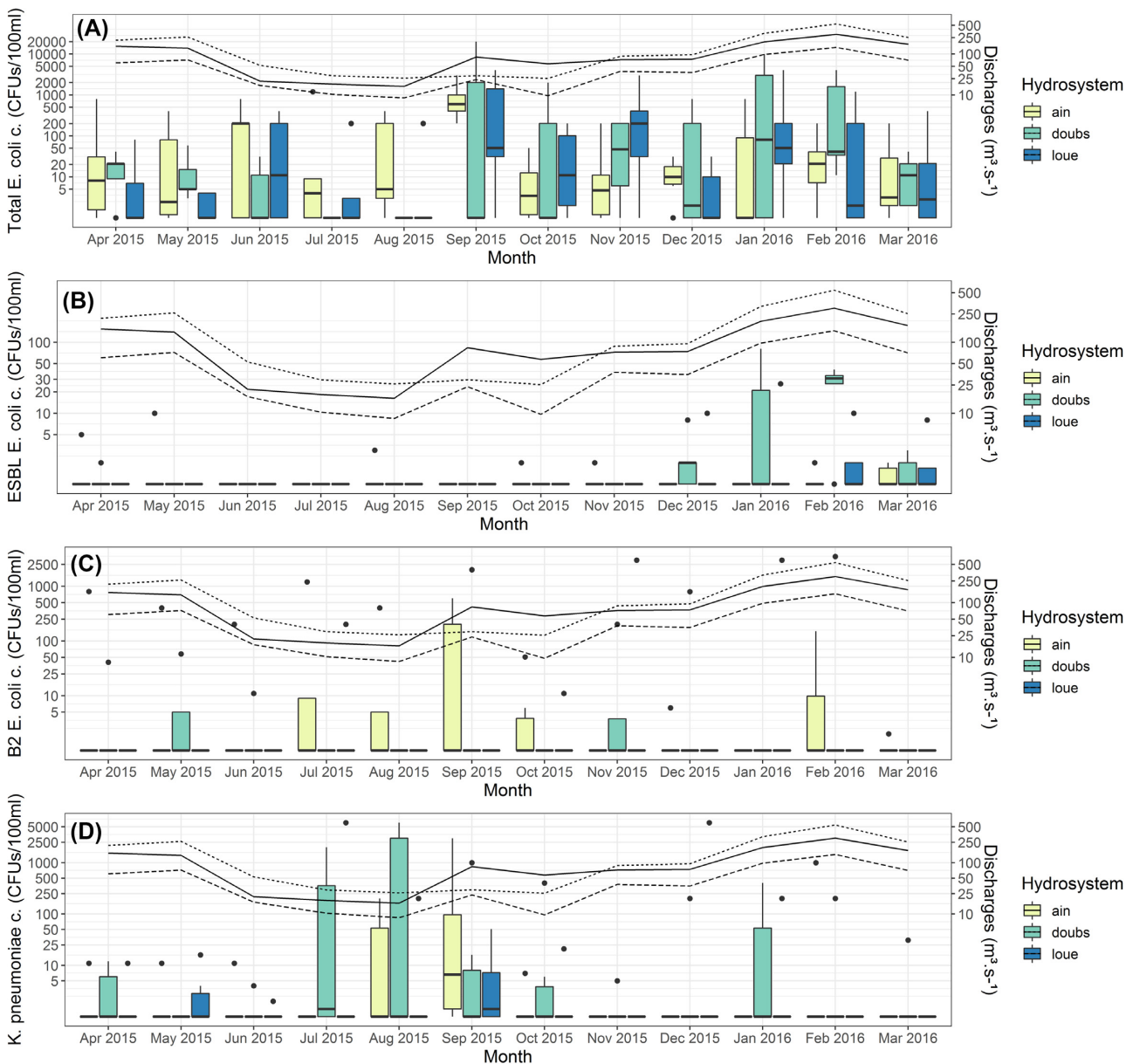


Figure 3. Temporal variation in the concentrations ('c.') of pathogenic bacterial species in wetlands. **A.** Total *E. coli*, **B.** ESBL *E. coli*, **C.** *E. coli* B2, and **D.** *K. pneumoniae* in the 16 wetlands over time (months) and according to river flows. Logarithmic scale. Yellow: Ain wetlands, green: Doubs wetlands, blue: Loue wetlands. Lines indicate the temporal change in the water flows (monthly averaged values) of the three rivers. Solid lines: Ain River, dotted lines: Doubs River, dashed lines: Loue River. Dots represent boxplot outliers.

wetlands and hillslope aquifers (Bravard et al. 1997) and consequently decreases wetland temperature.

The specific case of *P. aeruginosa*

P. aeruginosa is highly concentrated in hospital effluents (Kerr and Snelling 2009; Slekovec et al. 2012; Hocquet, Muller and Bertrand 2016) and can survive in multiple environments (Wheater et al. 1980; Pirnay et al. 2005). It is thus considered to be an anthropogenic marker in natural environments (Wheater et al. 1980). Our data suggest either a high capability of WWTPs to remove *P. aeruginosa* from the water, or a low capacity of *P. aeruginosa* to survive in the Ain, Doubs and Loue Rivers. As we only quantified culturable bacteria, quiescent bacteria may not have been detected.

River contamination

We first hypothesised that the Doubs River was more contaminated than the other two rivers because the studied section was more populated and includes the cities of Besançon (120 000 inhabitants) and Dole (25 000 inhabitants) upstream, both of which contain a hospital. The studied section of the Ain River is located downstream from a city with 15 000 inhabitants and a hospital (Ambérieu-en-Bugey). The studied section of the Loue River is the only section that is not located downstream from such a source of contamination. Despite these contrasting situations, the abundances of the bacterial groups did not differ among the rivers or the hydrosystems (a river and its wetland). The lack of differences in river contamination can be attributed to the fact that we only sampled one river sampling station

Table 3. Results of the nbGLMs performed on the bacteriological data and physico-chemical characteristics of 1) all wetlands and 2) the wetlands identified by Dunn's tests (Table 2). The 'Model P-value' is the P-value of the ANOVA performed between each pair of nbGLM and null model. Only correlations that may not relate to river-wetland connectivity (i.e. the 'river effect', see Materials and Methods) were considered (bolded values). P-value: * <0.05 <** <0.01 <*** <0.001.

	1)				2)			
	Total <i>E. coli</i>	ESBL <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> B2	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	Total <i>E. coli</i>	ESBL <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> B2	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>
Considered wetlands	all	all	all	all	-	CHA, CHEM, GRI	-	CHEM, LON
Model p-value	7.91.10⁻⁸	1.88.10⁻¹⁰	0.256	0.00230	-	1.09.10⁻⁸	-	1
Temperature	-0.04	-0.39 **	-0.04	0.51 *	-	-0.44 *	-	1.34 *
pH	4.69 ***	2.51	4.51	7.06 **	-	0.83	-	6.95 *
Saturated O ₂	-0.01	-0.03	-0.01	-0.10 ***	-	-0.003	-	-0.31 *
Conductivity	-0.001	-0.002	0.004	0.02	-	0.006 *	-	-0.01
DOC	0.03	-0.005	0.09	0.0006	-	0.02	-	-0.28
P-PO ₄	14.48 ***	13.01 *	13.0	51.0	-	23.13 **	-	4.68
N-NH ₄	-1.67	-13.78	-23.1	-11.2	-	8.61	-	-0.01
N-NO ₃	0.57 ***	-0.03	0.56	-1.01	-	-0.42	-	4.21 ***
Chlorophyll-a	0.03 *	-0.04	0.04	0.006	-	-0.08	-	-0.16
Water flow	-0.001	0.004	0.00	0.0003	-	0.01 **	-	-0.00001
Connectivity index	-0.45	2.96 *	2.07	4.53	-	9.42 **	-	4.59

located close to the wetlands of interest (to ensure our data reflected the physico-chemical characteristics of the river water close to wetlands) and rather far from the sources of bacterial pathogens (i.e. WWTP effluents). We could also attribute the lack of differences in hydrosystem contamination to the large disparity in wetlands within hydrosystems in terms of the physico-chemical characteristics, the sources of the water and the connectivity to the river.

Wetland contamination: pathogenic and antibiotic-resistant bacteria dispersal in floodplains

Total *E. coli*

As rivers were significantly more contaminated than wetlands, we expected that they would serve as a dispersal mechanism for *E. coli*, as previously suggested (Vermeulen and Hofstra 2014; Jonsson and Agerberg 2015). However, we did not find any differences in wetland contamination within a given hydrosystem although the wetlands differ in their connectivity to the rivers. This may be explained by other sources of contamination, as discussed below.

Surprisingly, the total *E. coli* abundance did not significantly increase with the highest river flows during winter, as previously demonstrated (Chu et al. 2014). This may suggest the resilience of wetlands to total *E. coli* contamination. However, certain wetlands were more contaminated than their corresponding rivers on some dates. Either total *E. coli* are dispersed through other sources, such as runoff from agricultural and potentially contaminated lands (Guan and Holley 2003; Jamieson et al. 2004; Vermeulen and Hofstra 2014), or they may proliferate in some wetlands. We showed that total *E. coli* contaminates wetlands during high-precipitation periods (runoff), rather than high-flow periods (river overflows and backflows). This suggests that non-point sources of contamination occurred in the watershed (e.g.

contaminated fields and cattle) and indirectly contributed to the contamination of wetlands, as suggested by Jamieson et al. (2004) and Vermeulen and Hofstra (2014). Moreover, our data support the survival of total *E. coli* in nutrient-rich wetlands. The temperature did not correlate with the bacterial concentrations, which is in contrast with the conclusions of previous studies (Beaudeau et al. 2001; Schulz and Childers 2011; Blaustein et al. 2013). Biotic interactions could also influence bacterial abundances: Joint et al. (2002) suggested that bacterioplankton exert competitive pressure on phytoplankton in terms of nutrients, and Beaudeau et al. (2001) observed the predation of *E. coli* by benthic micro-grazers. However, the absence of data on other biotic compartments prevents us from drawing conclusions on this point. The contribution of wild animal populations (e.g. coy-pus and beavers) can also not be neglected.

