



HAL
open science

Identification de marqueurs bactériens chez Enterobacter associés au sepsis néonatal sévère

Enrique Hernandez Alonso

► **To cite this version:**

Enrique Hernandez Alonso. Identification de marqueurs bactériens chez Enterobacter associés au sepsis néonatal sévère. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ029 . tel-03828111

HAL Id: tel-03828111

<https://theses.hal.science/tel-03828111>

Submitted on 25 Oct 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.

**IDENTIFICATION DE MARQUEURS
BACTÉRIENS CHEZ *Enterobacter* ASSOCIÉS
AU SEPSIS NÉONATAL SÉVÈRE**

*IDENTIFICATION OF BACTERIAL MARKERS IN Enterobacter ASSOCIATED
WITH SEVERE NEONATAL SEPSIS*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°569, innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Microbiologie
Graduate School : Santé et médicaments
Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC) (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS)**, sous la direction de **Florence DOUCET-POPULAIRE**, Professeure, le co-encadrement de **Nadège BOURGEOIS-NICOLAOS**, maîtresse de conférences

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 6 juillet 2022, par

Enrique HERNANDEZ ALONSO

Composition du Jury

Philippe LANOTTE Pr, Université de Tours	Président
Julio AIRES Pr, Université Paris-Descartes	Rapporteur & Examineur
Jean-Winoc DECOUSSER Pr, Université Paris Est Créteil	Rapporteur & Examineur
Marine BUTIN Dr, Université Lyon I	Examinatrice
Julie GUIGNOT Dr, Institut Cochin-INSERM	Examinatrice
Florence DOUCET-POPULAIRE Pr, Université Paris Saclay	Directrice de thèse

Titre : Identification de marqueurs bactériens chez *Enterobacter* associés au sepsis néonatal sévère

Mots clés : *Enterobacter*, Sepsis, Réanimation néonatal, Infection bactérienne, Biomarqueurs

Résumé. *Enterobacter* est un pathogène nosocomial à Gram-négatif émergent responsable d'épidémies en réanimation néonatale (RNN). Au cours des 50 dernières années, sa taxonomie a évolué, rendant son épidémiologie ambiguë. Récemment, diverses techniques de biologie moléculaire, notamment le séquençage du génome entier, ont permis de mieux comprendre sa taxonomie et son épidémiologie. L'objectif de cette thèse était de rechercher des marqueurs microbiologiques associés à la gravité des bactériémies chez les nouveau-nés prématurés. Le premier marqueur microbiologique identifié était l'espèce. Dans ce contexte, *E. xiangfangensis* et *E. bugandensis* ont été identifiés comme les espèces les plus fréquentes en RNN. *E. xiangfangensis* est plus résistant aux antibiotiques que *E. bugandensis*. En revanche, *E. bugandensis* est associé à une mortalité plus élevée et semble plus virulent que *E. xiangfangensis*. En outre, l'analyse structurale du lipide A d'*E. bugandensis* a révélé la présence du 2-hydroxymyristate, une modification catalysée par l'enzyme LpxO.

La présence de LpxO chez *E. bugandensis* était associée à la gravité de la bactériémie néonatale. L'étude du génome d'*E. bugandensis* a montré la présence d'autres facteurs de virulence tels que des fimbriae, des adhésines, des sidérophores et le T6SS. Ces résultats suggèrent que le potentiel de colonisation, la persistance et la virulence d'*E. bugandensis* sont différents de ceux des autres espèces du même genre, soulignant l'importance d'une identification précise au niveau de l'espèce, et en particulier d'*E. bugandensis* portant LpxO. Les incubateurs ont été identifiés comme un réservoir important pour la transmission des infections nosocomiales en RNN. Nos résultats suggèrent que les épidémies d'*Enterobacter* en RNN sont multi-espèces et multi-clonales. En conclusion, *E. bugandensis* a été identifié comme l'espèce type responsable de sepsis néonatal sévère chez les prématurés. Par conséquent, une surveillance épidémiologique des taux de colonisation chez les nouveau-nés dans la RNN devrait être mis en œuvre.

Title: Identification of bacterial markers in *Enterobacter* associated with severe neonatal sepsis

Keywords: *Enterobacter*, Sepsis, Neonatal Intensive Care Unit, Bacterial infection, Biomarkers

Abstract: *Enterobacter* is an emerging gram-negative nosocomial pathogen responsible for outbreaks in the neonatal intensive care unit (NICU). Over the past 50 years, its taxonomy has evolved, making its epidemiology ambiguous. Recently, various molecular biology techniques, including whole-genome sequencing, have provided a better understanding of its taxonomy and epidemiology. The objective of this thesis was to search for microbiological markers associated with the severity of bacteremia in preterm newborns. The first microbiological marker identified was the species. In this context, *E. xiangfangensis* and *E. bugandensis* were identified as the most frequent species in the NICU. *E. xiangfangensis* is more resistant to antibiotics than *E. bugandensis*. In contrast, *E. bugandensis* is associated with higher mortality and appears to be more virulent than *E. xiangfangensis*. In addition, structural analysis of *E. bugandensis* lipid A revealed the presence of 2-hydroxymyristate, a modification catalyzed by the enzyme LpxO.

The presence of LpxO in *E. bugandensis* was associated with the severity of neonatal bacteremia. The study of the *E. bugandensis* genome showed the presence of other virulence factors such as fimbriae, adhesins, siderophores and T6SS. These results suggest that the colonization potential, persistence, and virulence of *E. bugandensis* are different from other species in the same genus, emphasizing the importance of accurate identification to the species level, and in particular of *E. bugandensis* carrying LpxO. Incubators have been identified as an important reservoir for the transmission of nosocomial infections in the NICU. Our results suggest that *Enterobacter* outbreaks in the NICU are multispecies and multiclonal. In conclusion, *E. bugandensis* has been identified as the typical species responsible for severe neonatal sepsis in preterm infants. Therefore, epidemiological surveillance of colonization in newborns in the NICU should be implemented.

REMERCIEMENTS

UNIVERSITÉ PARIS SACLAY

Au Professeur Christian POÛS

Physiopathogénèse et Traitement des Maladies du Foie (INSERM UMRS-1193)

Faculté de Pharmacie -Université Paris Sud

Directeur de l'École Doctorale ED569 « Innovation thérapeutique, du fondamental à
l'appliqué »

Au Professeur Imad KANSAU

Unité Bactéries Pathogènes et Santé

Faculté de Pharmacie -Université Paris Sud

Chef du pôle de Microbiologie de l'École Doctorale ED569 « Innovation
thérapeutique, du fondamental à l'appliqué »

INSTITUTE DE BIOLOGIE INTÉGRATIVE DE LA CELLULE (I2BC)

Au Professeur Frédéric BOCCARD

Directeur de l'Institute de biologie Intégrative de la Cellule

Au Professeur Maïté PATERNOSTRE

Directeur adjoint de l'Institute de biologie Intégrative de la Cellule

Au Professeur Pierre TISSIÈRES

Chef de service - Service de Réanimation Pédiatrique de l'Hôpital Bicêtre AP-HP

Co-responsable de l'équipe "host-pathogen interactions in sepsis"

Au Dr Luis AUGUSTO

IR2 – Ingénieur – Equipe « Host Pathogen Interactions

in Human Sepsis »

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

(CONACyT)

MÉXICO
GOBIERNO DE LA REPÚBLICA



Au CONACyT et le programme de bourses

« **CONACYT - Gobierno de Francia para Doctorados 2019** » pour le financement de mon
séjour avec la bourse 2019-000004-01EXTF-00028

DIRECTRICE DE THÈSE

Au Professeur Florence DOUCET-POPULAIRE

Faculté de Pharmacie - Université Paris Saclay

Chef du service Bactériologie et Hygiène de l'Hôpital Antoine Bécclère, AP-HP

Université Paris-Saclay

Co-responsable de l'équipe "host-pathogen interactions in sepsis"

I2BC UMR 9198, CNRS, CEA, Université Paris Saclay, Gif sur Yvette

Je tiens à dire un grand merci tout d'abord au Pr Florence Doucet-Populaire d'avoir cru en ce projet et d'avoir fait confiance en mes capacités pour me recevoir en tant que doctorant. J'ai toujours pensé que certaines personnes sont nées pour inspirer et je suis sûre que vous est l'une d'entre elles. Le chemin n'a pas été facile pour nous deux à bien des égards, à commencer par la crise sanitaire et la langue française. Cependant, je peux dire que grâce à votre patience, vos conseils et la direction de ce travail, j'ai grandi professionnellement et nous avons atteint notre objectif. Merci infiniment Florence.

CO- ENCADRANTE DE THÈSE

Au Docteur Nadège BOURGEOIS-NICOLAOS

Maitre de Conférence

Faculté de Pharmacie - l'Université Paris Saclay

Je tiens à remercier Nadège pour le temps investi dans cette thèse. Pour sa patience et ses conseils pour améliorer le travail que nous avons fait. Pour toutes les longues heures de révision des textes, tableaux, figures, articles et de la thèse elle-même. Je suis sûr que vous serez un excellent directeur de thèse dans un avenir proche. La curiosité est un don nécessaire dans la recherche scientifique et vous en avez beaucoup. Merci d'être comme Florence une source d'inspiration pour moi. Merci.

Je tiens à remercier tout particulièrement au **Dr Luis Augusto** pour son soutien méthodologique et personnel depuis mon arrivée à Paris. De manière générale, je tiens à remercier les techniciens de l'hôpital Antoine Béchère, particulièrement à Kahina, Margaux, Mariana, Millie pour leur soutien au laboratoire et pour m'avoir fait profiter de leur expérience. À Isabelle pour la relecture et correction de la grammaire.

AU JURY

Tout d'abord, je tiens à remercier au rapporteurs **Pr Julio AIRES** de l'Université Paris-Descartes et **Pr Jean-Winoc DECOUSSE** de l'Université Paris Est Créteil pour avoir examiné et jugé cette thèse. Je suis heureux d'enrichir ce travail de thèse grâce à l'expérience et aux connaissances, ainsi qu'aux contributions que vous pourriez avoir pour améliorer ce travail. Merci d'avoir pris le temps de lire et de relire ce manuscrit.

Je tiens également à remercier au président du jury **Pr Philippe LANOTTE** de l'Université de Tours et les examinateurs, **Dr Marine BUTIN** de l'Université Lyon I et **Dr Julie GUIGNOT** de l'Institut Cochin-INSERM pour avoir accepté de faire partie du jury pour l'évaluation de ce projet de thèse. Leur expérience et leurs connaissances apportent une valeur ajoutée à ce travail. Merci.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero dirigirme a mis padres y hermanos para agradecerles.

A mi madre, Isabel, quiero especialmente agradecerle por todo el apoyo que me ha dado desde el principio de mi formación académica y profesional. Han pasado ya muchos años desde aquel primer día que me fui de la casa para emprender esta travesía. Y en todo momento usted siempre ha estado ahí presente.

A mi padre Filogonio, a mis hermanos, Adrian, Citlati y Gustavo. Muchas gracias.

Quiero agradecer también a mis tíos Artemia y Marco por su apoyo incondicional desde el momento en que les dije que me iba a hacer el doctorado. Gracias por estar presentes y por comprender la complejidad de este proyecto, por ser una inspiración y por motivarme a ir hasta el final. Gracias.

También quiero agradecer a mis amigos (Héctor, Zuly, Xade, Mau, Luz) que aún en la distancia y después de casi tres años de no vernos, siempre han estado ahí, en las buenas y en las no tan buenas, siempre intentado reunirnos, aunque ya no funcione como antes. Sin embargo, se que cuando nos vemos es como si no hubiera pasado el tiempo. Quiero agradecer especialmente a Clau por estar durante estos tres años, ser una confidente y amiga de la vida. A Oli, la única persona que comprendió lo difícil que ha sido esta aventura, porque nos encontramos en la misma situación. Gracias por esas largas horas al teléfono que me dieron en muchas ocasiones las fuerzas y voluntad para continuar, porque más de una vez pensé en retirarme. Gracias a todos.

Je tiens également à remercier la famille que je me suis faite à Paris, César et Annia, compagnons expatriés d'aventures inoubliables. Merci pour votre compagnie, vos conseils et pour avoir partagé avec moi votre séjour à Paris. Je tiens également à remercier toutes les personnes (Pepe, Gabrielle et Giulia) qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de ce projet.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement Julien. Merci de m'avoir toujours soutenu et encouragé lorsque les choses allaient mal. Merci de me soutenir de bien des manières, y compris moralement, merci de voir en moi ce que même moi je ne peux pas voir dans les moments les plus difficiles. Merci Juju.

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	1
LISTE DES FIGURES.....	3
LISTE DES TABLEAUX.....	6
ÉTAT DE L'ART.....	7
1. SEPSIS NÉONATAL.....	8
1.1 Infection bactérienne néonatale	9
1.2 Définition de sepsis néonatal.	10
1.3 Facteurs de risque	14
1.4 Symptômes cliniques.....	16
1.5 Diagnostic	16
1.5. 1 Diagnostic conventionnel	16
1.5.2 Nouvelles méthodes de diagnostic.....	19
2. <i>Enterobacter</i> spp.	21
2.1 Microbiologie et niche écologique.....	22
2.2 Taxonomie	25
2.3 Dernières espèces décrites.....	32
3. Épidémiologie	32
4. Pathogénicité.....	36
5. Résistance aux antibiotiques	41
5.1 Mécanismes moléculaires de la résistance	41
5.2 Résistance aux antibiotiques chez <i>Enterobacter</i>	42
5.3 Phénotype naturel de la résistance aux antibiotiques chez <i>Enterobacter</i>	43
5.4 Résistance naturelle aux antibiotiques due à la céphalosporine AmpC.....	45
5.4.1 Régulation d'AmpC	45
5.4.2 β -lactamase type AmpC.....	46
5.5 Résistance acquise aux β -lactamines	49
5.5.1 Acquisition de gènes codant pour des β -lactamases.....	52
5.5.2 Résistance acquise aux aminosides	53
5.5.3 Résistance acquise aux quinolones.....	53
5.5.4 Modifications membranaires et pompes à efflux	54
5.5.5 Résistance à la colistine	55
5.6 Traitement des infections.....	55
6. Diagnostic d'espèces.....	58
6.1 Méthodes pour le diagnostic des espèces	58
6.2 Épidémiologie moléculaire et analyse du génome.....	61

6.2.1	Identification moléculaire des espèces bactériennes.....	62
6.2.1.1	Identification par séquençage Sanger.....	62
6.2.1.2	Identification par WGS.....	64
6.3	Typage des populations bactériennes.....	65
6.3.1	Typage par PCR et PFGE.....	65
6.3.2	Typage par WGS.....	67
6.4	Analyse du génome	69
3.	LIPOPOLYSACCHARIDES	73
7.1	Fonction et biogenèse du lipopolysaccharide.....	74
7.2	Endotoxines lipopolysaccharides.....	75
7.3	Structure du LPS.....	75
7.3.1	La chaîne O	77
7.3.2	Core polysaccharide	77
7.4	Biogénèse du LPS	83
7.5	Modifications.....	88
7.5.1	2-hydroxylation d'un acide gras	92
	CONTEXTE ET OBJECTIFS	94
	TRAVAUX PERSONNELS	98
	PREMIER ARTICLE.....	99
	<i>dnaJ</i> : A New Approach to Identify Species within the Genus <i>Enterobacter</i>	99
	Contexte	100
	DEUXIÈME ARTICLE	114
	Contaminated incubators: Source of a multispecies <i>Enterobacter</i> outbreak of neonatal sepsis ..	114
	Contexte	115
	TROISIÈME ARTICLE	127
	Comparative analysis of <i>Enterobacter bugandensis</i> genomes reveals lineage-specific gene differences and evidence their high virulence.....	127
	Contexte	128
	Résistance aux antibiotiques de la cohorte SENSE	163
	QUATRIÈME ARTICLE	168
	Presence of 2-hydroxymyristate on endotoxins is associated with death in neonates with <i>Enterobacter cloacae</i> complex septic shock	168
	Contexte	169
	Construction du mutant LpxO	191
	DISCUSSION	197
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	206
	RÉFÉRENCES.....	211
	COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	258

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé

ANI : Average Nucleotide Identity

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique

ASM : Milieu d'Expectoration Artificielle

BGN : Bacilles à Gram-Négatif

BLSE : β -Lactamases à Spectre Étendu

C3G : Céphalosporines de Troisième Génération

C4G : Céphalosporines de Quatrième Génération

cAmpCs : AmpC chromosomiques

CEC : Complexe *E. cloacae*

DDH : DNA-DNA Hybridization

ESCPM : *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii* et *Morganella morganii*.

ESKAPE : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

HAS : Haute Autorité de Santé

IAS : Infections Associées aux Soins

IBN : Infection Bactérienne Néonatale

IBNP : Infection Bactérienne Néonatale Précoce

IBNT : Infection Bactérienne Néonatale Tardive

LCR : Liquide Céphalo Rachidien

LPS : Lipopolysaccharide

MALDI-TOF MS : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry

MLSA : Multilocus Sequence Analysis

MLST : Multilocus Sequence Typing

OGRI : Overall Genome Relatedness Index
PCR : Polymerase Chain Reaction
PLP : Protéines de Liaison à la Pénicilline
QRDR : Quinolone Resistance Determining Region
RNN : Réanimation Néonatale
SB : Streptocoques du groupe B
SFN : Société Française de Néonatalogie
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
ST : Sequence Typing
T3SS : Système de Sécrétion de Type III
T6SS : Système de Sécrétion de Type VI
WGS : Whole-Genome sequencing

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Modifications de la réponse pro et anti-inflammatoire du système immunitaire au cours du sepsis et du choc septique.....	11
Figure 2 Vue d'ensemble des différents aspects du dysfonctionnement immunologique.....	14
Figure 3 Workflow méthodologique pour l'identification bactérienne et la sensibilité aux antibiotiques.....	20
Figure 4 Niche écologique d' <i>Enterobacter</i> sp.	22
Figure 5 Représentation graphique du génome d' <i>Enterobacter</i> à partir de la souche de référence ATCC 13047.....	24
Figure 6. Principaux changements dans la taxonomie d' <i>Enterobacter</i> spp., au cours des 50 dernières années.....	26
Figure 7 Arbre phylogénétique basé sur le génome de 22 espèces décrites dans le genre <i>Enterobacter</i>	30
Figure 8 Carte montrant la prévalence de différents agents pathogènes dans l'USIN dans une étude menée en Afrique et en Asie du Sud..	35
Figure 9 Organisation génétique de gènes T6SS dans les souches <i>Enterobacter</i>	38
Figure 10 Cartographie des principaux gènes du virulome et du résistome dans le génome d' <i>E. bugandensis</i> 21 GII.....	40
Figure 11 Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les pathogènes ESKAPE	42
Figure 12 Pourcentages d'agents étiologiques résistants aux antimicrobiens de la bactériémie néonatale.....	44
Figure 13 Régulation d'AmpC.....	46
Figure 14 Schéma basé sur le génome pour la classification au niveau d'espèce.....	61

Figure 15 Méthodes phénotypiques et génotypiques pour l'identification des espèces d' <i>Enterobacter</i> spp. proposé.....	63
Figure 16 Caractérisation microbiologique phénotypique et génotypique pour l'épidémiologie et le typage d' <i>Enterobacter</i>	66
Figure 17 Analyse du contenu génomique d'un micro-organisme.....	69
Figure 18 Schéma général présentant certains des outils bioinformatiques pour la caractérisation et le typage génomique chez les bactéries.	72
Figure 19 Architecture de l'enveloppe des bactéries à Gram-négatif.....	74
Figure 20 Structure générale du LPS des bactéries à Gram-négatif.....	76
Figure 21 Structures du core de pathogènes à Gram-négatif.....	78
Figure 22 Modèle des membranes interne et externe de <i>E. coli</i> K-12.....	79
Figure 23 Structure générale du lipide A détaillé de <i>E. coli</i>	81
Figure 24 Différentes structures de lipides A provenant de diverses bactéries et leur potentiel immunogène.....	82
Figure 25 Voie de synthèse des LPS, en utilisant <i>E. coli</i> comme modèle pour représenter sa biogenèse.....	84
Figure 26 Ajout de l'antigène O pour former le lipopolysaccharide.	86
Figure 27 Étape 2 de la biosynthèse et de l'exportation des LPS et de leurs précurseurs en utilisant <i>E. coli</i> comme modèle de référence.....	87
Figure 28 System à deux composants PhoP-PhoQ et PmrA-PmrB responsables des modifications du LPS.	90
Figure 29 La formation de la fraction L-Ara4N commence par l'oxydation de l'UDP-glucose en acide UDP-glucuronique.....	90
Figure 30 Principales modifications covalentes du Kdo2-lipide A chez <i>E. coli</i> K-12 et <i>Salmonella</i> comme référence pour les modifications du LPS chez les bactéries à Gram-négatif.....	92

Figure 31 Régulation des enzymes de modification du LPS chez <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovariety Typhimurium.....	93
Figure 32 Origène, espèces et antibiogramme de souches SENSE.....	165
Figure 33 Rapport entre le génotype et la CMI des souches SENSE.....	166
Figure 34 Schéma de la stratégie d'amplification des régions UP et Down flanquant <i>lpxO</i> et le clonage du fragment contenant la délétion dans le vecteur pGPI-Scel.....	194
Figure 35 Schéma de l'hybridation homologue permettant la délétion de <i>lpxO</i> sur le chromosome et le cross-over UP ou Down médié par <i>sacB</i>	195
Figure 36 Confirmation du mutant <i>lpxO</i> par séquençage Sanger.....	196

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Principaux agents pathogènes isolés dans le cadre d'une infection néonatal	12
Tableau 2 Part relative des microorganismes les plus fréquents dans le court séjour, spécifiquement dans la réanimation.	13
Tableau 3 Symptômes de la bactériémie néonatale.....	17
Tableau 4 Concordance entre les espèces et les Clusters au sein du CEC.....	28
Tableau 5 Changements majeurs dans la taxonomie au sein du genre <i>Enterobacter</i> . 29	
Tableau 6 Classification et nomenclature du genre <i>Enterobacter</i> au janvier 2020.....	31
Tableau 7 Mécanismes de résistance aux antibiotiques décrits chez <i>Enterobacter</i>	50
Tableau 8 Enzymes nécessaires à la biosynthèse du lipide A.....	85
Tableau 9 Enzymes impliquées dans le transport du LPS et de ses précurseurs.....	87
Tableau 10 Enzymes impliquées dans la modification structurale du lipide A chez les bactéries à Gram-négatif.	89
Tableau 11 Évaluation de la résistance aux antibiotiques par la méthode de microdilution en bouillon des souches non clonales d' <i>Enterobacter</i> spp.....	167
Tableau 12 Souches et plasmides utilisés dans cette étude.....	192

ÉTAT DE L'ART

1. SEPSIS NÉONATAL

1.1 Infection bactérienne néonatale

L'infection bactérienne néonatale (IBN) est la principale cause de morbidité et de mortalité chez les nouveau-nés, dont l'incidence de l'IBN varie d'une à quatre infections pour 1000 naissances vivantes. (Shane *et al.*, 2017, Lawn *et al.*, 2005). Les estimations des cas d'IBN diffèrent selon le contexte des pays, par exemple une étude menée aux États-Unis entre 2005 et 2008 sur 658 cas d'IBN mettait en évidence que 38% de ces infections étaient dues aux streptocoques du groupe B (SB) dont *Streptococcus agalactiae* est le plus importante et 24% à *Escherichia coli*. En outre, en France, sur 2166 nouveau-nés, 74% des infections sont dues au SB et 7% à entérobactéries (Oza *et al.*, 2015 ; L'Hériteau *et al.*, 2022). Les manifestations cliniques vont de l'infection avec manifestations subcliniques à l'infection avec manifestations sévères (Kim *et al.*, 2020). La source de l'agent pathogène peut être attribuée à une acquisition intra-utérine, auprès de la mère lors de l'accouchement (Edwards *et al.*, 2004), ou à une acquisition postnatale à l'hôpital ou dans la communauté (Popescu *et al.*, 2020). Les manifestations cliniques dépendent de divers facteurs tels que le moment de l'exposition, la taille de l'inoculum, l'état du système immunitaire du nouveau-né et la virulence de l'agent responsable de l'infection (Stoll *et al.*, 2011). Dans le cas des nouveau-nés dont le séjour à l'hôpital est prolongé, les processus invasifs, le faible poids de naissance et un système immunitaire immature jouent un rôle important dans l'acquisition d'infections associées aux soins (IAS). Le diagnostic par cultures microbiologiques, l'utilisation de scores de prédiction du sepsis, l'utilisation appropriée et responsable des antibiotiques et le développement de mesures préventives plus nombreuses et plus efficaces, y compris les vaccins maternels, sont quelques-uns des efforts déployés pour réduire et prévenir l'incidence des IAS (Procianoy *et al.*, 2020).

1. 2 Définition de sepsis néonatal.

Le terme sepsis est utilisé pour désigner une affection systémique d'origine bactérienne, virale ou fongique (levure) qui est associée à des changements hémodynamiques et à d'autres manifestations cliniques entraînant une morbidité et une mortalité importantes (Wynn *et al.*, 2014). Aujourd'hui, le sepsis touche surtout les âges extrêmes de la vie, les nouveau-nés (sepsis néonatal) et les seniors. Il existe trois types de prématurité : la prématurité moyenne se produit entre la 32^e et la 36^e semaine (7^e et 8^e mois de grossesse) d'aménorrhée, la grande prématurité se produit entre la 28^e et la 32^e semaine (6^e et 7^e semaines de grossesse) et la très grande prématurité se produit avant la 28^e semaine (moins de 7 semaines de grossesse).

Traditionnellement, la définition inclut l'isolement d'agents pathogènes dans des fluides normalement stériles tels que le sang ou le liquide céphalo-rachidien. Cependant, selon les caractéristiques cliniques, le sepsis peut être induit par de puissantes cytokines pro-inflammatoires, mieux connues sous le nom de syndrome de réponse inflammatoire systémique, qui a également été utilisé pour décrire la sepsis néonatal (**Figure 1**) (Shane *et al.*, 2017). L'IBN est classée en IBN précoce (IBNP) et en IBN tardive (IBNT) en fonction du début de l'infection par rapport à l'âge du nouveau-né (Shane *et al.*, 2017 ; Kim *et al.*, 2020 ; Camacho-Gonzalez *et al.*, 2013). Le taux de mortalité peut atteindre 35 % dans le cas de l'IBNP et entre 18 et 36 % dans le cas de l'IBNT (McGovern *et al.*, 2020).

- Les manifestations cliniques des IBNP apparaissent généralement dans les 72 premières heures de vie (3 premiers jours de vie) selon la Haute Autorité de Santé (HAS) (<https://www.has-sante.fr/>). Ce type d'infection est habituellement acquis à la naissance et représente généralement une transmission verticale de la mère à l'enfant. Les principaux micro-organismes responsables sont les SB (37%), *E. coli* (21,4%) et les streptocoques d'autres groupes comme

Streptococcus pneumoniae, (11,3%), germes communément présents dans le microbiote maternel (Glaser *et al.*, 2021).

- Les INBT apparaissent entre les 3 à 7 premiers jours et jusqu'à 3 mois d'âge et sont notamment attribuées aux interactions du nouveau-né avec le personnel médical et l'environnement hospitalier ou communautaire, après des procédures invasives (intubation endotrachéale, pose d'un cathéter central) ou simplement lors de l'exposition à une voie d'entrée comme la rupture de la barrière cutanée (Camacho-Gonzales *et al.*, 2013 ; Puopolo *et al.*, 2019). Les micro-organismes fréquemment rencontrés sont les *Staphylocoques* à coagulase négative (SCoN) (50 % des cas), *Staphylococcus aureus* (7 % des cas), les entérocoques et les bacilles à Gram-négatif (BGN) (entre 20 % et 42 %).