ESBL *E. coli*

ESBL *E. coli* exhibited the typical antibiotic resistance profiles, most of which were presumably due to the production of CTX-M-type enzymes, as already reported (Bouxom et al. 2018).

ESBL *E. coli* was always more abundant in rivers than in wetlands. Moreover, the ESBL *E. coli* concentrations were higher in highly connected wetlands. These results identify rivers as the major vector of dispersal for this antibiotic-resistant pathogen in the floodplains and the source of wetland contamination.

Regarding the temporal dispersion, the ESBL *E. coli* abundance in wetlands was lower during the summer (low-flow) and higher during the winter (high-flow), which confirms the relationship between ESBL *E. coli* river contamination and ESBL *E. coli* wetland contamination. The same conclusion can be drawn from the study of the physico-chemical determinants of bacterial survival in wetlands (we shown that the ESBL *E. coli* abundance was only related with the connectivity index). These results demonstrated that the most connected wetlands had the

highest contamination levels during the periods with the highest river flows. This higher contamination in winter is likely due to the outflow of raw wastewater into the river after peaks in rainfall when the WWTPs are saturated. Several studies have demonstrated the key role of WWTPs in the release of antibiotic-resistant bacteria into the environment, especially during high discharge periods (Storteboom *et al.* 2010; Marti, Jofre and Balcazar 2013; Rizzo *et al.* 2013). These studies proposed that the transport of ARGs from specific sources was likely the dominant mechanism of ARG proliferation in riverine environments rather than the selection of ARGs from among native bacteria by antibiotics and other pollutants. Manure application to agricultural fields has also been identified as a source of the spread of antibiotic resistance genes (Heuer, Schmitt and Smalla 2011), but we cannot confirm this here. This study demonstrates the pivotal role of rivers in the spread of ESBL *E. coli* in floodplains, particularly in wetlands, and the contamination of wetlands with this antibiotic-resistant pathogen. Overall, our data suggest that ESBL *E. coli* poorly survive in wetlands (no regression with the physico-chemical characteristics of wetland waters was shown), where they were mostly present during high-flow periods and probably originated from upstream WWTPs.

E. coli phylogroup B2

E. coli B2 concentrations did not vary spatially, and were not higher in rivers, suggesting that rivers poorly influence the abundance of pathogenic *E. coli* in wetlands. In addition, the physico-chemical characteristics of water do not seem to influence the concentration of *E. coli* B2 in wetlands. The lack of statistical spatial variation could be attributed to the low number of samples containing *E. coli* B2 (17%).

The observation of the highest *E. coli* B2 concentrations in September suggest that precipitation rather than river flow contributed to the increase in *E. coli* B2 abundance in the rivers. The special case of SBR, which was the single Ain wetland that was directly bordered by maize fields and was contaminated in September, suggests that precipitation leads to the leaching of contaminants from fields to this wetland (Jamieson *et al.* 2004; Vermeulen and Hofstra 2014). Indeed, sewage sludge is spread on crops in large quantities in the Ain lower valley (e.g. 335 t of dry matter from the WWTP of Ambérieu-en-Bugey in 2016 [Ministry of Ecological and Solidary Transition]; based on the synthesis of the 2015 and 2016 spreading registers of the Chamber of Agriculture of the Ain department), which has a floodplain with a very coarse substrate that is composed of cobblestones overlaid with a shallow soil layer. We hypothesise that the spreading of sewage sludge in floodplains may contribute to an increase in the concentrations of *E. coli* B2 in wetlands.

Total *K. pneumoniae*

As it was the case for ESBL *E. coli*, because rivers were significantly more contaminated than wetlands and connected wetlands were more contaminated than other wetlands, this likely indicates the river-driven contamination of wetlands by *K. pneumoniae*.

The high concentrations of *K. pneumoniae* in August and September suggest that *K. pneumoniae* reach wetlands during periods of high river flow (as suggested by the spatial approach), survive, and thrive during summer in these eutrophic and warm wetlands. One can also hypothesise that summer storms bring this species to wetlands. However, the low concentrations of ESBL *E. coli* (which are also highly dispersed by rivers) in wetlands in summer rule out this possibility. The study of the

physico-chemical determinants of bacterial survival in wetlands suggests that alkaline, warm and stagnant wetlands allow *K. pneumoniae* to thrive. In contrast, the connectivity with the river and the nutrient concentrations apparently did not play a role in the distribution of this species, even though *K. pneumoniae* seems to be nitrogen-dependent as it is able to undergo nitrification and denitrification to satisfy its nitrogen requirements (Padhi *et al.* 2013; Pal, Khardenavis and Purohit 2015). The two highly contaminated wetlands (LON and CHEM) were very shallow during summer (~20 cm), which this may favour the transfer of bacteria from the sediment to the water column. We did not sample surficial sediments in this study, but it has already been shown that sediments are a reservoir of bacteria in rivers (Chu *et al.* 2014; Abia, Ubomba-Jaswa and Momba 2015), and this is also probably the case in wetlands.

Limitations and implications of the study

We sampled 19 sites (16 wetlands and 3 river stations) monthly over a one-year cycle to determine both the hydrological and the meteorological fluctuations that may affect the sites, resulting in a high number of water samples. However, processes affecting human-associated bacteria dispersal at the floodplain scale could have been explored over a longer period to cope with interannual fluctuations in hydrology and climatic conditions. Indeed, local weather events may have influenced the data and seasonal effects would have been smoothed out by several years of data. Furthermore, the sometimes-small number of positive samples, as discussed above for *E. coli* B2, may have influenced the statistical results. Finally, our data did not allow us to know precisely the pathways of bacteria at the floodplain scale, but we were able to hypothesise the sources of the bacterial contamination of wetlands.

Despite these limitations, this study provides a rather new and important data set necessary to understand the dispersion and the survival of human-associated bacteria in the environment. The survival of the studied human-associated bacteria during the dispersal process within the floodplains is a key issue in terms of public health, as recreational activities are frequent along these rivers and wetlands and involve contact with contaminated water through fishing, bathing, or accidental drinking. In view of the multiple human activities in floodplains and the potential damage caused by human-associated bacteria in the environment, this study emphasises the urgent need to implement measures in all components of water management that could limit the dispersion of human-associated bacteria into the environment. Additional water treatment in WWTP and prudent spread of WWTP sludge could be worth considering.

Future investigations must clarify the contribution of agricultural practices at the floodplain scale, particularly in groundwater and wetlands where bacteria can potentially meet favourable conditions for their survival and/or multiplication, as demonstrated in this study. Once they find their way to wetlands, little is known about the direct and indirect interactions of these bacteria with their environment (competition and/or predation by/on endemic species, gene transfer, etc.). To take into account all the dimensions of these aquatic environments, sediments, biofilms and aquatic fauna should also be studied. In addition, the examination of the genetic structure of the bacterial population at the floodplain scale will help to decipher the fluxes of pathogens and resistance determinants within water bodies.

CONCLUSIONS

This study aimed to examine the dispersal and survival of pathogenic and antibiotic-resistant human-associated bacteria in floodplains and provides new results:

- Rivers convey bacterial and antibiotic-resistant pathogens (among which ESBL *E. coli* and *K. pneumoniae*) to wetlands, most probably originating from upstream WWTP outflows.
- Shallow and warm wetlands allow *K. pneumoniae* to thrive. Total *E. coli* also find favourable conditions in some wetlands.
- Wetland contamination does not fully depend on river input. Therefore, other sources of pathogenic bacteria in the wetland watershed should be considered (e.g. sewage sludge and manure spreading that could directly contaminate wetlands through rainwater runoff and infiltration), as suggested previously.

This study emphasises the need to better understand the dispersion processes and the fate of pathogenic and antibiotic-resistant bacteria in the environment, in order to prevent risks to humans and their environment. This work also recalls the need to control and reduce as much as possible the anthropogenic bacterial input into the environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

Tom Battin is greatly acknowledged for his beneficial comments on the previous version of this manuscript. Marion Richard is acknowledged for her technical assistance. The data on river flows were provided by EauFrance (Doubs River), the Syndicat Mixte du Val d'Amour (Loue River) and the Syndicat Mixte de la Basse Vallée de l'Ain (Ain River). The meteorological data were provided by Météo France. The partial data on the spreading of WWTP sludge were provided by the Chamber of Agriculture of the Ain department (Ain River), the Chamber of Agriculture of the Rhône-et-Loire department (Doubs River) and the Departmental Direction of the Territory of the Jura department (Loue River).

FUNDING

This work was supported by the French National Centre for Scientific Research (CNRS, Observatory of Universe Sciences (OSU Theta), Structuring Initiative Continental and Coastal Ecosphere (EC2CO, EC2CO2018) program).

Conflicts of interest. None declared.