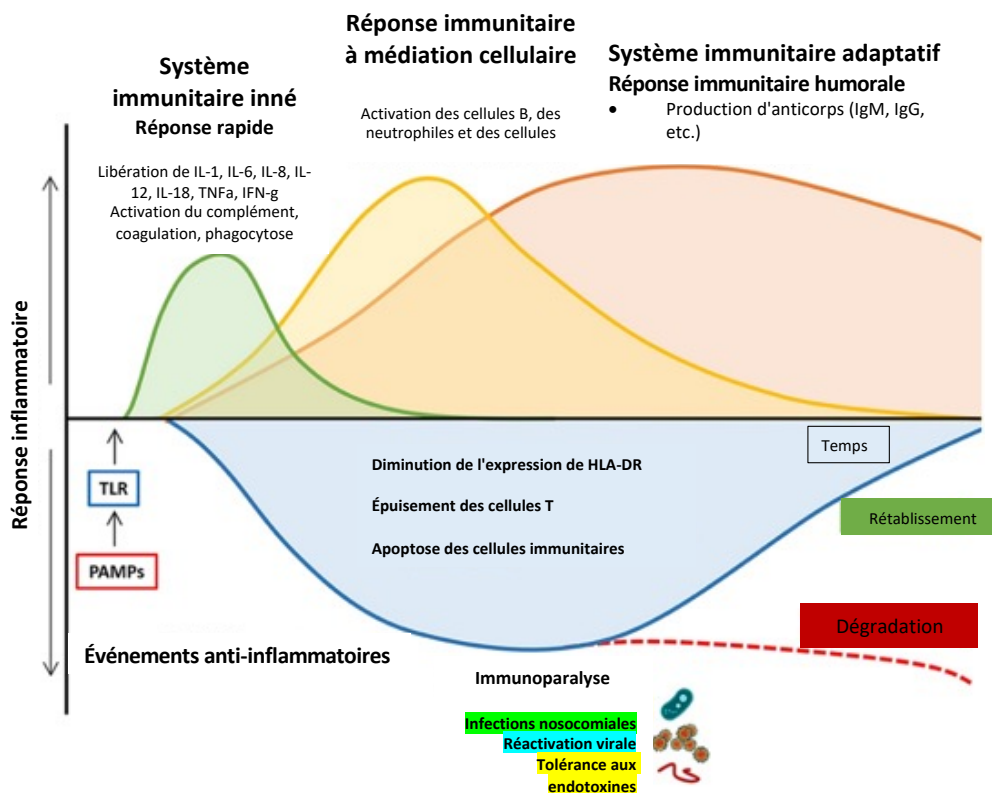


Figure 1 Modifications de la réponse pro et anti-inflammatoire du système immunitaire au cours du sepsis et du choc septique. Modifié de Jarczak *et al.*, 2021

Les agents pathogènes les plus fréquemment isolés dans les INBP et les INBT sont différents, cependant certains sont communs aux deux types de sepsis néonatal (**Tableau 1**).

Tableau 1 Principaux agents pathogènes isolés dans le cadre d'une infection néonatal. Adapté de Dong *et al.*, 2020 et Glaser *et al.*, 2021

Type d'INB			
INB précoce	Prévalence	INB tardif	Prévalence
SB	36%	SCoN	39-54%
<i>E. coli</i>	25%	<i>E. coli</i>	5-13%
<i>Enterobacter spp.</i>	7-14%	<i>Klebsiella sp.</i>	4-9%
<i>S. aureus</i>	2-7%	<i>S. aureus.</i>	6-18%
SCoN	1-5%	<i>Enterococcus sp.</i>	6-8%
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.5-6%	<i>Pseudomonas sp.</i>	3-5%

SCoN : staphylocoques à coagulase négative, SB : Streptocoque du groupe B

Selon l'Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé en France, par rapport à 2012, la documentation microbiologique des infections nosocomiales est en général plus élevée en 2017 (72,43%) qu'en 2012 (68,2%). La prévalence dans la réanimation néonatale est de 12,82% (<https://www.santepubliquefrance.fr/>). En plus, parmi les 4 232 microorganismes isolés d'une infection nosocomiale, les entérobactéries sont les plus fréquentes (43,78 %) devant les cocci à Gram-positif (34,19 %), pour une prévalence des patients infectés de 1,81 % et 1,44 % respectivement (**Tableau 2**).

Tableau 2 Part relative des microorganismes les plus fréquents dans le court séjour, spécifiquement dans la réanimation. Enquête nationale de prévalence 2017.

Micro-organismes	Courte séjour	Réanimation	Bactériémie
<i>E. coli</i>	594	15,8%	14,49%
<i>S aureus</i>	462	13.11%	15.94%
<i>P. aeruginosa</i>	244	10.83%	4.78%
<i>E. cloacae</i>	159	6.64%	4.24%
<i>K. pneumoniae</i>	194	4.90%	4.87%
<i>E. faecalis</i>	231	4.76%	4.63%
<i>S. epidermidis</i>	217	3.72%	13.9%

Cliniquement, les INBP et les INBT ont les mêmes caractéristiques. Dans les deux cas, au cours de la phase initiale, apparaissent des symptômes légers qui, s'ils ne sont pas identifiés et qu'un traitement n'est pas mis en place, évoluent vers une maladie grave, des signes vitaux instables, des manifestations du système nerveux central telles que l'irritabilité, la léthargie, des crises et finalement une défaillance de plusieurs organes, entraînant généralement la mort (Stoll *et al.*, 2011). Enfin, entre l'apparition de la maladie et son stade final, les manifestations cliniques peuvent être rapides et ne durer que quelques heures ; ou bien le nourrisson peut présenter des signes légers pendant une journée ou plus avant de devenir instable (Simonsen *et al.*, 2014 ; Dong *et al.*, 2015). Dans la **Figure 2** est détaillée la réponse immunitaire de l'infection bactérienne.

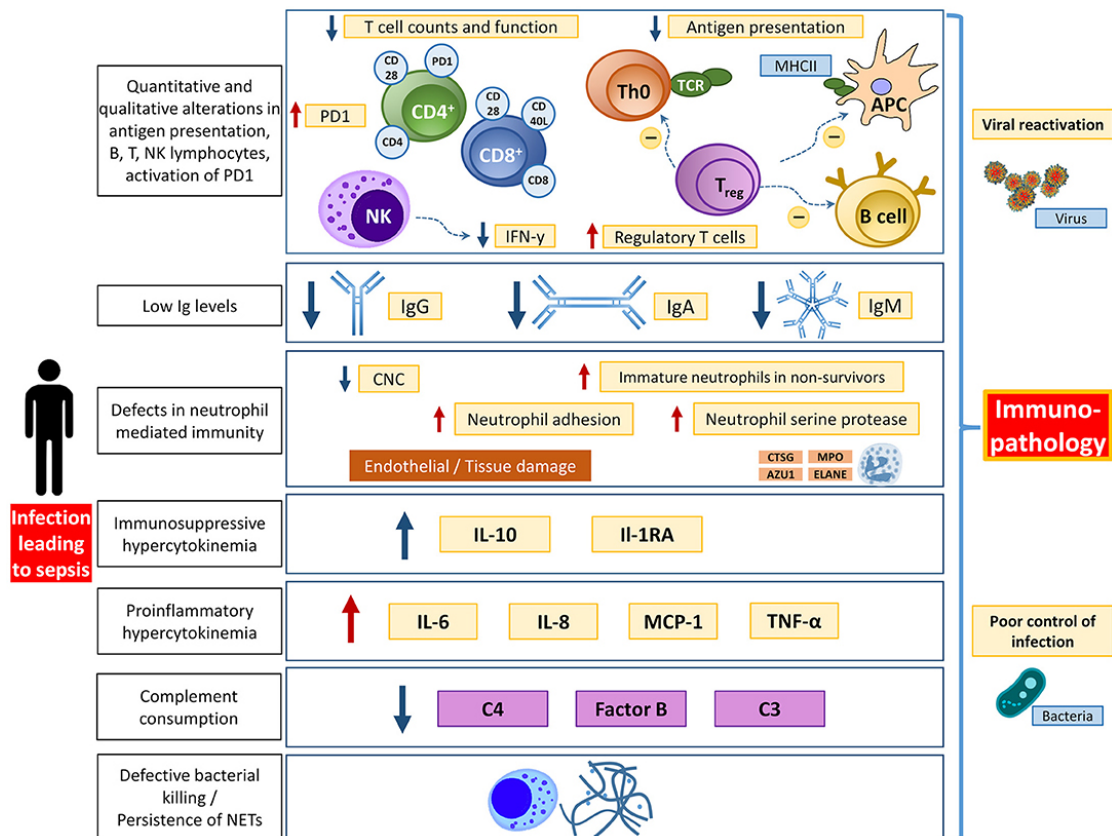


Figure 2 Vue d'ensemble des différents aspects du dysfonctionnement immunologique pendant l'infection bactérienne. Tiré de Jarczак *et al.*, 2021

1.3 Facteurs de risque

Les enfants prématurés de faible poids de naissance (<2500g) sont 3 à 10 fois plus susceptibles de souffrir d'une infection bactérienne agressive que les enfants à terme de faible poids de naissance (Murthy *et al.*, 2019, Ocviyanti *et al.*, 2018). La mortalité associée au sepsis néonatale est de 15.6 % dans le monde entier (McGovern *et al.*, 2020). D'autre part, l'immaturation du système immunitaire et l'absence d'anticorps IgG transplacentaires chez les prématurés peuvent également augmenter le risque d'infection (Fanaroff *et al.*, 2020). De plus, les nouveau-nés qui doivent subir des interventions invasives, une intubation endotrachéale ou d'autres procédures invasives qui constituent une porte d'entrée pour les micro-organismes pathogènes,

augmentent le risque d'infection (Liu *et al.*, 2020). En outre, de faibles niveaux de 25-hydroxyvitamine D néonatale ont été associés à une bactériémie à déclenchement tardif (Ozdemir *et al.*, 2019).

Selon l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé (ANAES) en coordination avec l'HAS, qui a élaboré en 2002 un document intitulé " diagnostic et traitement curatif de l'infection bactérienne précoce du nouveau-né " actualisé en 2017 par la Société Française de Néonatalogie (SFN), les facteurs de risque de développer une IBN chez le nouveau-né peuvent être divisés en majeurs et mineurs :

Critères majeurs :

- Tableau évocateur d'infection intra-utérine (anciennement nommée chorio-amnionite).
- Bébé souffrant d'une infection de la mère à l'enfant.
- Température maternelle avant ou au début du travail $\geq 38^{\circ}\text{C}$.
- Prématurité spontanée < 35 semaines d'aménorrhée (SA).
- Durée d'ouverture de la poche des eaux ≥ 18 heures.
- Rupture prématurée des membranes avant 37 SA.
- Après une antibioprophylaxie maternelle complète.
- Antécédent d'infection de la mère à l'enfant par le SB.
- Une transmission vaginale du SB à la mère.
- Bactériurie à SB chez la mère pendant la grossesse.

Critères mineurs :

- Une durée prolongée d'ouverture de la poche des eaux ≥ 12 h mais < 18 h.
- Prématurité spontanée < 37 et ≥ 35 semaines d'aménorrhée.
- Anomalies du rythme cardiaque fœtal ou asphyxie fœtale inexplicée.
- Un liquide amniotique teinté.

Le rôle de la colonisation microbienne immédiatement après la naissance, même s'il s'agit d'un facteur de risque et entraîne une maladie, n'est actuellement pas compris, car il a été observé que la relation entre le nombre de cas de bactériémie néonatale et le nombre de patients colonisés par un pathogène donné n'est pas corrélée (Basu, 2015 ; Fanaroff *et al.*, 2020).

1.4 Symptômes cliniques

Les nouveau-nés atteints d'une IBN peuvent présenter des signes et des symptômes d'infection non spécifiques (**Tableau 3**). Les premiers symptômes sont peu nombreux et non spécifiques tels que l'apnée, la tachypnée ou la tachycardie couplées à des troubles respiratoires. Les symptômes tardifs peuvent inclure une insuffisance cardiaque, un choc, une insuffisance rénale, un dysfonctionnement hépatique, un œdème ou une thrombose cérébrale, une hémorragie ou une insuffisance surrénalienne, un dysfonctionnement de la moelle osseuse (neutropénie, thrombocytopenie, anémie) et une coagulation intravasculaire disséminée (Weiss *et al.*, 2020 ; Ershad *et al.*, 2019).

1.5 Diagnostic

1.5.1 Diagnostic conventionnel

Le diagnostic conventionnel fait appel à des examens de laboratoire, principalement par l'isolement de l'agent causal à partir d'un site stérile de l'organisme.

Tableau 3 Symptômes de la bactériémie néonatale. D'après Ershad *et al.*, 2019.

Système	Symptômes
Symptôme général	Fièvre, instabilité du tempérament, asthénie, mauvaise alimentation ou œdème.
Système gastro-intestinal	Distension abdominale, vomissements, diarrhée ou hépatomégalie.
Système respiratoire	Apnée, dyspnée, tachypnée, rétractions, malaise, grognement ou cyanose.
Système rénal	Oligurie
Système cardio-vasculaire	Pâleur, marbrures, peau froide et moite, tachycardie, hypotension ou bradycardie.
Système nerveux central	Irritabilité, léthargie, tremblements, crises, hyporéflexie, hypotonie, réflexe de Moro anormal, respiration irrégulière, fontanelle pleine ou cri aigu.
Système hématologique	Jaunisse, splénomégalie, pâleur, pétéchies, purpura ou saignement.

Selon la SFN, dans le document intitulé « Prise en charge du nouveau-né à risque d'infection néonatale bactérienne précoce (≥ 34 SA) » le diagnostic d'IBN chez le nouveau-né symptomatique est le suivant (SFN, 2017) :

a) Identifier les nouveau-nés à risque d'INBP.

- Une colonisation maternelle à SB durant la grossesse actuelle (prélèvement vaginal pour dépistage de SB positif soit par culture, soit par PCR rapide en per-partum, et/ou bactériurie à SB)
- Un antécédent d'infection néonatale à SB lors d'une précédente grossesse
- Une durée de rupture des membranes supérieure à 12 heures
- Une prématurité spontanée et inexpliquée < 37 SA
- Une fièvre maternelle $> 38,0^{\circ}$ C en per-partum (ou dans les 2 heures qui suivent l'accouchement)

b) Hémoculture

L'hémoculture est considérée comme l'examen de référence pour confirmer une IBN. Le sang est prélevé dans une veine périphérique ou dans l'intermédiaire d'un cathéter ombilical parfaitement désinfecté. Il est recommandé, dans la mesure du possible, de prélever au moins un volume de 1 ml de sang ou jusqu'à 2 ml en particulier si le nouveau-né a reçu des antibiotiques. Un échantillon de moins de 0,5 ml doit être considéré comme non conforme, mais ne doit pas être rejeté par le laboratoire. Les flacons pédiatriques sont recommandés. Ils doivent être incubés pendant au moins 5 jours, bien que la plupart des bactéries se développent au cours des 48 premières heures. Il faut donc attendre 48 heures pour que la culture soit considérée négative.

- c) Ponction lombaire avec examen bactériologique du Liquide Céphalo Rachidien (LCR) et analyse cytochimique.

Il est recommandé de réaliser une ponction lombaire dans la prise en charge du risque d'IBNP chez le nouveau-né ≥ 34 SA dans les conditions suivantes :

- Hémoculture positive à une bactérie pathogène.
- Nouveau-né présentant une altération de l'état général ou des signes cliniques neurologiques et dont l'état clinique est compatible avec le déroulement de la grossesse.

Si la ponction lombaire était indiquée mais ne pouvait pas être effectuée initialement, elle doit être effectuée dès que l'état du nouveau-né le permet. L'absence de réalisation de la ponction lombaire ne doit pas retarder l'administration de l'antibiothérapie. Les techniques d'amplification des acides nucléiques spécifiques pour SB et *E. coli* dans le LCR peuvent permettre une identification bactérienne plusieurs heures après le début de l'antibiothérapie (SFN, 2017).

Prélèvements bactériologiques à effectuer à la naissance :

- Liquide gastrique et prélèvements superficiels (périphériques). Le prélèvement du liquide gastrique et les prélèvements périphériques (oreilles et anus) ne sont plus recommandés dans la prise en charge du risque d'INBP chez le nouveau-né > 34 SA.
- Les frottis placentaires et la culture du placenta. En cas de fièvre maternelle avec notion d'exposition à *Listeria* et/ou d'anomalies macroscopiques placentaires (micro-abcès), il est recommandé de réaliser un frottis placentaire et une culture du placenta.

1.5.2 Nouvelles méthodes de diagnostic

Certains systèmes d'hémoculture automatisés sont capables de surveiller en permanence la présence de micro-organismes et d'émettre une alerte lorsque le résultat est positif, ce qui facilite le processus d'identification des agents pathogènes (**Figure 3**) (Candel *et al.*, 2018). La spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) contribue à l'identification rapide des microorganismes présents dans l'hémoculture, parfois même à la détermination du profil de résistance aux antibiotiques afin de mettre en place le traitement le plus approprié pour les organismes présents dans le sang (Abd El-Aziz *et al.*, 2021).

Récemment, certaines techniques de biologie moléculaire ont été utilisées pour accélérer le processus d'identification bactérienne dans les cas de bactériémie (Abd El-Aziz *et al.*, 2021). L'utilisation de la PCR multiplex sur des hémocultures positives permet d'identifier rapidement la présence de bactéries et de champignons ainsi que certains gènes de résistance aux antibiotiques dans les heures qui suivent la croissance bactérienne, ce qui facilite le diagnostic et oriente le traitement (Oeser *et al.*, 2020).

La PCR basée sur le gène codant l'ARNr 16S bactérien est une méthode prometteuse et les résultats sont facilement disponibles (Istanbullu *et al.*, 2019). De plus, seule une petite quantité d'échantillon est nécessaire et le test peut être effectué directement à partir de tissus ou de liquides organiques tels que du sang (Punia *et al.*, 2017). Les inconvénients de cette technique sont l'absence d'antibiogramme et une sensibilité élevée qui ne permet pas de faire la différence entre une infection active et une infection récemment résolue (Mussap *et al.*, 2007). Néanmoins, la probabilité de contamination de la PCR est élevée, ce qui nécessite de bien corréliser les résultats (Punia *et al.*, 2017). Enfin, de nouvelles approches utilisant des méthodes métagénomiques associées au gène 16S à partir du sang sont récemment explorées.

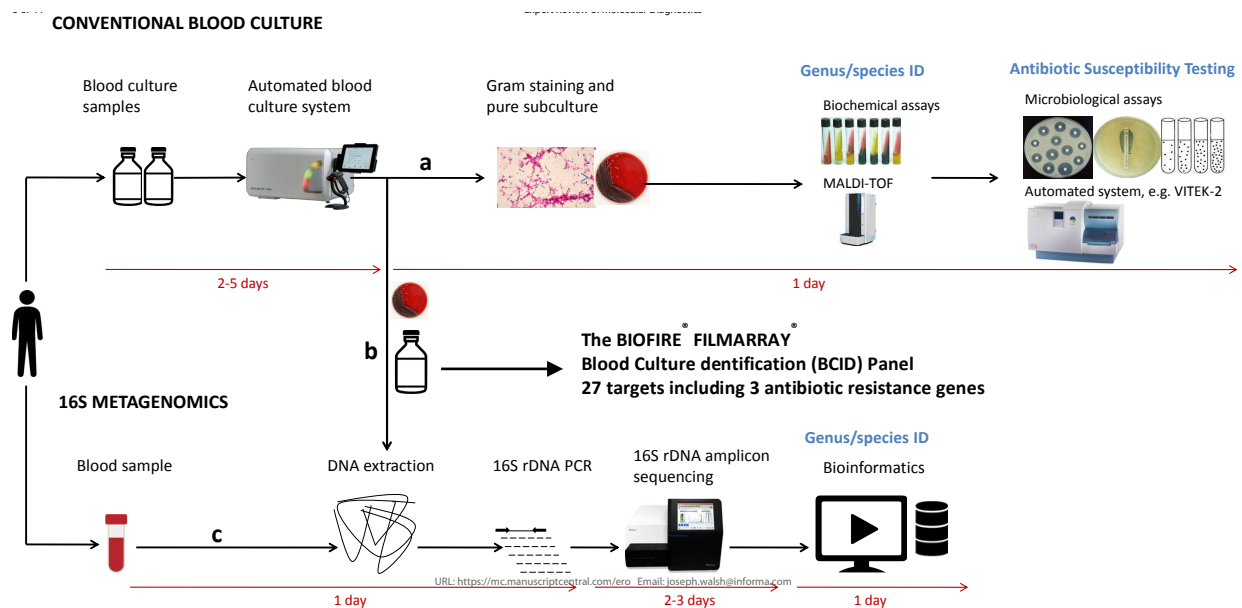


Figure 3 Workflow méthodologique pour l'identification bactérienne et la sensibilité aux antibiotiques : hémoculture conventionnelle (a), hémoculture combinée à la métagénomique 16S (b) et métagénomique 16S appliquée au sang (c). D'après Rutanga *et al.*, 2018

2. *Enterobacter* spp.

2.1 Microbiologie et niche écologique

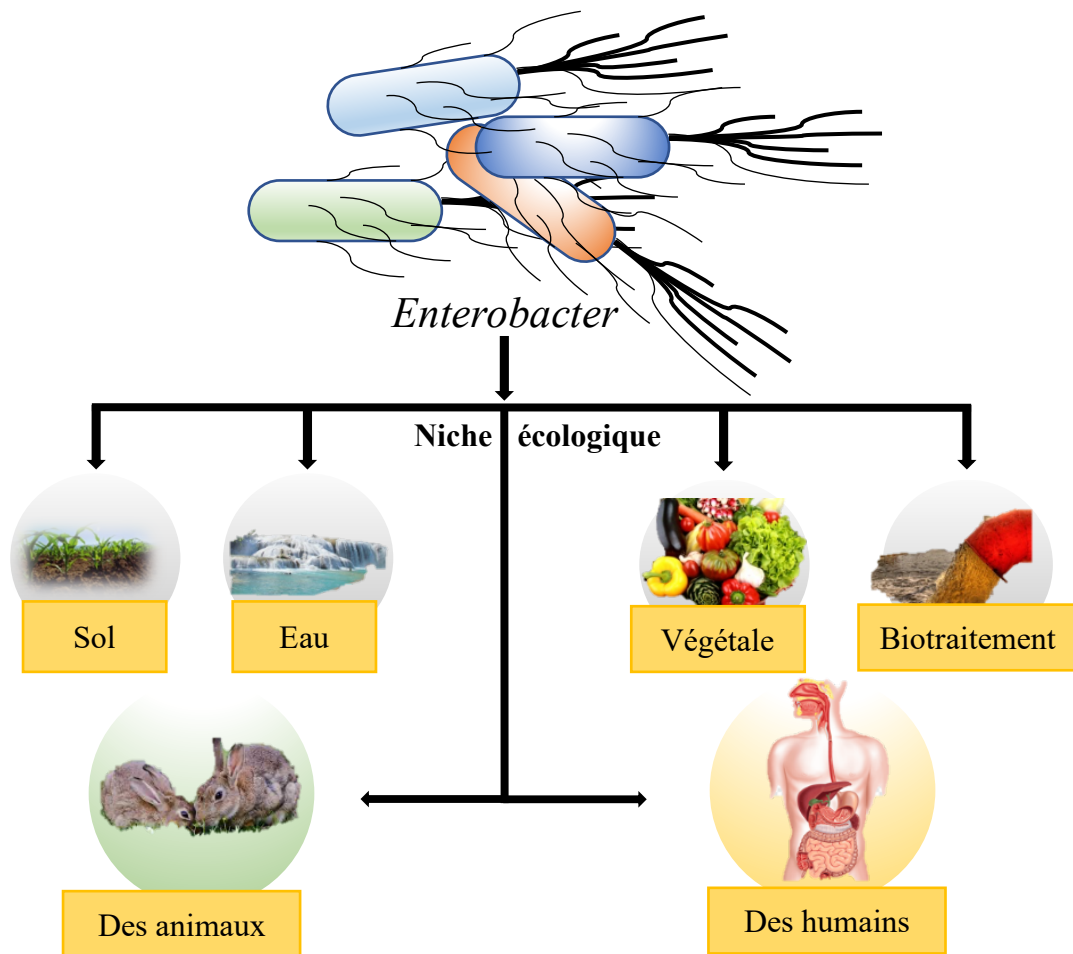


Figure 4 Niche écologique d'*Enterobacter* sp.

Le genre *Enterobacter* appartient à la famille des *Enterobacterales*. Ces anaérobies facultatifs à Gram-négatif, positifs à l'ornithine décarboxylase, mesurent environ 2 mm de long et sont mobiles en raison de la présence de flagelles péritriches (Grimont *et al.*, 2006). Certaines espèces sont non-mobiles (Ristuccia & Cunha, 1985). La formation de capsule a été mise en évidence (Springle *et al.*, 1973). Toutes les espèces d'*Enterobacter* sont catalase-positives et oxydase-négatives. La température optimale de croissance est de 30°C et tous fermentent le mannitol et forment du gaz à partir de certains sucres. Il est retrouvé dans le sol et l'eau et certaines espèces sont considérées comme phytopathogènes pour plusieurs végétaux (Manter *et al.*, 2011 ; Akita *et al.*, 2019). Certaines espèces sont fréquemment associées aux approches de biotraitement

et d'ingénierie métabolique (Daving-Regi *et al.*, 2019). En outre, les *Enterobacter* spp. sont également des commensaux naturels du microbiote intestinal des animaux et des humains (**Figure 4**) (Mezzatesta *et al.*, 2012). Parmi ces bactéries, seules certaines ont été associées à des infections et à des épidémies hospitalières (Arpin *et al.*, 1996 ; Daving-Regi *et al.*, 2019 ; Mardaneh *et al.*, 2016 ; Kämpfer *et al.*, 2015 ; Tetsuka *et al.*, 2019). Le génome (souche de référence *E. cloacae* ATCC 13047) contient un seul chromosome circulaire de 5 314 588 pb et deux plasmides circulaires, pECL_A et pECL_B, de 200 370 et 85 650 pb. Le contenu en GC global du chromosome est de 54,79 %, tandis que les deux plasmides ont des contenus en GC de 52,45 et 46,76 %. Au total, le chromosome contient 5 166 gènes codant pour 4 914 protéines, 24 gènes codant pour des ARNt et 8 opérons codant pour les ARNr (*rrn*) (**Figure 5**) (Ren *et al.*, 2010).

Au cours des dernières décennies, le genre *Enterobacter* a pris une importance particulière en médecine humaine, car il est apparu comme un important pathogène nosocomial dans les services de réanimation (Wisplinghoff *et al.*, 2004 ; Koratzanis *et al.*, 2011 ; Tato-Rodriguez *et al.*, 2016), en particulier dans le service de réanimation néonatale (RNN) (da Silva *et al.*, 2002 ; Talon *et al.*, 2004 ; Ferry *et al.*, 2020).