REFERENCES

- Abia ALK, Ubomba-Jaswa E, Momba MNB. Impact of seasonal variation on *Escherichia coli* concentrations in the riverbed sediments in the Apies River, South Africa. *Sci Total Environ* 2015;**537**:462–9.
- Amoros C, Bornette G. Connectivity and biocomplexity in waterbodies of riverine floodplains. *Freshw Biol* 2002;**47**:761–76.
- Amos GCA, Zhang L, Hawkey PM et al. Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. *Vet Microbiol* 2014;**171**:441–7.
- Arthaud F, Mousset M, Vallod D et al. Effect of light stress from phytoplankton on the relationship between aquatic vegetation and the propagule bank in shallow lakes. *Freshw Biol* 2012;**57**:666–75.
- Beauveau P, Tousset N, Bruchon F et al. In situ measurement and statistical modelling of *Escherichia coli* decay in small rivers. *Water Res* 2001;**35**:3168–78.
- Blaustein RA, Pachepsky Y, Hill RL et al. *Escherichia coli* survival in waters: temperature dependence. *Water Res* 2013;**47**:569–78.
- Bornette G, Amoros C, Piegay H et al. Ecological complexity of wetlands within a river landscape. *Biol Conserv* 1998;**85**:35–45.
- Bornette G, Tabacchi E, Hupp C et al. A model of plant strategies in fluvial hydrosystems. *Freshw Biol* 2008;**53**:1692–705.
- Bouxom H, Fournier D, Bouiller K et al. Which non-carbapenem antibiotics are active against extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*? *Int J Antimicrob Agents* 2018;**52**:100–3.
- Bravard J-P, Amoros C, Pautou G et al. River incision in south-east France: morphological phenomena and ecological effects. *River Res Appl* 1997;**13**:75–90.
- Brodie R, Sundaram B, Tottenham R et al. An overview of tools for assessing groundwater-surface water connectivity. *Bur Rural Sci Canberra Aust* 2007;**131**, 15–18.
- Brookes JD, Antenucci J, Hipsey M et al. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. *Environ Int* 2004;**30**:741–59.
- Bréchet C, Plantin J, Sauget M et al. Wastewater treatment plants release large amounts of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin Infect Dis* 2014;**58**:1658–65.
- Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Kay P et al. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;**53**:696–702.
- Cabral JP. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int J Environ Res Public Health* 2010;**7**:3657–703.
- Chen Q, An X, Li H et al. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environ Int* 2016;**92**:1–10.
- Chu Y, Tournoud MG, Salles C et al. Spatial and temporal dynamics of bacterial contamination in South France coastal rivers: focus on in-stream processes during low flows and floods. *Hydrol Process* 2014;**28**:3300–13.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013;**5**:58–65.
- Coffin RB, Connolly JP, Harris PS. Availability of dissolved organic carbon to bacterioplankton examined by oxygen utilization. *Mar Ecol Prog Ser* 1993;**101**:9–22.
- Doughari JH, Ndakidemi PA, Human IS et al. Effect of oxidative and temperature stress on viability and toxin production of environmental isolates of *Escherichia coli*. *Afr J Pharm Pharmacol* 2012;**6**:1264–75.
- Flint KP. The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *J Appl Microbiol* 1987;**63**:261–70.
- Guan TY, Holley RA. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness—a review. *J Environ Qual* 2003;**32**:383–92.
- Gu G, Luo Z, Cevallos-Cevallos JM et al. Factors affecting the occurrence of *Escherichia coli* O157 contamination in irrigation ponds on produce farms in the Suwannee River Watershed. *Can J Microbiol* 2012;**59**:175–82.
- Gupta K, Hooton TM, Stamm WE. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann Intern Med* 2001;**135**:41–50.

- Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* 2011;14:236–43.
- Hocquet D, Muller A, Bertrand X. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J Hosp Infect* 2016;93:395–402.
- Hong H, Qiu J, Liang Y. Environmental factors influencing the distribution of total and fecal coliform bacteria in six water storage reservoirs in the Pearl River Delta Region, China. *J Environ Sci* 2010;22:663–8.
- Jamieson R, Gordon R, Joy D et al. Assessing microbial pollution of rural surface waters: A review of current watershed scale modeling approaches. *Agric Water Manag* 2004;70:1–17.
- John DE, Rose JB. Review of factors affecting microbial survival in groundwater. *Environ Sci Technol* 2005;39:7345–56.
- Joint I, Henriksen P, Fonnes GA et al. Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms. *Aquat Microb Ecol* 2002;29:145–59.
- Jonsson A, Agerberg S. Modelling of *E. coli* transport in an oligotrophic river in northern Scandinavia. *Ecol Model* 2015;306:145–51.
- Kalbus E, Reinstorf F, Schirmer M. Measuring methods for groundwater? surface water interactions: a review. *Hydrol Earth Syst Sci Discuss* 2006;10:873–87.
- Kalcheva H, Dinka M, Ágoston-Szabó E et al. Bacterioplankton from two hungarian danube river wetlands (Beda-Karapanca, Danube-Drava National Park) and its relations to environmental variables. *Transylv Rev Syst Ecol Res* 2016;18:1–12.
- Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 2009;73:338–44.
- Kløve B, Ala-Aho P, Bertrand G et al. Groundwater dependent ecosystems. Part I: Hydroecological status and trends. *Environ Sci Policy* 2011;14:770–81.
- Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB et al. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001;33:1288–94.
- Leonard AF, Zhang L, Balfour AJ et al. Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environ Int* 2018;114:326–33.
- Leonard AF, Zhang L, Balfour AJ et al. Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. *Environ Int* 2015;82:92–100.
- Lim C-H, Flint KP. The effects of nutrients on the survival of *Escherichia coli* in lake water. *J Appl Microbiol* 1989;66:559–69.
- Maberly SC, Spence DHN. Photosynthesis and photorespiration in freshwater organisms: amphibious plants. *Aquatic Botany* 1989;34:267–86.
- Marti E, Jofre J, Balcazar JL. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PLoS One* 2013;8:e78906.
- Niu J, Phanikumar MS. Modeling watershed-scale solute transport using an integrated, process-based hydrologic model with applications to bacterial fate and transport. *J Hydrol* 2015;529:35–48.
- Padhi SK, Tripathy S, Sen R et al. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. *Int Biodeterior Biodegrad* 2013;78:67–73.
- Pal RR, Khardenavis AA, Purohit HJ. Identification and monitoring of nitrification and denitrification genes in *Klebsiella pneumoniae* EGD-HP19-C for its ability to perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Funct Integr Genomics* 2015;15:63–76.
- Pirnay J-P, Matthijs S, Colak H et al. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ Microbiol* 2005;7:969–80.
- R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna : R Foundation for Statistical Computing, 2017.
- Rizzo L, Manaia C, Merlin C et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci Total Environ* 2013;447:345–60.
- Robach F, Thiébaud G, Trémolières M et al. A reference system for continental running waters: plant communities as bioindicators of increasing eutrophication in alkaline and acidic waters in north-east France. *Management and Ecology of Freshwater Plants*. Springer, 1996, 67–76.
- Rodríguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM et al. Community infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med* 2008;168:1897–902.
- Sakura Y. Groundwater flow estimated from temperatures in the Yonezawa basin, northeast Japan. *IAHS Publ* 1993;215:161.
- Schulz CJ, Childers GW. Fecal Bacteroidales diversity and decay in response to variations in temperature and salinity. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:2563–72.
- Slekovec C, Plantin J, Cholley P et al. Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS One* 2012;7:e49300.
- Storteboom H, Arabi M, Davis JG et al. Tracking antibiotic resistance genes in the South Platte River basin using molecular signatures of urban, agricultural, and pristine sources. *Environ Sci Technol* 2010;44:7397–404.
- Su J-Q, Wei B, Ou-Yang W-Y et al. Antibiotic resistance and its association with bacterial communities during sewage sludge composting. *Environ Sci Technol* 2015;49:7356–63.
- Touret J, Denamur E. Population phylogenomics of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2016;4:1.
- U.S. Environmental Protection Agency(2010). WATERS (Watershed Assessment, Tracking & Environmental Results). Washington, DC.<http://water.epa.gov/scitech/datait/tools/water/index.cfm>, accessed 21 September 2017.
- Vermeulen LC, Hofstra N. Influence of climate variables on the concentration of *Escherichia coli* in the Rhine, Meuse, and Drentse Aa during 1985–2010. *Reg Environ Change* 2014;14:307–19.
- Wheater DWF, Mara DD, Jawad L et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* in sewage and fresh water. *Water Res* 1980;14:713–21.
- Yang T-X, Sheng L-X, Zhuang J et al. *Function, Restoration, and Ecosystem Services of Riverine Wetlands in the Temperate Zone*. Elsevier, 2016.
- Yentsch CS, Menzel DW. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* 1963; 10:221–31.
- Young S, Juhl A, O'Mullan GD. Antibiotic-resistant bacteria in the hudson river estuary linked to wet weather sewage contamination. *J Water Health* 2013;11:297–310.

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Locey, K. J. & Lennon, J. T. Scaling laws predict global microbial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 5970–5975 (2016).
2. Lippi, D., Gotuzzo, E. & Caini, S. Cholera. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
3. Bramanti, B., Dean, K. R., Walløe, L. & Chr. Stenseth, N. The Third Plague Pandemic in Europe. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **286**, (2019).
4. Wenzel, R. P. The antibiotic pipeline--challenges, costs, and values. *N. Engl. J. Med.* **351**, 523–526 (2004).
5. Cassini, A. *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.* **19**, 56–66 (2019).
6. Gillings, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Front. Microbiol.* **4**, (2013).
7. Holmes, A. H. *et al.* Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* **387**, 176–187 (2016).
8. Davies, J. & Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **74**, 417–433 (2010).
9. Munita, J. M. & Arias, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
10. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017. *St. Maurice Santé Publique Fr.* 270 p. (2019).
11. Munoz-Price, L. S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 785–796 (2013).
12. Peyclit, L., Baron, S. A. & Rolain, J.-M. Drug Repurposing to Fight Colistin and Carbapenem-Resistant Bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, (2019).
13. Karanika, S., Karantanos, T., Arvanitis, M., Grigoras, C. & Mylonakis, E. Fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and risk factors among healthy individuals: A systematic review and metaanalysis. *Clin. Infect. Dis.* **63**, 310–318 (2016).

14. Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F. & Martínez, J. L. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat. Microbiol.* **4**, 1432–1442 (2019).
15. Kawamura, K. *et al.* ESBL-producing *Escherichia coli* ^[L1]_{SEP} and its rapid rise among healthy people. *Food Saf.* **5**, 122–150 (2017).
16. Parkins, M. D., Gregson, D. B., Pitout, J. D. D., Ross, T. & Laupland, K. B. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Infection* **38**, 25–32 (2010).
17. Quainoo, S. *et al.* Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *Clin. Microbiol. Rev.* **30**, 1015–1063 (2017).
18. Maiden, M. C. J. *et al.* Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3140–3145 (1998).
19. Neoh, H.-M., Tan, X.-E., Sapri, H. F. & Tan, T. L. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the ‘gold standard’ for bacteria typing and current alternatives. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **74**, 103935 (2019).
20. Tenover, F. C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233–2239 (1995).
21. Rhoads, A. & Au, K. F. PacBio sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **13**, 278–289 (2015).
22. Ku, C.-S. & Roukos, D. H. From next-generation sequencing to nanopore sequencing technology: paving the way to personalized genomic medicine. *Expert Rev. Med. Devices* **10**, 1–6 (2013).
23. Bonnin, R., Naas, T. & Dortet, L. Impact du séquençage d’ADN à haut débit sur la surveillance des épidémies de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. *Feuill. Biol.* **354**, (2017).
24. Bankevich, A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **19**, 455–477 (2012).
25. Carriço, J. A., Rossi, M., Moran-Gilad, J., Van Domselaar, G. & Ramirez, M. A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 342–349 (2018).
26. Schürch, A. C., Arredondo-Alonso, S., Willems, R. J. L. & Goering, R. V. 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. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**, 350–354 (2018).
27. Bryant, J., Chewapreecha, C. & Bentley, S. D. Developing insights into the mechanisms of evolution of bacterial pathogens from whole-genome sequences. *Future Microbiol.* **7**, 1283–1296 (2012).
 28. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359 (2012).
 29. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
 30. Sahl, J. W. *et al.* NASP: an accurate, rapid method for the identification of SNPs in WGS datasets that supports flexible input and output formats. *Microb. Genomics* **2**, (2016).
 31. Pearce, M. E. *et al.* Comparative analysis of core genome MLST and SNP typing within a European Salmonella serovar Enteritidis outbreak. *Int. J. Food Microbiol.* **274**, 1–11 (2018).
 32. Bortolaia, V. *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* (2020) doi:10.1093/jac/dkaa345.
 33. Kwong, J. C. *et al.* Prospective whole-genome sequencing enhances national surveillance of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 333–342 (2016).
 34. Nutman, A. & Marchaim, D. How to: molecular investigation of a hospital outbreak. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**, 688–695 (2019).
 35. Haller, S. *et al.* What caused the outbreak of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit, Germany 2009 to 2012? Reconstructing transmission with epidemiological analysis and whole-genome sequencing. *BMJ Open* **5**, e007397 (2015).
 36. Roer, L. *et al.* WGS-based surveillance of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 1922–1929 (2017).
 37. Willmann, M. *et al.* Analysis of a long-term outbreak of XDR *Pseudomonas aeruginosa*: a molecular epidemiological study. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 1322–1330 (2015).
 38. Buhl, M. *et al.* Molecular evolution of extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients and hospital environment in a prolonged outbreak. *Front. Microbiol.* **10**, 1742 (2019).
 39. Harris, S. R. *et al.* Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 130–136 (2013).

40. Quick, J. *et al.* Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. *BMJ Open* **4**, (2014).
41. Bonomo, R. A. *et al.* Carbapenemase-producing organisms: a global scourge. *Clin. Infect. Dis.* **66**, 1290–1297 (2018).
42. David, S. *et al.* Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat. Microbiol.* **4**, 1919–1929 (2019).
43. Grundmann, H. *et al.* Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 153–163 (2017).
44. Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S. & Gordon, D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 37–54 (2021).
45. Freschi, L. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. *Genome Biol. Evol.* **11**, 109–120 (2019).
46. Ludden, C. *et al.* One Health Genomic Surveillance of *Escherichia coli* Demonstrates Distinct Lineages and Mobile Genetic Elements in Isolates from Humans versus Livestock. *mBio* **10**, e02693-18 (2019).
47. Ludden, C. *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.* **70**, 219–226 (2020).
48. Day, M. J. *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.* **19**, 1325–1335 (2019).
49. Dorado-García, A. *et al.* Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 339–347 (2018).
50. Wirth, T. *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* **60**, 1136–1151 (2006).
51. Mellmann, A. *et al.* Real-time genome sequencing of resistant bacteria provides precision infection control in an institutional setting. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 2874–2881 (2016).
52. Mintzer, V., Moran-Gilad, J. & Simon-Tuval, T. Operational models and criteria for incorporating microbial whole genome sequencing in hospital microbiology – A systematic literature review. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**, 1086–1095 (2019).

53. Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D. & Tanner, M. From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. *Prev. Vet. Med.* **101**, 148–156 (2011).
54. Destoumieux-Garzón, D. *et al.* The One Health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front. Vet. Sci.* **5**, (2018).
55. Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. & Denamur, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 207–217 (2010).
56. Doublet, B., Bousquet-Mélou, A. & Madec, J. Le concept «One Health» en antibiorésistance et les flux de gènes. *Innov. Agron.* **24**, 79–90 (2012).
57. McEwen, S. A. & Collignon, P. J. Antimicrobial resistance: a One Health perspective. *Microbiol. Spectr.* **6**, (2018).
58. Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. & Toussaint, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 722–732 (2005).
59. Mughini-Gras, L. *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* **3**, e357–e369 (2019).
60. ECDC. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual report of the European antimicrobial resistance surveillance network (EARS-Net). (2017).
61. Runcharoen, C. *et al.* Whole genome sequencing of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from patients, farm waste and canals in Thailand. *Genome Med.* **9**, 81 (2017).
62. Doi, Y. *et al.* Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**, 33–38 (2010).
63. Van Boeckel, T. P. *et al.* Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect. Dis.* **14**, 742–750 (2014).
64. Berrazeg, M. *et al.* Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 6248–6255 (2015).
65. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 42–51 (2015).
66. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. & Jensen, S. O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, (2018).

67. Soucy, S. M., Huang, J. & Gogarten, J. P. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 472–482 (2015).
68. Chen, I. & Dubnau, D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 241–249 (2004).
69. Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P. & Claverys, J.-P. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 181–196 (2014).
70. Claverys, J.-P. & Martin, B. Bacterial ‘competence’ genes: signatures of active transformation, or only remnants? *Trends Microbiol.* **11**, 161–165 (2003).
71. Furuya, E. Y. & Lowy, F. D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 36–45 (2006).
72. Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F. & Arechaga, I. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 81–95 (2015).
73. Siguier, P., Gourbeyre, E., Varani, A., Ton-Hoang, B. & Chandler, M. Everyman’s guide to bacterial insertion sequences. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0030–2014 (2015).
74. Roberts, A. P. *et al.* Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* **60**, (2008).
75. Shintani, M., Sanchez, Z. K. & Kimbara, K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
76. Carattoli, A. Plasmids and the spread of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 298–304 (2013).
77. Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P. & Cruz, F. de la. A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify Gamma-Proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLOS ONE* **7**, e40438 (2012).
78. Carattoli, A. *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* **63**, 219–228 (2005).
79. Carattoli, A. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 654–658 (2011).
80. Gillings, M. R. Integrons: past, present, and future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **78**, 257–277 (2014).
81. Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E. & Iredell, J. R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 757–784 (2009).

82. Hall, R. M. Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1267**, 71–78 (2012).
83. Da Re, S. & Ploy, M.-C. Antibiotiques et réponse SOS bactérienne—Une voie efficace d’acquisition des résistances aux antibiotiques. *médecine/sciences* **28**, 179–184 (2012).
84. Escudero*, J. A., Loot*, C., Nivina, A. & Mazel, D. The integron: adaptation on demand. *Mob. DNA III* 139–161 (2015) doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014.
85. Wozniak, R. A. F. & Waldor, M. K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 552–563 (2010).
86. Carraro, N. & Burrus, V. The dualistic nature of integrative and conjugative elements. *Mob. Genet. Elem.* **5**, 98–102 (2015).
87. Zakour, N. L. B. *et al.* Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. *mBio* **7**, (2016).
88. Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S. & Ramasamy, J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *J. Med. Soc.* **32**, 76 (2018).
89. Knott-Hunziker, V., Waley, S. G., Orlek, B. S. & Sammes, P. G. Penicillinase active sites: labelling of serine-44 in beta-lactamase I by 6beta-bromopenicillanic acid. *FEBS Lett.* **99**, 59–61 (1979).
90. Zhang, gMin & Hao, Q. Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism. *FASEB J.* **25**, 2574–2582 (2011).
91. Bush, K. Past and present perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).
92. Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 657–686 (2005).
93. Wilson, H. & Török, M. E. Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microb. Genomics* **4**, (2018).
94. Gniadkowski, M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 11–32 (2008).
95. Peirano, G., Bij, A. K. van der, Gregson, D. B. & Pitout, J. D. D. Molecular epidemiology over an 11-year Period (2000 to 2010) of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 294–299 (2012).