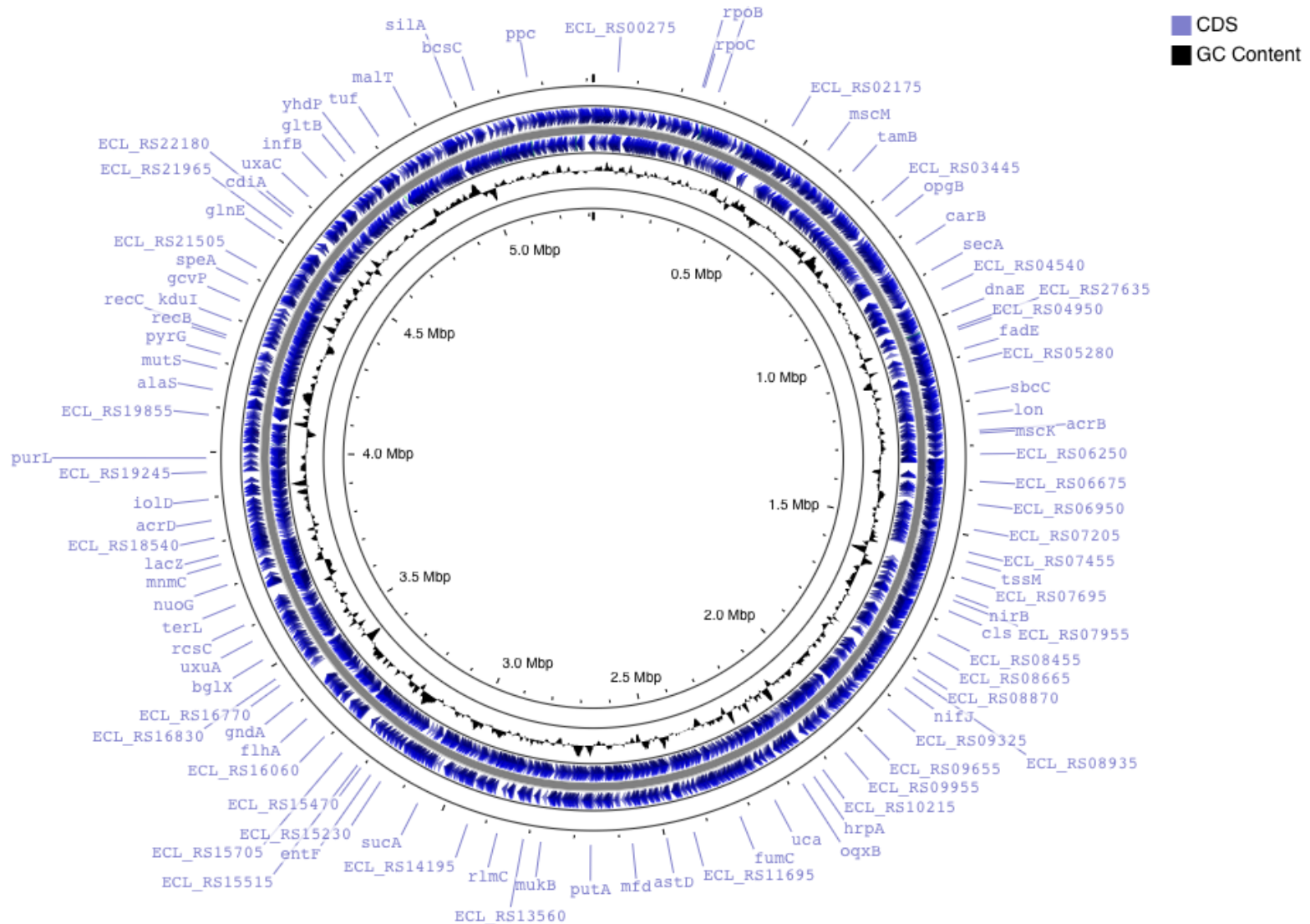


Figure 5 Représentation graphique du génome d'*Enterobacter* à partir de la souche de référence ATCC 13047. Les gènes codant pour les protéines sont représentés en bleu et le contenu en GC en noir. Pour la visualisation du génome, le site Proksee a été utilisé.

2.2 Taxonomie

La première description du genre a été faite en 1960 par Hormaeche et Edwards. Au fil des ans, 56 espèces et 7 sous-espèces ont été décrites (<https://lpsn.dsmz.de/search?word=Enterobacter>), cependant, plusieurs changements dans sa taxonomie ont eu lieu au cours des 50 dernières années, comme le montre la **Figure 6**. En 2019, 22 espèces sont décrites dans le genre *Enterobacter* (Mezzatesta *et al.*, 2012 ; Daving-Regi *et al.*, 2019) : *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. carcinogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvans*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. soli*, *E. taylorae* et *E. turicensis*. Certaines espèces comme *E. agglomerans* et *E. sakazakii* ont été retirées du genre (Tindal, 2014 ; Iversen *et al.*, 2007).

Par ailleurs, six espèces (*E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* et *E. nimipressuralis*) ont été décrites comme faisant partie de ce que l'on appelle le complexe *E. cloacae* (CEC) (Bouvet *et al.*, 1989 ; Hoffmann & Roggenkamp, 2003), car elles partagent un core génomique de 61 à 67% (Hoffmann & Roggenkamp, 2003).

En 2003, Hoffmann et Roggenkamp ont signalé la présence de 12 clusters génétiques (appelés Clusters I-XII) au sein du CEC basée sur la séquence partielle du gène *hsp60* (Hoffmann & Roggenkamp, 2003). Des noms spécifiques ont été attribués à certains clusters (**Tableau 4**), sauf le Cluster III, IV et IX (Morand *et al.*, 2009), concomitamment de nouvelles sous-espèces ont été décrites au sein du CEC (Sutton *et al.*, 2018).

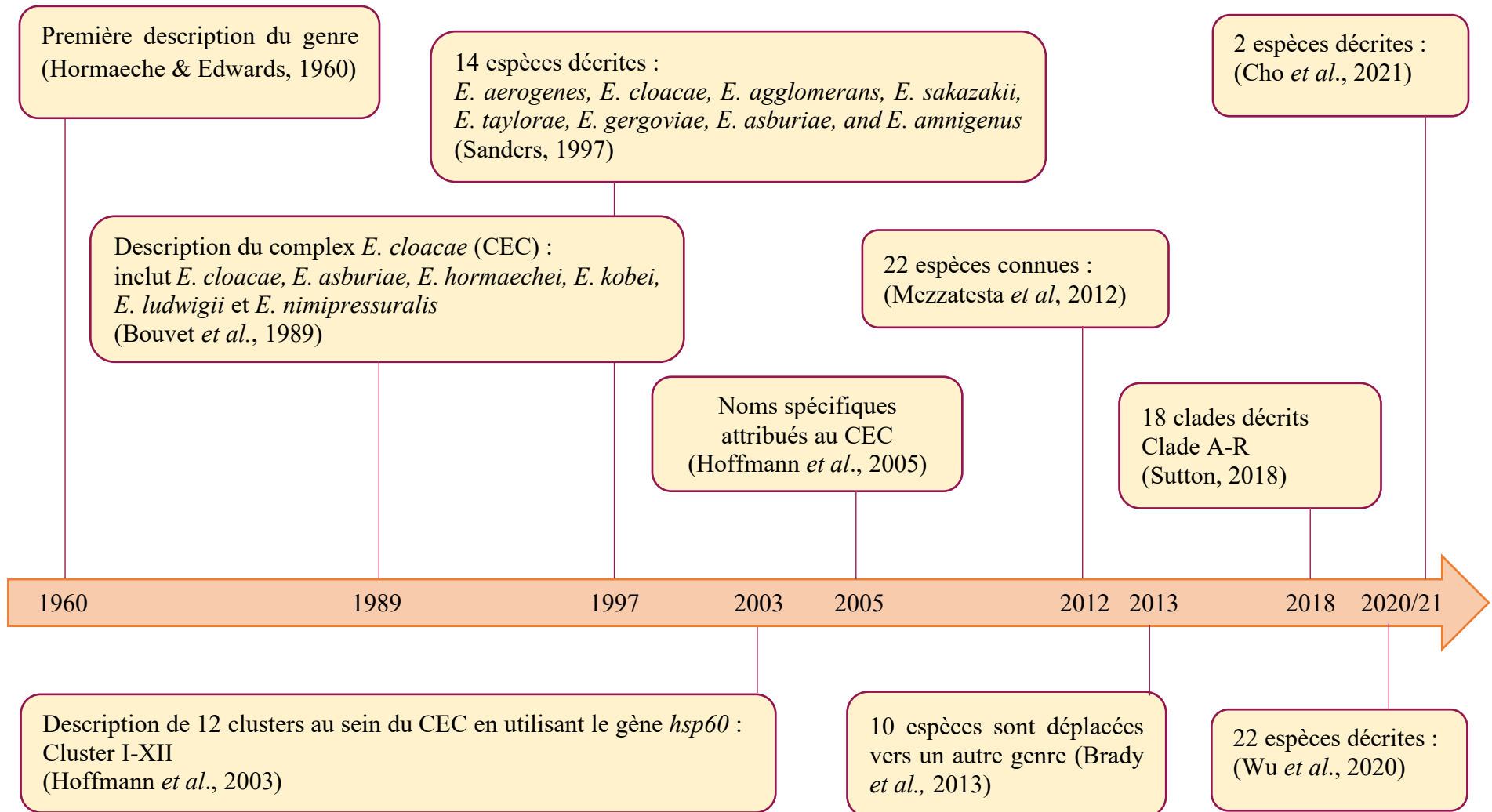


Figure 6. Principaux changements dans la taxonomie d'*Enterobacter* spp., au cours des 50 dernières années.

Enfin, l'émergence de différentes techniques bio-informatiques et l'analyse moléculaire basée sur le séquençage du génome entier (WGS, en anglais Whole-genome sequencing) ont amélioré la compréhension et l'identification précise des espèces au sein des genres bactériens. Ainsi, l'indice global de parenté génomique (OGRI, en anglais Overall genome relatedness index), qui estime le pourcentage d'identité entre deux génomes, a révolutionné la taxonomie microbienne. D'une part, l'identité nucléotidique moyenne (ANI, en anglais Average nucleotide identity) avec un seuil supérieur ou égal à 95-96% et d'autre part, l'analyse *in silico* de l'hybridation ADN-ADN (isDDH, en anglais *in silico* DNA-DNA hybridization aussi appelé dDDH pour digital DNA-DNA hybridization) avec un seuil supérieur ou égal à 75% pour l'assignation des espèces a permis la reclassification de plusieurs genres bactériens dont *Enterobacter* (Wu *et al.*, 2020).

Le travail le plus récent qui pourrait être considéré comme la classification la plus complète et la plus précise du genre a été réalisé et publié en 2020 par Wu *et al.* Après une analyse gnomique par ANI et dDDH sur tous les génomes du genre publiés dans les bases de données, ils montrent l'existence de 22 espèces jusqu'à cette date : (**Figure 7**) : *E. asburiae*, *E. bugandensis*, *E. cancerogenus*, *E. chengduensis*, *E. chuandaensis*, *E. cloacae*, *E. dissolvens*, *E. hoffmannii*, *E. hormaechei*, *E. huaxiensis*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. oligotrophica*, *E. quasihormaechei*, *E. quasimori*, *E. quasiroggenkampii*, *E. roggenkampii*, *E. sichuanensis*, *E. soli*, *E. wuhouensis* et *E. xiangfangensis* (Wu *et al.*, 2020).

Tableau 4 Concordance entre les espèces et les Clusters au sein du CEC.

Cluster	Espèce	Référence
I	<i>E. asburiae</i>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2005
II	<i>E. kobei</i>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2005
III	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>	Sutton <i>et al.</i> , 2018
IV	<i>E. roggenkampii</i>	Sutton <i>et al.</i> , 2018
V	<i>E. ludwigii</i>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2005
VI	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2005;
	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i>	Gu <i>et al.</i> , 2014
VII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2005
VIII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwallti</i>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2005
IX	<i>E. bugandensis</i>	Dojjad <i>et al.</i> , 2016
X	<i>E. nimipresuralis</i>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2003
XI	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2005
XII	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2005

Le **Tableau 5** présente les dernières modifications taxonomiques au cours des dernières années et le **Tableau 6** montre les 22 espèces décrites et les numéros d'accès de leurs génomes respectifs dans la base de données GenBank.

Tableau 5 Changements majeurs dans la taxonomie au sein du genre *Enterobacter*.

Bactérie	Déplacé vers	Reconnu comme	Référence
<i>E. aerogenes</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>K. aerogenes</i>	Tindall <i>et al.</i> , 2017
<i>E. agglomerans</i>	<i>Pantoea</i>	<i>P. agglomerans</i>	Tindall <i>et al.</i> , 2014
<i>E. amnigenus</i>	<i>Lelliottia</i>	<i>L. amnigena</i>	Brady <i>et al.</i> , 2013
<i>E. arachidis</i>	<i>Konsakonia</i>	<i>K. cowanii</i>	Brady <i>et al.</i> , 2013
<i>E. gergoviae</i>	<i>Pluralibacter</i>	<i>P. gengoviae</i>	Brady <i>et al.</i> , 2013
<i>E. helveticus</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. helveticus</i>	Brady <i>et al.</i> , 2013
<i>E. intermedius</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>K. intermedia</i>	Pavan <i>et al.</i> , 2005
<i>E. massiliensis</i>	<i>Metakosakonia</i>	<i>M. massiliensis</i>	Ma <i>et al.</i> , 2020
<i>E. nimipressuralis</i>	<i>Lelliottia</i>	<i>L. nimipressuralis</i>	Brady <i>et al.</i> , 2013
<i>E. oryzae</i>	<i>Kosakonia</i>	<i>K. oryzae</i>	Brady <i>et al.</i> , 2013
<i>E. oryzendophyticus</i>	<i>Kosakonia</i>	<i>K. oryzendophyticus</i>	Li <i>et al.</i> , 2016
<i>E. oryziphilus</i>	<i>Kosakonia</i>	<i>K. oryziphila</i>	Li <i>et al.</i> , 2016
<i>E. pulveris</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. pulveris</i>	Brady <i>et al.</i> , 2013
<i>E. pyrinus</i>	<i>Pluralibacter</i>	<i>P. pyrinus</i>	Brady <i>et al.</i> , 2013
<i>E. radicincitans</i>	<i>Kosakonia</i>	<i>K. radicincitans</i>	Brady <i>et al.</i> , 2013
<i>E. sacchari</i>	<i>Kosakonia</i>	<i>K. sacchari</i>	Gu <i>et al.</i> , 2013
<i>E. zakazakii</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. zakazakii</i>	Iversen <i>et al.</i> , 2008
<i>E. turicensis</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. zurichensis</i>	Brady <i>et al.</i> , 2013
<i>E. timonensis</i>	<i>Pseudenterobacter</i>		Wu <i>et al.</i> , 2020
<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>		<i>E. dissolvens</i>	Wu <i>et al.</i> , 2020
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>		<i>E. xiangfangensis</i>	Wu <i>et al.</i> , 2020
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>		<i>E. xiangfangensis</i>	Wu <i>et al.</i> , 2020
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>		<i>E. hoffmannii</i>	Wu <i>et al.</i> , 2020
<i>E. muelleri</i>		<i>E. asburiae</i>	Wu <i>et al.</i> , 2020
<i>E. tobacco</i>		<i>E. mori</i>	Wu <i>et al.</i> , 2020
<i>E. taylorae</i>		<i>E. cancerogenus</i>	Wu <i>et al.</i> , 2020