96. Barrios, H. *et al.* ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: The most prevalent clinical isolates obtained between 2005 and 2012 in Mexico. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **10**, 243–246 (2017).
97. Cantón, R. & Coque, T. M. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 466–475 (2006).
98. Pitout, J. D. & Laupland, K. B. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* **8**, 159–166 (2008).
99. Naseer, U. & Sundsfjord, A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* **17**, 83–97 (2011).
100. Zhao, W.-H. & Hu, Z.-Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **39**, 79–101 (2013).
101. Carattoli, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2227–2238 (2009).
102. Woerther, P.-L., Burdet, C., Chachaty, E. & Andremont, A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 744–758 (2013).
103. Cavalié, P., Le Vu, S., Jezewski-Serra, D., Maugat, S. & Berger-Carbonne, A. Consommation d'antibiotiques en secteur de ville en France de 2009 a 2019. Synthèse des indicateurs mis en ligne sur Géodes ; Saint-Maurice : Sante publique France. (2020).
104. Croxen, M. A. & Finlay, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 26–38 (2010).
105. Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140 (2004).
106. Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E. & Gordon, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 58–65 (2013).
107. Clermont, O. *et al.* Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ. Microbiol.* **21**, 3107–3117 (2019).
108. Sannes, M. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A. & Johnson, J. R. virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J. Infect. Dis.* **190**, 2121–2128 (2004).

109. Escobar-Páramo, P. *et al.* Large-Scale Population Structure of Human Commensal *Escherichia coli* Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5698–5700 (2004).
110. Duriez, P. *et al.* Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol. Read. Engl.* **147**, 1671–1676 (2001).
111. Petty, N. K. *et al.* Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 5694–5699 (2014).
112. Duprilot, M. *et al.* Success of *Escherichia coli* O25b:H4 sequence type 131 clade C associated with a decrease in virulence. *Infect. Immun.* **88**, (2020).
113. Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X. & Madec, J.-Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 543–574 (2014).
114. Brolund, A., Franzén, O., Melefors, Ö., Tegmark-Wisell, K. & Sandegren, L. Plasmidome-analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* using conventional typing and high-throughput sequencing. *PLOS ONE* **8**, e65793 (2013).
115. Williams, L. E., Wireman, J., Hilliard, V. C. & Summers, A. O. Large plasmids of *Escherichia coli* and *Salmonella* encode highly diverse arrays of accessory genes on common replicon families. *Plasmid* **69**, 36–48 (2013).
116. Branger, C. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-encoding genes are spreading on a wide range of *Escherichia coli* plasmids existing prior to the use of third-generation cephalosporins. *Microb. Genomics* **4**, (2018).
117. Wyres, K. L. & Holt, K. E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **45**, 131–139 (2018).
118. Martin, R. M. & Bachman, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, (2018).
119. Wyres, K. L., Lam, M. M. C. & Holt, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 344–359 (2020).
120. Holt, K. E. *et al.* Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E3574–E3581 (2015).
121. Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K. & Carattoli, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 252–275 (2017).

122. Calbo, E. & Garau, J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Future Microbiol.* **10**, 1063–1075 (2015).
123. McDanel, J. *et al.* Incidence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* infections in the United States: A systematic literature review. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **38**, 1209–1215 (2017).
124. Doi, Y., Iovleva, A. & Bonomo, R. A. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *J. Travel Med.* **24**, S44–S51 (2017).
125. Chong, Y., Shimoda, S. & Shimono, N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Genet. Evol.* **61**, 185–188 (2018).
126. Lob, S. H., Biedenbach, D. J., Badal, R. E., Kazmierczak, K. M. & Sahm, D. F. Antimicrobial resistance and resistance mechanisms of Enterobacteriaceae in ICU and non-ICU wards in Europe and North America: SMART 2011–2013. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **3**, 190–197 (2015).
127. Lob, S. H. *et al.* Susceptibility patterns and ESBL rates of *Escherichia coli* from urinary tract infections in Canada and the United States, SMART 2010–2014. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **85**, 459–465 (2016).
128. Jean, S.-S. *et al.* Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of pathogens causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2010–2013. *Int. J. Antimicrob. Agents* **47**, 328–334 (2016).
129. van Driel, A. A. *et al.* Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from uncomplicated UTI in general practice patients over a 10-year period. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **38**, 2151–2158 (2019).
130. Hilty, M. *et al.* Transmission dynamics of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the tertiary care hospital and the household setting. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **55**, 967–975 (2012).
131. León-Sampedro, R. *et al.* Pervasive transmission of a carbapenem resistance plasmid in the gut microbiota of hospitalized patients. *Nat. Microbiol.* 1–11 (2021) doi:10.1038/s41564-021-00879-y.
132. Gurieva, T. *et al.* The transmissibility of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae in intensive care units. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **66**, 489–493 (2018).

133. Tschudin-Sutter, S. *et al.* Contact precautions for preventing nosocomial transmission of extended-spectrum β lactamase-producing *Escherichia coli*: A point/counterpoint review. *Clin. Infect. Dis.* **65**, 342–347 (2017).
134. Flokas, M. E., Alevizakos, M., Shehadeh, F., Andreatos, N. & Mylonakis, E. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae colonisation in long-term care facilities: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **50**, 649–656 (2017).
135. Bevan, E. R., Jones, A. M. & Hawkey, P. M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 2145–2155 (2017).
136. Riley, L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 380–390 (2014).
137. van Duijkeren, E. *et al.* Long-term carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the general population in The Netherlands. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **66**, 1368–1376 (2018).
138. Martischang, R. *et al.* Household carriage and acquisition of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: A systematic review. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **41**, 286–294 (2020).
139. Ulstad, C. R. *et al.* Carriage of ESBL/AmpC-producing or ciprofloxacin non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in healthy people in Norway. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **5**, 57 (2016).
140. Löhr, I. H. *et al.* Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* following a nosocomial outbreak. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 1043–1048 (2013).
141. Rettedal, S. *et al.* First outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Norwegian neonatal intensive care unit; associated with contaminated breast milk and resolved by strict cohorting. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **120**, 612–621 (2012).
142. Pomba, C. *et al.* Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 957–968 (2017).
143. Dahmen, S., Haenni, M., Châtre, P. & Madec, J.-Y. Characterization of blaCTX-M IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2797–2801 (2013).
144. Melo, L. C. *et al.* Emergence of the C1-M27 cluster in ST131 *Escherichia coli* from companion animals in France. *J. Antimicrob. Chemother.* **74**, 3111–3113 (2019).

145. 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.* **67**, 770–771 (2012).
146. Ewers, C. *et al.* Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 2676–2680 (2014).
147. Wohlwend, N., Endimiani, A., Francey, T. & Perreten, V. Third-generation-cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from humans and companion animals in Switzerland: spread of a DHA-producing sequence type 11 clone in a veterinary setting. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 2949–2955 (2015).
148. Ministère de la transition écologique et solidaire et Ministère des solidarités et de la santé. Portail sur l'assainissement non collectif. (2019).
149. Bréchet, C. *et al.* Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin. Infect. Dis.* **58**, 1658–1665 (2014).
150. Hocquet, D., Muller, A. & Bertrand, X. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J. Hosp. Infect.* **93**, 395–402 (2016).
151. Cahill, N. *et al.* Hospital effluent: a reservoir for carbapenemase-producing Enterobacterales? *Sci. Total Environ.* **672**, 618–624 (2019).
152. Buelow, E. *et al.* Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. *FEMS Microbiol. Ecol.* **94**, (2018).
153. Crini, G. & Lichtfouse, E. Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment. *Environ. Chem. Lett.* **17**, 145–155 (2019).
154. Oberlé, K., Capdeville, M.-J., Berthe, T., Budzinski, H. & Petit, F. Evidence for a Complex Relationship between Antibiotics and Antibiotic-Resistant *Escherichia coli*: From Medical Center Patients to a Receiving Environment. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 1859–1868 (2012).
155. Kwak, Y.-K. *et al.* Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm during 1 year: does it reflect the resistance trends in the society? *Int. J. Antimicrob. Agents* **45**, 25–32 (2015).
156. Jang, J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J. Appl. Microbiol.* **123**, 570–581 (2017).

157. Berendonk, T. U. *et al.* Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 310–317 (2015).
158. Karkman, A., Berglund, F., Flach, C.-F., Kristiansson, E. & Larsson, D. G. J. Predicting clinical resistance prevalence using sewage metagenomic data. *Commun. Biol.* **3**, 1–10 (2020).
159. Hassen, B. *et al.* Genetic characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from wastewater and river water in Tunisia: predominance of CTX-M-15 and high genetic diversity. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **27**, 44368–44377 (2020).
160. Dolejska, M. *et al.* CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2784–2790 (2011).
161. Rizzo, L. *et al.* Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci. Total Environ.* **447**, 345–360 (2013).
162. Aubertreau, E. *et al.* Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. *Sci. Total Environ.* **579**, 1387–1398 (2017).
163. Lepuschitz, S. *et al.* Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. *Sci. Total Environ.* **662**, 227–235 (2019).
164. Czekalski, N., Gascón Díez, E. & Bürgmann, H. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *ISME J.* **8**, 1381–1390 (2014).
165. Henriot, C. *et al.* Occurrence and ecological determinants of the contamination of floodplain wetlands with *Klebsiella pneumoniae* and pathogenic or antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Ecol.* doi:10.1093/femsec/fiz097.
166. Hessman, J., Atterby, C., Olsen, B. & Järhult, J. D. High prevalence and temporal variation of extended spectrum β -lactamase-producing bacteria in urban swedish mallards. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* **24**, 822–829 (2018).
167. Maravić, A. *et al.* Prevalence and diversity of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from marine beach waters. *Mar. Pollut. Bull.* **90**, 60–67 (2015).
168. Convention de Ramsar sur les zones humides. Perspectives mondiales des zones humides : état des zones humides à l'échelle mondiale et des services qu'elles fournissent à l'humanité. Gland, Suisse : Secrétariat de la Convention de Ramsar. (2018).

169. Protection des milieux humides. Ministère de la transition écologique. <https://www.ecologie.gouv.fr/protection-des-milieux-humides>.
170. Servais, P. & Passerat, J. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Sci. Total Environ.* **408**, 365–372 (2009).
171. Jang, J. *et al.* Pathogenic *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases in the Yeongsan River basin of South Korea. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 1128–1136 (2013).
172. Blaak, H. *et al.* Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Vet. Microbiol.* **171**, 448–459 (2014).
173. Kittinger, C. *et al.* Enterobacteriaceae isolated from the river Danube: Antibiotic resistances, with a focus on the presence of ESBL and carbapenemases. *PLoS ONE* **11**, (2016).
174. Bollache, L. *et al.* Dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* in freshwater fishes from a French watershed (Burgundy). *Front. Microbiol.* **9**, (2019).
175. Jalliffier-Verne, I. *et al.* Impacts of global change on the concentrations and dilution of combined sewer overflows in a drinking water source. *Sci. Total Environ.* **508**, 462–476 (2015).
176. Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D. & Petit, F. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* **68**, 118–130 (2009).
177. Gaillot, B. & Lavarde, P. Les épandages sur terres agricoles des matières fertilisantes d'origine résiduaire - Mission prospective sur les modalités d'encadrement et de suivi réglementaire. Conseil général de l'Environnement et du développement durable et Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux. (2015).
178. Dolejska, M. Antibiotic-Resistant Bacteria in Wildlife. in *Antibiotic Resistance in the Environment: A Worldwide Overview* (eds. Manaia, C. M., Donner, E., Vaz-Moreira, I. & Hong, P.) 19–70 (Springer International Publishing, 2020). doi:10.1007/698_2020_467.
179. Wang, J. *et al.* The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zool. Res.* **38**, 55–80 (2017).
180. Guenther, S., Ewers, C. & Wieler, L. H. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front. Microbiol.* **2**, 246 (2011).

181. 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.* **23**, 826–833 (2017).
182. Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S. & Wieler, L. H. Extended-spectrum β -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.* **18**, 646–655 (2012).
183. Rodrigues, C., Machado, E., Peixe, L. & Novais, Â. Inc11/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of blaTEM-52 and blaCTX-M-1/-32 in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2245–2248 (2013).
184. Casella, T., Nogueira, M. C. L., 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.* **257**, 271–275 (2017).
185. Madec, J.-Y. & Haenni, M. Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and food-producing animals. *Plasmid* **99**, 72–81 (2018).
186. Yang, X. *et al.* F33: A-: B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of fosA3 and blaCTX-M-55/-14/-65 in *Escherichia coli* from chickens in China. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
187. Yang, Q.-E. *et al.* IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. *Front. Microbiol.* **6**, 964 (2015).
188. Diab, M., Hamze, M., Madec, J.-Y. & Haenni, M. High prevalence of non-ST131 CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in healthy cattle in Lebanon. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* **23**, 261–266 (2017).
189. Ceccarelli, D. *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.* **10**, (2019).
190. Gay, E. *et al.* Antimicrobial Usages and Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* From Veal Calves in France: Evolution During the Fattening Process. *Front. Microbiol.* **10**, 792 (2019).
191. Lazarus, B., Paterson, D. L., Mollinger, J. L. & Rogers, B. A. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **60**, 439–452 (2015).

192. Kluytmans, J. A. J. W. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **56**, 478–487 (2013).
193. Day, M. J. *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.* **71**, 1178–1182 (2016).
194. Leverstein-van Hall, M. A. *et al.* Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 873–880 (2011).
195. Falgenhauer, L. *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* **47**, 457–465 (2016).
196. Nguyen, M. N. *et al.* Prospective One Health genetic surveillance in Vietnam identifies distinct blaCTX-M-harbouring *Escherichia coli* in food-chain and human-derived samples. *Clin. Microbiol. Infect.* (2021) doi:10.1016/j.cmi.2021.01.006.
197. McEwen, S. A. & Fedorka-Cray, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* **34**, S93–S106 (2002).
198. Littmann, J., Buyx, A. & Cars, O. Antibiotic resistance: An ethical challenge. *Int. J. Antimicrob. Agents* **46**, 359–361 (2015).
199. Sanders, P., Perrin-Guyomard, A. & Moulin, G. Évolution de l'utilisation des antibiotiques en production animale. *Cah. Nutr. Diététique* **52**, 301–311 (2017).
200. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017. 109.
201. Iseppi, R., de Niederhäusern, S., Bondi, M., Messi, P. & Sabia, C. Extended-spectrum β -lactamase, AmpC, and MBL-producing Gram-negative bacteria on fresh vegetables and ready-to-eat salads sold in local markets. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* **24**, 1156–1164 (2018).
202. Reuland, E. A. *et al.* Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 1843–1846 (2014).
203. Randall, L. P. *et al.* Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **241**, 283–290 (2017).
204. Freitag, C. *et al.* Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables. *Vet. Microbiol.* **219**, 63–69 (2018).

205. Hölzel, C. S., Tetens, J. L. & Schwaiger, K. Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial-resistant bacteria: a need for quantitative risk assessment. *Foodborne Pathog. Dis.* **15**, 671–688 (2018).
206. Arcilla, M. S. *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.* **17**, 78–85 (2017).
207. Leonard, A. F. C. *et al.* Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environ. Int.* **114**, 326–333 (2018).
208. Meijjs, A. P. *et al.* Do vegetarians less frequently carry ESBL/pAmpC-producing *Escherichia coli*/*Klebsiella pneumoniae* compared with non-vegetarians? *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 550–558 (2020).
209. Diab, M. *et al.* 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.* **66**, 1688–1691.
210. Nadimpalli, M. *et al.* Meat and fish as sources of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, (2019).
211. Büdel, T. *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.* **75**, 2432–2441 (2020).
212. Wiehlmann, L. *et al.* Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8101–8106 (2007).
213. Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–964 (2000).
214. Valot, B. *et al.* What it takes to be a *Pseudomonas aeruginosa*? The core genome of the opportunistic pathogen updated. *PLOS ONE* **10**, e0126468 (2015).
215. Berube, B. J., Rangel, S. M. & Hauser, A. R. *Pseudomonas aeruginosa*: breaking down barriers. *Curr. Genet.* **62**, 109–113 (2016).
216. Rogues, A.-M. *et al.* Contribution of tap water to patient colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **67**, 72–78 (2007).
217. Bertrand, X. *et al.* Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med.* **27**, 1263–1268 (2001).

218. Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 582–610 (2009).
219. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J. & Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **37**, 177–192 (2019).
220. Poole, K. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the Max. *Front. Microbiol.* **2**, (2011).
221. Hocquet, D. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3531–3536 (2007).
222. Høiby, N. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect.* **3**, 23–35 (2001).
223. Nikaido, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1831–1836 (1989).
224. Hancock, R. E. W. & Brinkman, F. S. L. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 17–38 (2002).
225. Sun, J., Deng, Z. & Yan, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 254–267 (2014).
226. Li, X.-Z., Plésiat, P. & Nikaido, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 337–418 (2015).
227. Hocquet, D. *et al.* MexXY-OprM efflux pump Is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1371–1375 (2003).
228. Horcajada, J. P. *et al.* Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, (2019).
229. Girlich, D., Naas, T. & Nordmann, P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2043–2048 (2004).
230. Poole, K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 479–487 (2005).
231. Riera, E. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2022–2027 (2011).

232. Guénard, S. *et al.* Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 221–228 (2014).
233. Hocquet, D., Nordmann, P., Garch, F. E., Cabanne, L. & Plésiat, P. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1347–1351 (2006).
234. Hocquet, D. *et al.* Nationwide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3512–3515 (2010).
235. Potron, A., Poirel, L. & Nordmann, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents* **45**, 568–585 (2015).
236. Poirel, L., Naas, T. & Nordmann, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 24–38 (2010).
237. Poirel, L. *et al.* Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the blaVIM-2 carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 546–552 (2001).
238. Maatallah, M. *et al.* Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLOS ONE* **6**, e25617 (2011).
239. Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F. & Tümmler, B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front. Microbiol.* **2**, (2011).
240. Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C. & Juan, C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist. Updat.* **21–22**, 41–59 (2015).
241. Pirnay, J.-P. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLOS ONE* **4**, e7740 (2009).
242. Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T. & Dowson, C. G. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5644–5649 (2004).
243. del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C. & Oliver, A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. *Int. J. Antimicrob. Agents* **56**, 106196 (2020).