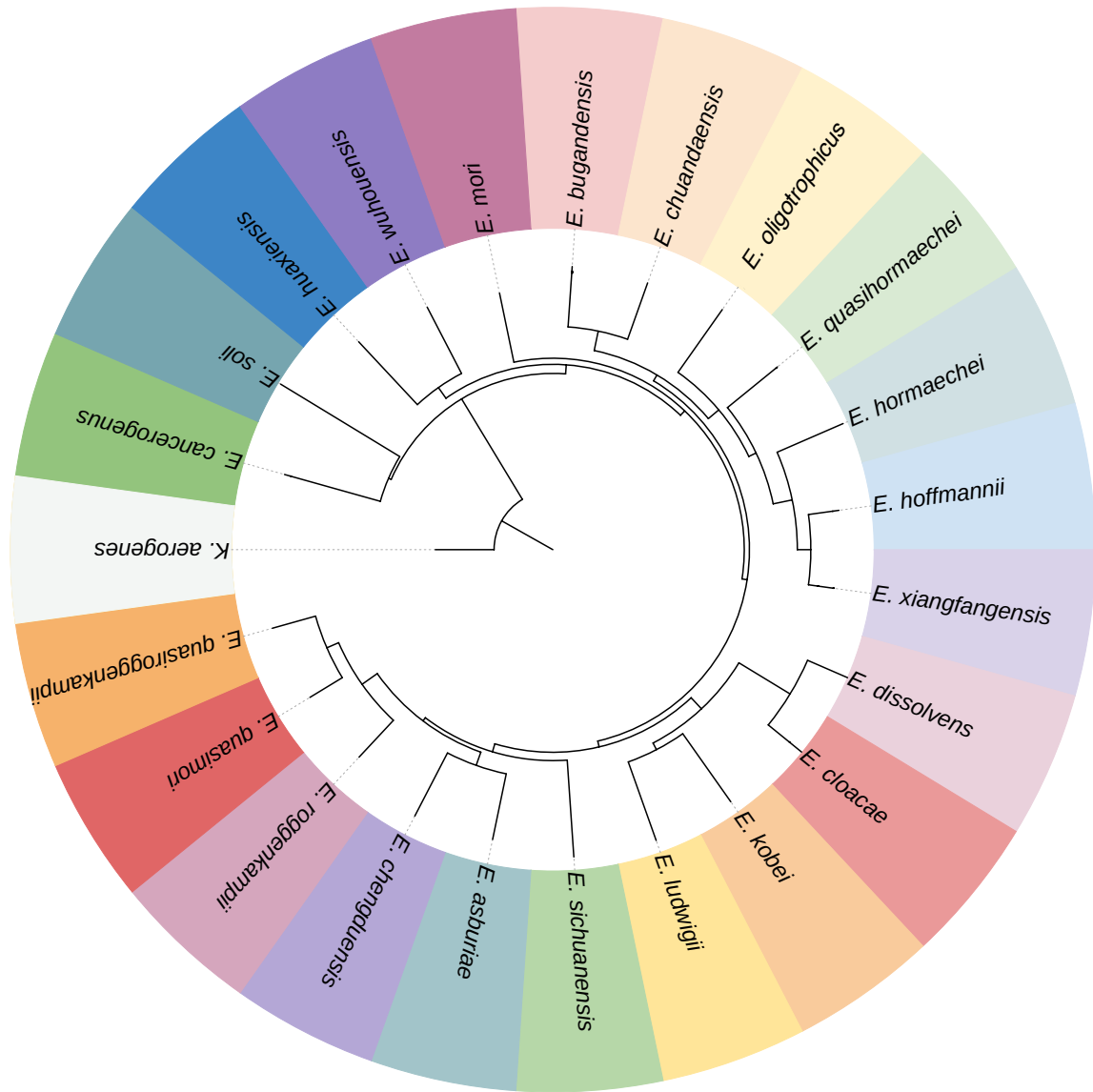


Figure 7 Arbre phylogénétique basé sur le génome de 22 espèces décrites dans le genre *Enterobacter*. La souche de référence de *Klebsiella aerogenes* a été utilisée pour enracer l'arbre.

Tableau 6 Classification et nomenclature du genre *Enterobacter* au janvier 2020.
D'après Wu *et al.*, 2020

Espèce	Souche de référence	Accession no.
<i>Enterobacter asburiae</i>	JCM 6051	CP011863
<i>Enterobacter bugandensis</i>	EB-247	LT992502.1
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	ATCC 35316	ERR1854846
<i>Enterobacter chengduensis</i>	WCHECI-C4	MTSO00000000
<i>Enterobacter chuandaensis</i>	090028	QZCS00000000
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	CP001918
<i>Enterobacter dissolvens</i>	ATCC 23373	WJWQ00000000
<i>Enterobacter hoffmannii</i>	DSM 14563	CP017186
<i>Enterobacter hormaechei</i>	ATCC 49162	MKEQ00000000
<i>Enterobacter huaxiensis</i>	090008	QZCT00000000
<i>Enterobacter kobei</i>	ATCC BAA-260	CP017181
<i>Enterobacter ludwigii</i>	EN-119	CP017279
<i>Enterobacter mori</i>	LMG 25706	GL890773
<i>Enterobacter oligotrophicus</i>	CCA6	AP019007
<i>Enterobacter quasihormaechei</i>	WCHEs120003	SJON00000000
<i>Enterobacter quasimori</i>	090044	RXR000000000
<i>Enterobacter quasiroggenkampii</i>	WCHECL1060	LFDQ00000000
<i>Enterobacter roggkampii</i>	DSM 16690	CP017184
<i>Enterobacter sichuanensis</i>	WCHECI1597	POVL00000000
<i>Enterobacter soli</i>	ATCC BAA-2102	LXES00000000
<i>Enterobacter wuhouensis</i>	WCHEs120002	SJOO00000000
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	LMG 27195	CP017183

2.3 Dernières espèces décrites

Une étude menée en 2021 sur des échantillons de produits frais obtenus sur un marché du nord de l'Allemagne, a permis d'identifier 42 isolats résistants aux antibiotiques dans lesquels ont notamment été identifiées les souches E1T (DSM 111347T) et E13T (DSM 110788T) représentant deux nouvelles espèces d'*Enterobacter* : *E. dykesii* et *E. vonholyi* (Cho *et al.*, 2021).

De toute évidence, de nouvelles espèces seront ajoutées au genre *Enterobacter* dans les années à venir. Il convient toutefois de noter que le terme « *Enterobacter cloacae* » n'est pas synonyme de toutes les espèces, tout comme le terme « complexe *Enterobacter cloacae* » n'est pas synonyme d'un isolat d'*Enterobacter*. Des travaux supplémentaires sur la différenciation des espèces sont nécessaires pour mieux comprendre leur épidémiologie ainsi que leur impact sur la thérapie antimicrobienne. Enfin, avec les outils moléculaires d'aujourd'hui, il est opportun de cesser d'utiliser ces termes et de cesser d'utiliser le terme « Cluster génétique » pour désigner les différentes espèces du genre afin de créer une terminologie correcte et moins ambiguë que celle qui a été utilisée jusqu'à présent. Pour cette raison, tous les résultats de ce travail utilisent le nom de chaque espèce selon le dernier classement.

3. Épidémiologie

Les espèces d'*Enterobacter* occupent une position importante en tant qu'agent pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales depuis longtemps (Gaston, 1988 ; Beyrouthy *et al.*, 2018). L'un des facteurs de risque d'infections induites par *Enterobacter* spp. est le séjour prolongé dans l'environnement de soins, en particulier dans la RNN. En outre, certaines espèces sont impliquées dans des infections telles que des abcès cérébraux (Fernandez *et al.*, 2012), pneumonies (Holsen *et al.*, 2019), méningites (Chauhan *et al.*, 2016), bactériémies (Álvarez-Martín *et al.*, 2021),

infections urinaires (Martins *et al.*, 2020), ainsi que des infections digestives (Davin-Regli *et al.*, 2019).

Il existe des infections communautaires causées par *Enterobacter* mais la plupart sont liées aux soins (Vilches *et al.*, 2019). La prévalence des infections en réanimation varie entre 5 et 10%, et en France elle est de 6,64% selon l'enquête nationale sur la prévalence des infections nosocomiales (Vincent *et al.*, 2009 ; Santé publique France, 2019). Le taux d'infections causées par les espèces d'*Enterobacter* dans l'unité de soins intensifs n'a pas changé de manière significative au cours de la dernière décennie (Vincent *et al.*, 2009 ; Vincent *et al.*, 2020). Selon une étude amène en 2018, *E. xiangfangensis* et *E. hoffmannii* (tous les deux) sont les espèces prédominantes et représentent environ 90% des souches isolées de différents types d'échantillons cliniques (Robin *et al.*, 2018).

L'étude de surveillance épidémiologique de l'ECDC met en évidence que *Enterobacter* est la troisième bactérie la plus fréquemment isolée chez les nourrissons de moins d'un mois en Europe avec une prévalence de 13,3 %, derrière les SCoN (31,4 %) et *S. aureus* (14,3 %) (<https://www.ecdc.europa.eu/en>).

Enterobacter a été décrite comme responsable des épidémies dans les hôpitaux dues à la contamination de la nutrition parentérale, l'albumine humaine, des agents mouillants et du matériel de thérapie respiratoire, et de l'eau d'hydrothérapie dans l'unité des grands brûlés (Tresoldi *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 1991 ; Mayhall *et al.*, 1979). Cependant, les isolats d'*Enterobacter* provenant de ces prélèvements cliniques ont été mal identifiés : parfois comme *E. asburiae*, *E. cloacae* et/ou *E. hormaechei* en utilisant des systèmes d'identification semi-automatiques tels que Vitek2 (bioMérieux) ou MALDI-TOF MS (De Florio *et al.*, 2018).

En revanche, *E. cancerogenus* a été isolé principalement de plaies d'adultes. Les infections causées par cette espèce semblent être acquises par la communauté et se produisent après de multiples traumatismes crâniens ou de graves blessures par écrasement, ce qui indique que *E. cancerogenus* peut provoquer une infection des plaies et une bactériémie chez les personnes exposées à cet organisme dans l'environnement lors d'événements traumatiques (Abbott *et al.* 1997). En outre, des cas de pneumonie dus à *E. cancerogenus* et *E. asburiae* ont été signalés (Demir *et al.*, 2014). *E. kobei* a été principalement associé à un urosepsis et *E. ludwigii* a été isolé d'une bactériémie associée à un cathéter veineux central (Hoffmann *et al.*, 2005, Wagner *et al.*, 2020).

Dans la RNN, les nouveau-nés prématurés de faible poids de naissance et les dispositifs médicaux sont associés à un risque accru d'infection à *Enterobacter* (**Figure 8**) (Chen *et al.*, 2014). Les espèces d'*Enterobacter* peuvent coloniser les dispositifs médicaux tels que les cathéters et les prothèses (Hsu, 2004). En 2000, van den Berg *et al.* ont rapporté que des thermomètres seraient responsables de la bactériémie causée par *E. cloacae* chez plusieurs patients (van den Berg *et al.*, 2000). En 2016, Mardaneh *et al.*, ont rapporté le développement d'une épidémie due à *E. asburiae* présent dans le lait en poudre pour nourrissons (Mardaneh *et al.*, 2016, Oteo *et al.*, 2013).

Plus récemment, une épidémie a été décrite dans une RNN en Tanzanie, causée par des isolats d'hémoculture de type *Enterobacter* qui n'ont pas pu être identifiés par des techniques phénotypiques classiques. Après une analyse complète de 8 souches représentatives par Multilocus Sequence Analysis (MLSA) et le gène de l'ARNr 16S, elles ont été étroitement regroupées avec les isolats d'*E. xiangfangensis* et *E. hormaechei*. Cependant, ils ont montré moins de 70% de similarité entre eux. Par conséquent, le nom *E. bugandensis* a été proposé (Doijad *et al.*, 2016). En 2018, le même groupe a montré que *E. bugandensis* était associé au sepsis néonatal. La souche EB-247 est très virulente dans des modèles tels que *Galleria mellonella* et des modèles murins. Ces

études ont montré que *E. bugandensis* est aussi efficace que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pour induire une infection systémique et libérer des cytokines pro-inflammatoires. Il conclut que *E. bugandensis* est une espèce hautement pathogène du genre *Enterobacter* avec un potentiel élevé de colonisation, de virulence et d'association à une bactériémie (Pati *et al.*, 2018).

En 2020, Ferry *et al.*, ont rapporté une étude rétrospective en France dont 30 nouveaux ont développé une infection à *E. cloacae* causant la mort de 12 enfants après 3 jours de début de bactériémie (Ferry *et al.*, 2020). L'étude conclut que le sepsis néonatal avec implication d'*Enterobacter* peut être associé à une mortalité élevée et les cas cumulatifs d'infection au sein d'un même service ne sont pas nécessairement associés au développement d'un seul clone et peuvent indiquer d'autres problèmes environnementaux et d'organisation.

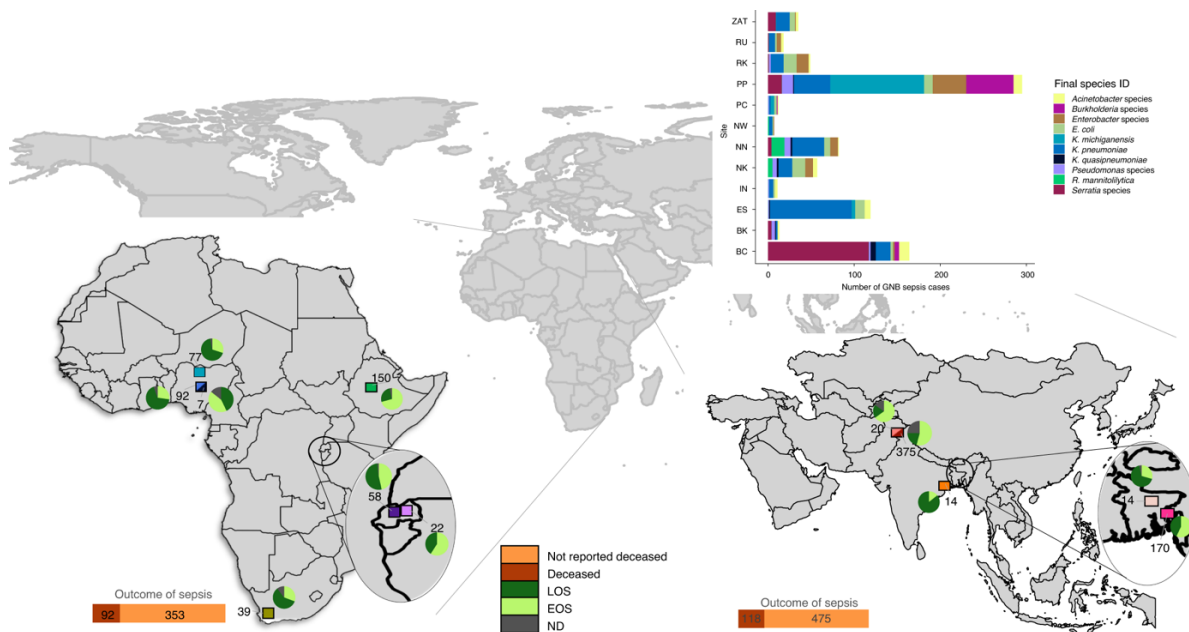


Figure 8 Carte montrant la prévalence de différents agents pathogènes dans la RNN dans une étude menée en Afrique et en Asie du Sud. *Enterobacter* spp. est le quatrième microorganisme isolé. Tiré de Gasparrini *et al.*, 2019.

4. Pathogénicité

Enterobacter est responsable d'infections humaines, principalement chez les patients immunodéprimés (Pendleton *et al.*, 2013). Néanmoins, les mécanismes moléculaires qui lui permettent de passer de l'état commensal à l'état pathogène opportuniste ne sont pas bien claires (Guerin, 2015).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer le succès clinique et épidémique d'*Enterobacter* à l'hôpital. Comme toutes les bactéries à Gram-négatif, les espèces d'*Enterobacter* possèdent l'endotoxine lipopolysaccharide (LPS), qui a sa propre pathogénicité (Whitfield & Trent, 2014). Les effets et les mécanismes possibles des polysaccharides produits par *E. cloacae* (EPS) induisant l'apoptose des cellules HeLa et SiHa, et l'apoptose induite par EPS, sont associés à la régulation à la hausse des protéines proapoptotiques telles que Bak-1 et Bcl-2 (Zhao *et al.*, 2015). Par ailleurs, EPS induit la mort apoptotique dans les cellules d'ostéosarcome humain en activant p53 et la voie intrinsèque mitochondriale par l'effondrement de la membrane mitochondriale (Chen *et al.*, 2019). Une nouvelle toxine d'*E. cloacae* capable de lyser les érythrocytes et les leucocytes a également été identifiée. Cette toxine stimule le métabolisme oxydatif des neutrophiles comme la toxine HlyA d'*E. coli*. Il a également été démontré que la séquence d'ADN codant cette toxine *cloacae*, riche en glycine, était similaire à celle d'*E. coli* (Barnes *et al.*, 2001). En outre, il a été démontré qu'*Enterobacter* et *Serratia* sont les entérobactéries qui produisent le plus d'endotoxines et qui ont un taux de mortalité élevé pendant une épidémie (Zorrilla-Vaca *et al.*, 2014).

La présence d'un système de sécrétion de type I, II y VI ont été décrite chez *Enterobacter* (Zhang *et al.*, 2021). Le système de sécrétion de type III est un système qui permet l'adaptation à un cycle de vie intracellulaire de la bactérie, ce qui permet l'injection de protéines effectrices à la cellule hôte pour réguler des fonctions cellulaires importantes telles que le trafic vésiculaire, la réorganisation du cytosquelette et la réponse

immunitaire innée, cependant, ce système n'a pas été signalé chez *Enterobacter* (De Souza Santos & Orth, 2019).

De même, la présence du système de sécrétion de type VI (T6SS) a été décrite chez *Enterobacter* (**Figure 9**) (Soria-Bustos *et al.*, 2020) où la régulation et l'expression du T6SS est régulée et augmentée en cas de stress (Mustafa *et al.*, 2020). Le T6SS est une machine qui utilise un mécanisme de type ressort pour injecter des protéines effectrices dans la cellule cible procaryote et/ou eucaryote (Cherrak *et al.*, 2019). Le système T6SS est important pour la compétence bactérienne et la virulence chez les bactéries à Gram-négatif (Navarro-Garcia *et al.*, 2019).

Récemment, une étude des isolats de *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* et *E. asburiae* a montré que les gènes associés à la survie (tels que les gènes de protéines nécessitant des métaux, ceux associés à la défense ou à la fonction physiologique bactériennes) dans un milieu imitant l'hôte (milieu d'expectoration artificielle) sont hautement conservés dans leur génome. Cependant, les gènes impliqués dans la virulence (T3SS et T6SS) sont régulés à la hausse sous stress (Mustafa *et al.*, 2020).

Les souches d'*Enterobacter* spp. sont capables de s'adapter aux environnements hospitaliers, principalement par la formation de biofilms sur les surfaces (Liaqat *et al.*, 2019). Des gènes impliqués dans l'invasion et l'adhésion des cellules hôtes ont été identifiés chez *Enterobacter*. Kim *et al.*, ont mis en évidence la présence de l'opéron *csgBA* chez *E. cloacae*, qui est impliqué dans la formation de biofilms (Kim *et al.*, 2012). L'expression des gènes appelée *curli* chez les *Enterobacterales* permet la colonisation des surfaces inertes et la formation de biofilm, ainsi que permet la fixation à protéines de l'hôte (Oh & Hinterdorfer, 2019).

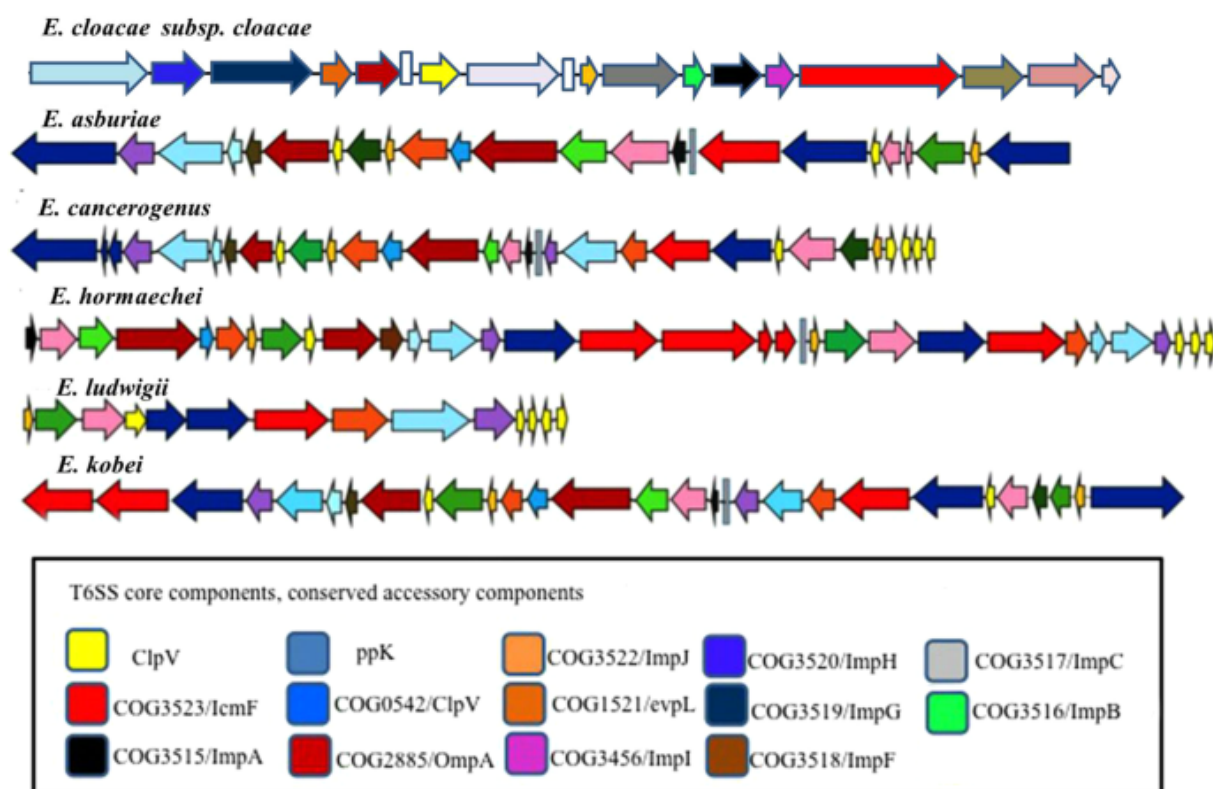


Figure 9 Organisation génétique de gènes T6SS dans les souches *Enterobacter*. Les flèches indiquent les gènes tandis que la direction de la transcription est représentée en fonction de la direction du gène. Les composants génétiques des T6SS conservés sont indiqués en rouge tandis que le reste des différentes couleurs représente les gènes non conservés. Tiré de Mustafa *et al.*, 2020

En outre, le fer étant essentiel à la survie des bactéries au sein de l'hôte, ces microorganismes ont développé des systèmes d'absorption du fer très efficaces ; le plus courant implique la sécrétion de chélateurs du fer appelés sidérophores (Ferreira *et al.*, 2016). Les gènes de virulence suivants ont été identifiés chez *Enterobacter* : protéine régulatrice du fer 2 (*irp2*), récepteur d'absorption du ferrichrome (*fhuA*), superoxyde dismutase B (*sodB*) (**Figure 10**) (Zhang *et al.*, 2016 ; Matteoli *et al.*, 2020). La capacité des microorganismes à absorber et à assimiler le fer par le biais de protéines chélatrices est un avantage évolutif qui favorise l'établissement dans des niches telles que l'homme et génère un processus infectieux (Remya *et al.*, 2019). Chez

E. bugandensis trois opérons produisant des sidérophores ont été identifiés et décrits : entérobactine (*ent*), aérobactine (*iuc/iut*) et salmocheline (*iro*) (Matteoli *et al.*, 2020).

En 2009, Pauw *et al.*, ont démontré la présence d'un plasmide portant des gènes de virulence chez *E. hormaechei* isolé dans une épidémie aux Pays-Bas. Le plasmide identifié (pQC) porte des gènes de résistance aux métaux lourds *ter* et *mer* et des protéines impliquées dans l'export similaire à celle du pili type 1 de *S. enterica* (Paaw *et al.*, 2009).

Enfin, une étude utilisant *Caenorhabditis elegans* comme modèle, a montré que l'infection par *E. cloacae* induit une mort cellulaire due à des lésions de l'ADN ainsi qu'une altération des systèmes reproducteur et ovarien de *C. elegans* (Khan *et al.*, 2020).

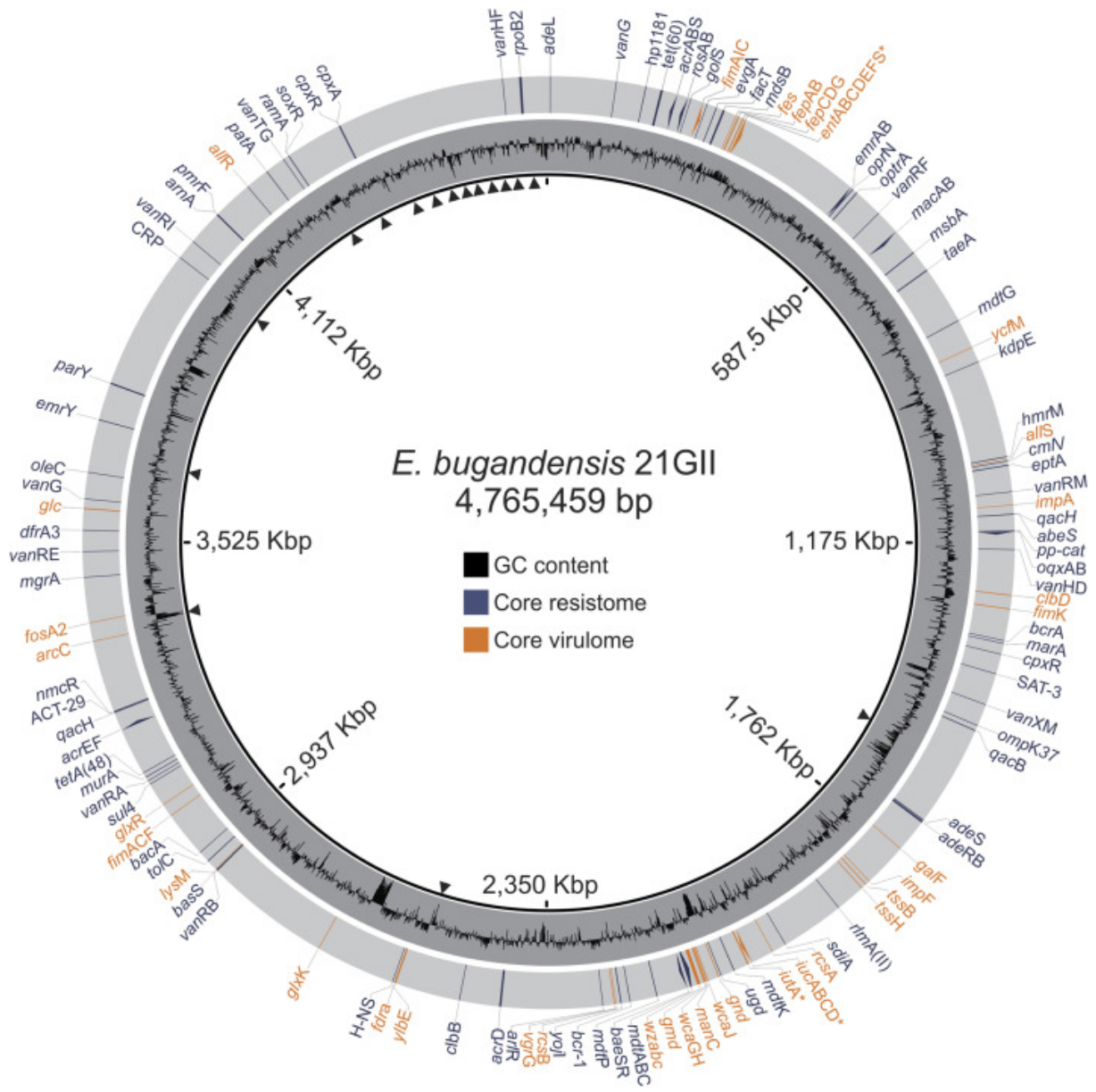


Figure 10 Cartographie des principaux gènes du virulome et du résistome dans le génome d'*E. bugandensis* 21 GII. Tiré de Matteoli *et al.*, 2020

5. Résistance aux antibiotiques

En 2019, un comité d'experts des Nations Unies a conclu que d'ici 2050, les infections causées par des micro-organismes résistants aux antibiotiques pourraient provoquer environ 10 millions de décès par an ainsi qu'un effondrement économique des systèmes de santé (ONU, 2019). Il est donc nécessaire de développer de nouvelles technologies afin d'enrayer la menace croissante du sepsis et de la résistance aux antimicrobiens.