244. Woodford, N., Turton, J. F. & Livermore, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 736–755 (2011).
245. Cholley, P. *et al.* Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2578–2583 (2011).
246. Lee, C. *et al.* Why? – Successful *Pseudomonas aeruginosa* clones with a focus on clone C. *FEMS Microbiol. Rev.* **44**, 740–762 (2020).
247. Winstanley, C., O'Brien, S. & Brockhurst, M. A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol.* **24**, 327–337 (2016).
248. Freschi, L. *et al.* Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
249. Stewart, L. *et al.* Draft genomes of 12 host-adapted and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their positions in the core genome phylogeny. *Pathog. Dis.* **71**, 20–25 (2014).
250. Cabot, G. *et al.* Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 6349–6357 (2012).
251. Mulet, X. *et al.* Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 5527–5535 (2013).
252. Treepong, P. *et al.* Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 258–266 (2018).
253. Petitjean, M. *et al.* Genomic characterization of a local epidemic *Pseudomonas aeruginosa* reveals specific features of the widespread clone ST395. *Microb. Genomics* **3**, e000129 (2017).
254. Silva, F. M., Carmo, M. S., Silbert, S. & Gales, A. C. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of the ancestor relationship using multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and automated ribotyping. *Microb. Drug Resist.* **17**, 215–220 (2011).
255. Mano, Y. *et al.* Molecular analysis of the integrons of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan. *BMC Microbiol.* **15**, 41 (2015).
256. Chen, Y., Sun, M., Wang, M., Lu, Y. & Yan, Z. Dissemination of IMP-6-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST244 in multiple cities in China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 1181–1187 (2014).

257. Abdouchakour, F. *et al.* Intraclonal variations of resistance and phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clone ST308: A key to success within a hospital? *Int. J. Med. Microbiol.* **308**, 279–289 (2018).
258. Cabot, G. *et al.* Deciphering the resistome of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 175 international high-risk clone through whole-genome sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 7415–7423 (2016).
259. Barrio-Tofiño, E. del *et al.* Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017).
260. Jaillard, M. *et al.* Correlation between phenotypic antibiotic susceptibility and the resistome in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **50**, 210–218 (2017).
261. Botelho, J., Grosso, F. & Peixe, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist. Updat.* **44**, 100640 (2019).
262. Driscoll, J. A., Brody, S. L. & Kollef, M. H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* **67**, 351–368 (2007).
263. Fujitani, S., Sun, H.-Y., Yu, V. L. & Weingarten, J. A. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *CHEST* **139**, 909–919 (2011).
264. Bertrand, X. *et al.* Large outbreak in a surgical intensive care unit of colonization or infection with *Pseudomonas aeruginosa* that overexpressed an active efflux pump. *Clin. Infect. Dis.* **31**, e9–e14 (2000).
265. Slekovec, C. *et al.* Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infected ICU patients: a French multicenter 2012-2013 study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **38**, 921–926 (2019).
266. Gbaguidi-Haore, H. *et al.* A Bundle of measures to control an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* associated with P-trap contamination. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **39**, 164–169 (2018).
267. Cholley, P., Thouverez, M., Floret, N., Bertrand, X. & Talon, D. The role of water fittings in intensive care rooms as reservoirs for the colonization of patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med.* **34**, 1428 (2008).
268. Venier, A.-G. *et al.* Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in intensive care units: a prospective multicentre study. *J. Hosp. Infect.* **88**, 103–108 (2014).
269. Floret, N., Bertrand, X., Thouverez, M. & Talon, D. Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathol. Biol.* **57**, 9–12 (2009).

270. Cuttelod, M. *et al.* Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units over a 10-year period (1998-2007). *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 57–62 (2011).
271. Peña, C. *et al.* Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1265–1272 (2012).
272. McCarthy, K. L. & Paterson, D. L. Long-term mortality following *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *J. Hosp. Infect.* **95**, 292–299 (2017).
273. Thuong, M. *et al.* Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **53**, 274–282 (2003).
274. Biedenbach, D. J., Moet, G. J. & Jones, R. N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **50**, 59–69 (2004).
275. Al-Hasan, M. N., Wilson, J. W., Lahr, B. D., Eckel-Passow, J. E. & Baddour, L. M. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a population-based study. *Am. J. Med.* **121**, 702–708 (2008).
276. Silvestre, J. F. & Betlloch, M. I. Cutaneous manifestations due to *Pseudomonas* infection. *Int. J. Dermatol.* **38**, 419–431 (1999).
277. Kerckhoffs, A. P. M. *et al.* Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome. *J. Med. Microbiol.* **60**, 236–245 (2011).
278. Land, M. *et al.* Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct. Integr. Genomics* **15**, 141–161 (2015).
279. Martak, D. *et al.* Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and whole-genome-sequencing-based typing confirms the accuracy of pulsed-field gel electrophoresis for the investigation of local *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks. *J. Hosp. Infect.* **105**, 643–647 (2020).
280. Oliver, A., Baquero, F. & Blázquez, J. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol. Microbiol.* **43**, 1641–1650 (2002).
281. Parcell, B. J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing. *J. Hosp. Infect.* **98**, 282–288 (2018).
282. Rumore, J. *et al.* Evaluation of whole-genome sequencing for outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from the Canadian perspective. *BMC Genomics* **19**, (2018).

283. Fida, M. *et al.* Core genome MLST and resistome analysis of *Klebsiella pneumoniae* using a clinically-amenable workflow. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 114996 (2020) doi:10.1016/j.diagmicrobio.2020.114996.
284. Duchêne, S. *et al.* Genome-scale rates of evolutionary change in bacteria. *Microb. Genomics* **2**, e000094 (2016).
285. Ochman, H. Neutral mutations and neutral substitutions in bacterial genomes. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 2091–2096 (2003).
286. Stoesser, N. *et al.* Evolutionary history of the global emergence of the *Escherichia coli* epidemic clone ST131. *mBio* **7**, (2016).
287. Guttman, D. S. & Dykhuizen, D. E. Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination, not mutation. *Science* **266**, 1380–1383 (1994).
288. Hendricks, C. W. Enteric bacterial growth rates in river water. *Appl. Microbiol.* **24**, 168–174 (1972).
289. Stimson, J. *et al.* Beyond the SNP threshold: identifying outbreak clusters using inferred transmissions. *Mol. Biol. Evol.* **36**, 587–603 (2019).
290. Clausen, P. T. L. C., Aarestrup, F. M. & Lund, O. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics* **19**, 307 (2018).
291. Mellmann, A. *et al.* High interlaboratory reproducibility and accuracy of next-generation-sequencing-based bacterial genotyping in a ring trial. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 908–913 (2017).
292. Riccio, M. E. *et al.* Household acquisition and transmission of ESBL-producing Enterobacteriaceae after hospital discharge of ESBL-positive index patients. *Clin. Microbiol. Infect.* (2021) doi:10.1016/j.cmi.2020.12.024.
293. Luangsanatip, N. *et al.* Comparative efficacy of interventions to promote hand hygiene in hospital: systematic review and network meta-analysis. *BMJ* **351**, h3728 (2015).
294. Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X. & Madec, J.-Y. *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 543–574 (2014).
295. Carattoli, A. *et al.* In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 3895–3903 (2014).
296. Coppry, M. *et al.* Exogenous acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: a prospective multi-centre study (DYNAPYO study). *J. Hosp. Infect.* **104**, 40–45 (2020).

297. Meltzer, E. *et al.* Universal screening for *Clostridioides difficile* in a tertiary hospital: risk factors for carriage and clinical disease. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**, 1127–1132 (2019).
298. Kanno, T. & Moayyedi, P. Proton pump inhibitors in the elderly, balancing risk and benefit: an age-old problem. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **21**, 65 (2019).
299. Hagel, S. *et al.* ESBL colonization and acquisition in a hospital population: The molecular epidemiology and transmission of resistance genes. *PLoS ONE* **14**, (2019).
300. Trifan, A. *et al.* Proton pump inhibitors therapy and risk of *Clostridium difficile* infection: Systematic review and meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* **23**, 6500–6515 (2017).
301. Gupta, V. K., Paul, S. & Dutta, C. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
302. Biagi, E. *et al.* Ageing and gut microbes: Perspectives for health maintenance and longevity. *Pharmacol. Res.* **69**, 11–20 (2013).
303. Claesson, M. J. *et al.* Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* **488**, 178–184 (2012).
304. Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G. T. & McMurdo, M. E. T. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3575–3581 (2004).
305. Woodmansey, E. J. Intestinal bacteria and ageing. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 1178–1186 (2007).
306. Mariat, D. *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* **9**, 123 (2009).
307. Mueller, S. *et al.* Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1027–1033 (2006).
308. Claesson, M. J. *et al.* Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 4586–4591 (2011).
309. Gomes, A. C., Hoffmann, C. & Mota, J. F. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes* **9**, 308–325 (2018).
310. Cotillard, A. *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**, 585–588 (2013).
311. Martak, D. *et al.* High prevalence of human-associated *Escherichia coli* in wetlands located in eastern France. *Front. Microbiol.* **11**, 552566 (2020).

312. Kallonen, T. *et al.* Systematic longitudinal survey of invasive *Escherichia coli* in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131. *Genome Res.* (2017) doi:10.1101/gr.216606.116.
313. Henriot, C. P. *et al.* Occurrence and ecological determinants of the contamination of floodplain wetlands with *Klebsiella pneumoniae* and pathogenic or antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **95**, (2019).
314. Shabarova, T. *et al.* Recovery of freshwater microbial communities after extreme rain events is mediated by cyclic succession. *Nat. Microbiol.* **6**, 479–488 (2021).
315. Chattaway, M. A. *et al.* Evidence of evolving extraintestinal enteroaggregative *Escherichia coli* ST38 clone. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1935–1937 (2014).
316. Vu, T. T. T., Alter, T., Roesler, U., Roschanski, N. & Huehn, S. Investigation of extended-spectrum and AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from retail seafood in Berlin, Germany. *J. Food Prot.* **81**, 1079–1086 (2018).
317. Huizinga, P. *et al.* Decreasing prevalence of contamination with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) in retail chicken meat in the Netherlands. *PLoS ONE* **14**, (2019).
318. Been, M. de *et al.* Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLOS Genet.* **10**, e1004776 (2014).
319. Hirai, I. *et al.* Detection of chromosomal blaCTX-M-15 in *Escherichia coli* O25b-B2-ST131 isolates from the Kinki region of Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents* **42**, 500–506 (2013).
320. Rodríguez, I. *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* **43**, 553–557 (2014).
321. Arredondo-Alonso, S. *et al.* mlplasmids: a user-friendly tool to predict plasmid- and chromosome-derived sequences for single species. *Microb. Genomics* **4**, e000224 (2018).
322. Verschuuren, T. D. *et al.* Comparative genomics of ESBL-producing *Escherichia coli* (ESBL-Ec) reveals a similar distribution of the 10 most prevalent ESBL-Ec clones and ESBL genes among human community faecal and extra-intestinal infection isolates in the Netherlands (2014–17). *J. Antimicrob. Chemother.* **76**, 901–908 (2021).
323. Larsson, D. G. J., de Pedro, C. & Paxeus, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J. Hazard. Mater.* **148**, 751–755 (2007).
324. Saguti, F. *et al.* Surveillance of wastewater revealed peaks of SARS-CoV-2 preceding those of hospitalized patients with COVID-19. *Water Res.* **189**, 116620 (2021).

325. O'Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. (2016).
326. Salinas, L. *et al.* Environmental spread of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and ESBL genes among children and domestic animals in Ecuador. *Environ. Health Perspect.* **129**, 27007 (2021).
327. Huynh, B.-T. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* carriage in low-income countries: antimicrobial resistance, genomic diversity and risk factors. *Gut Microbes* **11**, 1287–1299 (2020).
328. Sands, K. *et al.* Characterization of antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria that cause neonatal sepsis in seven low- and middle-income countries. *Nat. Microbiol.* **6**, 512–523 (2021).
329. Rousham Emily K. *et al.* Human colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* in relation to animal and environmental exposures in Bangladesh: an observational One Health study. *Environ. Health Perspect.* **129**, 037001.
330. Nadimpalli, M. L. *et al.* Urban informal settlements as hotspots of antimicrobial resistance and the need to curb environmental transmission. *Nat. Microbiol.* **5**, 787–795 (2020).
331. Kit, O., Lüdeke, M. & Reckien, D. Defining the bull's eye: satellite imagery-assisted slum population assessment in Hyderabad, India. *Urban Geogr.* **34**, 413–424 (2013).
332. Dyson, P. Slum tourism: representing and interpreting 'reality' in Dharavi, Mumbai. *Tour. Geogr.* **14**, 254–274 (2012).
333. Angeles, G. *et al.* The 2005 census and mapping of slums in Bangladesh: design, select results and application. *Int. J. Health Geogr.* **8**, 32 (2009).
334. Prasad, A., Gray, C. B., Ross, A. & Kano, M. Metrics in urban health: current developments and future prospects. *Annu. Rev. Public Health* **37**, 113–133 (2016).
335. Ramin, B. Slums, climate change and human health in sub-Saharan Africa. *Bull. World Health Organ.* **87**, 886 (2009).
336. Khan, A. U., Maryam, L. & Zarrilli, R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* **17**, (2017).
337. Nordmann, P., Dortet, L. & Poirel, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol. Med.* **18**, 263–272 (2012).
338. Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S. & Laxminarayan, R. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *Lancet Planet. Health* **2**, e398–e405 (2018).

339. Gardner, A. & Welch, J. J. A formal theory of the selfish gene. *J. Evol. Biol.* **24**, 1801–1813 (2011).
340. Hall, J. P. J., Brockhurst, M. A. & Harrison, E. Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **372**, (2017).
341. Martínez, J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* **321**, 365–367 (2008).
342. Ribeiro, A. F. *et al.* Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in karstic systems: a biological indicator of the origin of fecal contamination? *FEMS Microbiol. Ecol.* **81**, 267–280 (2012).
343. Alves, M. S. *et al.* Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
344. Hartmann, A. *et al.* Occurrence of CTX-M producing *Escherichia coli* in soils, cattle, and farm environment in France (Burgundy region). *Front. Microbiol.* **3**, 83 (2012).
345. Taylor, L. H., Latham, S. M. & Woolhouse, M. E. Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356**, 983–989 (2001).
346. Broussier, M., Gbaguidi-Haoré, H., Rachidi-Berjamy, F., Bertrand, X. & Slekovec, C. Prevalence, genetic diversity of and factors associated with ESBL-producing Enterobacterales carriage in residents of French nursing homes. *J. Hosp. Infect.* **104**, 469–475 (2020).
347. Al-Gallas, N., Ben Aissa R, R., Attia Annabi, T., Bahri, O. & Boudabous, A. Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and dairy products. *Food Microbiol.* **19**, 389–398 (2002).
348. Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1770–1772 (2004).
349. Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4555–4558 (2000).
350. Lescat, M. *et al.* Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 49–57 (2013).
351. Clermont, O. *et al.* Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ. Microbiol.* **10**, 1000–1006 (2008).

352. Bonnet, R. *et al.* Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2269–2275 (2001).
353. Cao, V. *et al.* Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3739–3743 (2002).
354. 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.* **34**, 2210–2216 (1990).
355. Sanger, F. & Coulson, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**, 441–448 (1975).
356. Zankari, E. *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2640–2644 (2012).
357. Price, M. N., Dehal, P. S. & Arkin, A. P. FastTree 2 – Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLOS ONE* **5**, e9490 (2010).
358. Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y. & Lam, T. T.-Y. ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol. Evol.* **8**, 28–36 (2017).
359. Yu, G., Lam, T. T.-Y., Zhu, H. & Guan, Y. Two methods for mapping and visualizing associated data on phylogeny using ggtree. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 3041–3043 (2018).
360. Gibreel, T. M. *et al.* Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 346–356 (2012).
361. Larsen, M. V. *et al.* Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1355–1361 (2012).
362. 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* **4**, (2018).
363. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
364. Nurk, S. *et al.* Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol.* **20**, 714–737 (2013).
365. Huson, D. H. & Bryant, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 254–267 (2006).

-
366. Csardi, G. & Nepusz, T. The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Syst.* **1695**, 1–9 (2006).
367. Ozer, E. A., Allen, J. P. & Hauser, A. R. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGent. *BMC Genomics* **15**, 737 (2014).
368. McKenna, A. *et al.* The genome analysis toolkit: a mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
369. Li, H. *et al.* The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
370. Stamatakis, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313 (2014).
371. Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **47**, W256–W259 (2019).

Titre : Epidémiologie des bacilles à Gram négatif dans la communauté, l'environnement et la nourriture

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif fréquemment responsables d'infections nosocomiales. Leur diffusion dans les systèmes de soins a été bien caractérisée mais le portage intestinal et les dynamiques de transmission de ces pathogènes dans la communauté sont mal connus. Le concept *One Health* supporte l'idée que les populations bactériennes trouvées chez les humains, les animaux et dans l'environnement sont interconnectées. Les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE), responsables d'infections associées à une forte morbi-mortalité, présentent un intérêt particulier car elles contaminent largement la nourriture, qui pourrait être ainsi une source d'EBLSE pour les consommateurs. Nous avons utilisé une approche de *whole genome sequencing* (WGS) sur une large collection d'isolats provenant de résidents d'établissements de long séjour, d'aliments et d'eaux usées de cinq villes européennes. Une première étude a montré qu'en général les populations d'EBLSE issues d'aliments et d'eaux usées sont dissociées et possèdent des gènes de résistance aux antibiotiques différents. Ceci suggère que l'alimentation n'est pas une source majeure d'EBLSE pour l'homme. Une seconde étude a relevé que les résidents de centres de long séjour étaient très fréquemment (51,6%) porteurs digestifs de *P. aeruginosa*. Ce portage était associé à l'âge et à l'obésité et concernait une population de *P. aeruginosa* génétiquement très diverse. Globalement, nos données montrent que la compréhension complète de la diffusion des bacilles à Gram négatif et celle des gènes de résistance aux antibiotiques requiert l'examen des génomes bactériens complets.

Mots clés : *E. coli*, *K. pneumoniae*, BLSE, CTX-M, nourriture, environnement, *P. aeruginosa*, portage.

Title: Epidemiology of Gram-negative bacilli in the community, the environment and food products

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* are Gram-negative bacilli frequently involved in nosocomial infections. Their dissemination in health care systems has been well characterized but the intestinal carriage and transmission dynamics of these pathogens in the community are poorly understood. The One Health concept supports the idea that bacterial populations found in humans, animals and the environment are interconnected. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae (ESBL-PE), responsible for infections associated with high morbidity and mortality, are of particular interest because they widely contaminate food, which could thus be a source of EBLSE acquisition for consumers. We used a whole genome sequencing (WGS) approach on a large collection of isolates from residents of long-term care facilities, food and wastewater from five European cities. A first study showed that, in general, ESBL-PE populations from food and sewage are different and have different antibiotic resistance genes. This suggests that food is not a major source of ESBL-PE for humans. A second study found that residents of long-term care facilities were very frequent (51.6%) digestive carriers of *P. aeruginosa*. This carriage was associated with age and obesity and concerned a genetically very diverse population of *P. aeruginosa*. Overall, our data show that a complete understanding of the diffusion of Gram-negative bacilli and antibiotic resistance genes requires the examination of complete bacterial genomes.

Keywords: *E. coli*, *K. pneumoniae*, ESBL, CTX-M, food products, environment, *P. aeruginosa*, intestinal carriage.