Dans ce contexte, les agents pathogènes ESKAPE constituent un groupe de bactéries infectieuses qui se caractérisent par leur capacité à échapper aux thérapies antimicrobiennes courantes par le biais de la résistance aux antimicrobiens. Le groupe ESKAPE a été défini pour la première fois en 2008 et comprend *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, et *Enterobacter* spp. (Marturano *et al.*, 2019). Malgré le développement de nouvelles options thérapeutiques (Mulani *et al.*, 2019) telles que la phagothérapie, les peptides antimicrobiens et les nanoparticules, les pathogènes ESKAPE restent un problème de santé publique et des études récentes suggèrent une augmentation de la prévalence de ces pathogènes (De Angelis *et al.*, 2018 ; Ramsamy *et al.*, 2018).

5.1 Mécanismes moléculaires de la résistance

Les antibiotiques ont sauvé de nombreuses vies au fil des ans et restent l'épine dorsale de la thérapie antimicrobienne pour la plupart des infections bactériennes (De Oliveira *et al.*, 2020). Les bactéries à Gram-négatif, y compris les agents pathogènes du groupe ESKAPE, ont développé divers mécanismes moléculaires de résistance aux composés antimicrobiens (**Figure 11**), notamment aux carbapénèmes qui sont considérés comme les antibiotiques de dernier choix (Mulani *et al.*, 2019).

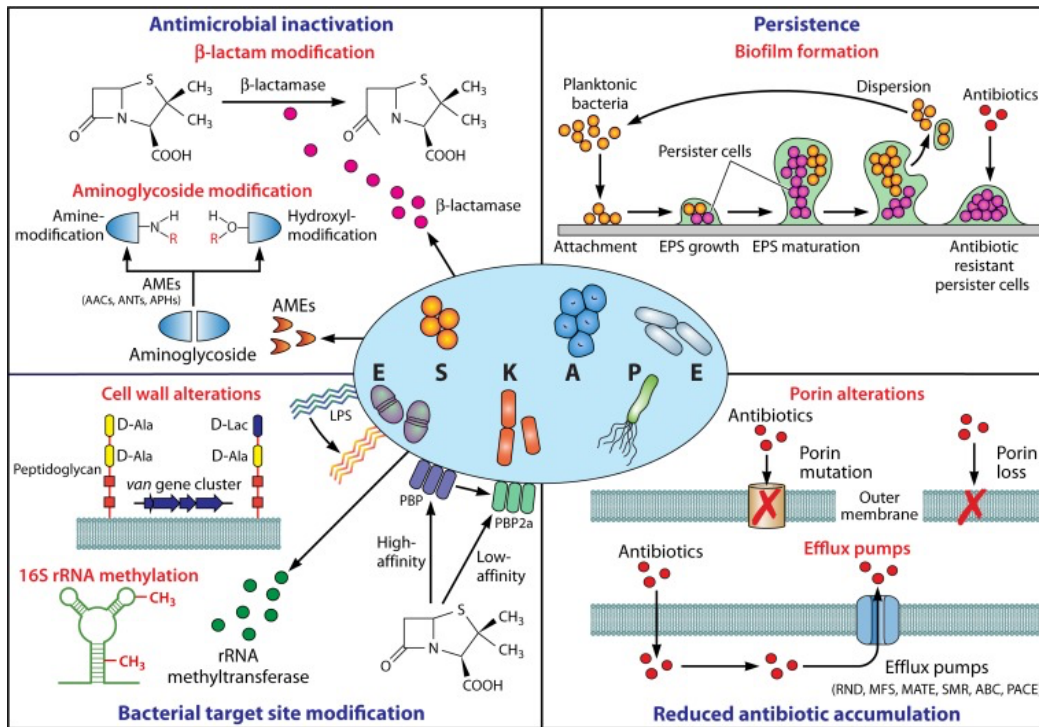


Figure 11 Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les pathogènes ESKAPE. Tiré de De Oliveira *et al.*, 2020

Le phénomène de la résistance aux β -lactamines est multifactoriel et a été associé à différents mécanismes, notamment la production d'enzymes β -lactamases, des altérations au niveau de la structure des protéines de liaison à la pénicilline (Penicillin binding protein, PBP), des modifications de la perméabilité membranaire dues à des changements physicochimiques ou à une diminution de l'expression des porines de la membrane externe et une augmentation des pompes d'efflux de médicaments (Santajit *et al.*, 2016).

5.2 Résistance aux antibiotiques chez *Enterobacter*

Le principal problème en pratique clinique est la propagation de souches d'*Enterobacter* multirésistantes aux antibiotiques (Girlich *et al.*, 2015 ; Pendentlon *et al.*, 2013). La dissémination mondiale de souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G) soit par hyperproduction de céphalosporinase

chromosomique (AmpC) (Meini *et al.*, 2019) et/ou par acquisition de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) (Fouquet *et al.*, 2012 ; Amin *et al.*, 2013 ; Szél *et al.*, 2017), ainsi que la propagation des souches porteuses de carbapénémase (Messaoudi *et al.*, 2019 ; Peirano *et al.*, 2018 ; Robert *et al.*, 2014) a augmenté l'occurrence de ces souches dans la RNN (**Figure 12**). Les céphalosporines de quatrième génération comme le céfépime en association avec d'autres antibiotiques, principalement des aminoglycosides (Mimoz *et al.*, 1998 ; Barnes *et al.*, 2003) et des fluoroquinolones (Harris & Ferguson, 2012) sont actuellement le traitement de choix dans les infections sévères à *Enterobacter* avec un faible risque de sélection de souches AmpC hyper productrices (Meurant *et al.*, 2021 ; Tamma *et al.*, 2013).

Les sections suivantes décrivent les mécanismes de résistance aux antibiotiques les plus fréquents dans le genre *Enterobacter*.

5.3 Phénotype naturel de la résistance aux antibiotiques chez *Enterobacter*

« Toutes » les espèces sont naturellement résistantes à l'amoxicilline, à l'amoxicilline/acide clavulanique, aux céphalosporines de première génération, à la céfoxitine, sensibilité réduite à la céfuroxime et sensibles aux carbapénèmes, à l'aztréonam, aux acylaminopénicillines et la ticarcilline. Cependant, l'identification précise des espèces, et l'évaluation de la résistance naturelle dans chaque espèce sont nécessaires pour comprendre leur impact clinique. Par ailleurs, selon la Société Française de Microbiologie et l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), le complexe *Enterobacter cloacae* est naturellement résistante aux aminopénicillines, aminopénicillines-inhibiteur de β -lactamines, céphalosporine de première génération, cefoxitine et à la colistine (EUCAST, 2021). Il a d'ailleurs été récemment démontré que le système de régulation à 2 composants PhOP/PhoQ peut être impliqué dans la régulation de la résistance naturelle à la colistine (Guérin *et al.*, 2016). En particulier, en 2020 a été conclu que MgrB, le régulateur négatif du système

PhOP/PhoQ, est directement impliqué dans la résistance à la colistine chez *E. hormaechei* (Mhaya *et al.*, 2020).

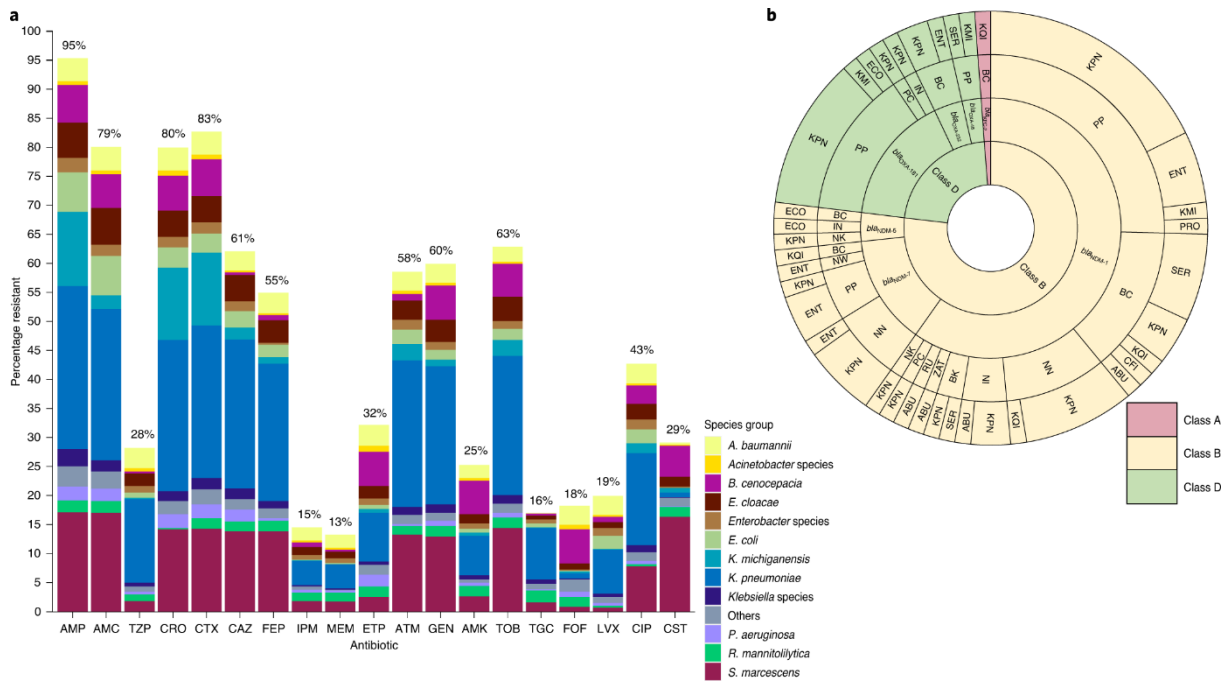


Figure 12 Pourcentages d'agents étiologiques résistants aux antimicrobiens de la bactériémie néonatale. *Enterobacter* est montré en marron. **a)** Profil de résistance aux antibiotiques : AMC, amoxicilline/clavulanate ; AMK, amikacine ; AMP, ampicilline ; ATM, aztréonam ; CAZ, ceftazidime ; CIP, ciprofloxacine ; CRO, ceftriaxone ; CST, colistine ; CTX, céfotaxime ; ETP, ertapénème ; FEP, céfépime ; FOF, fosfomycine ; GEN, gentamicine ; IPM, imipénème ; LVX, lévofloxacine ; MEM, méropénème ; TGC, tigécycline ; TOB, tobramycine ; TZP, pipéracilline/tazobactam. **b)** diagramme en étoile détaillant les gènes de résistance aux carbapénémases de classe A (rouge), B (jaune) et D (vert) détectés dans les différentes bactéries. Tiré de Gasparrini *et al.*, 2019.

5.4 Résistance naturelle aux antibiotiques due à la céphalosporine AmpC

Le genre *Enterobacter* appartient au groupe des *Enterobacterales* productrices de la céphalosporinase AmpC connu sous l'acronyme ESCPM (*Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii* et *Morganella morganii*), dont il est le prototype (Ur Rahman *et al.*, 2018), qui possèdent une résistance naturelle aux antibiotiques β -lactamines tels que l'ampicilline, l'amoxicilline et les céphalosporines de première génération due à la présence de β -lactamases AmpC inductibles codées par le chromosome (Mizrahi *et al.*, 2020). AmpC peut être synthétisée à de faibles niveaux de manière constitutive ou inductive (Mulani *et al.*, 2019), surexprimée en réponse à l'exposition aux β -lactames (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, céfépime, céfuroxime, pipéracilline et aztréonam) (Hanson & Sanders, 1999) ou en raison d'un dérèglement constitutif du système de régulation de l'AmpC (Schmidtke & Hadson, 2006). L'induction de cette β -lactamase est associée à la résistance aux céphalosporines de première génération et à d'autres β -lactames. Au total, 508 variants d'AmpC ont été identifiés chez *Enterobacter*. Actuellement, 86 ACT (ACT-1 à -89 mais pas d'ACT-11, -26 ou -71), 6 CMH (CMH-1 à -6), et 22 variantes MIR (MIR-1 à -23, mais MIR-8 est égal à MIR-5) ont été attribuées dans le catalogue de gènes de référence pour la détection des agents pathogènes (<https://github.com/ncki/amr/wiki/> Base de données AMRFinderPlus) (Feldgarden *et al.*, 2021)

5.4.1 Régulation d'AmpC

Les mécanismes régulant l'expression des AmpCs sont très complexes (**Figure 13**). En général, l'enzyme AmpC est associée au recyclage de la dégradation de la paroi bactérienne, participant à un processus avec les protéines AmpD et AmpR, cette dernière étant son régulateur négatif. Au départ, les produits de dégradation de la paroi (1,6-anhydroN-acétylmuramic) sont hydrolysés par la protéine AmpG et les produits de dégradation (UDPN-acétylmuramic) sont liés à la protéine AmpD, qui est

un régulateur négatif de AmpR. Lorsque les produits de dégradation de l'AmpG sont à des niveaux élevés, ils activent la protéine AmpR, qui stimule ou induit la synthèse de l'enzyme AmpC, qui va dégrader le composé causant le dommage au niveau de la membrane cellulaire (Meini *et al.*, 2019).

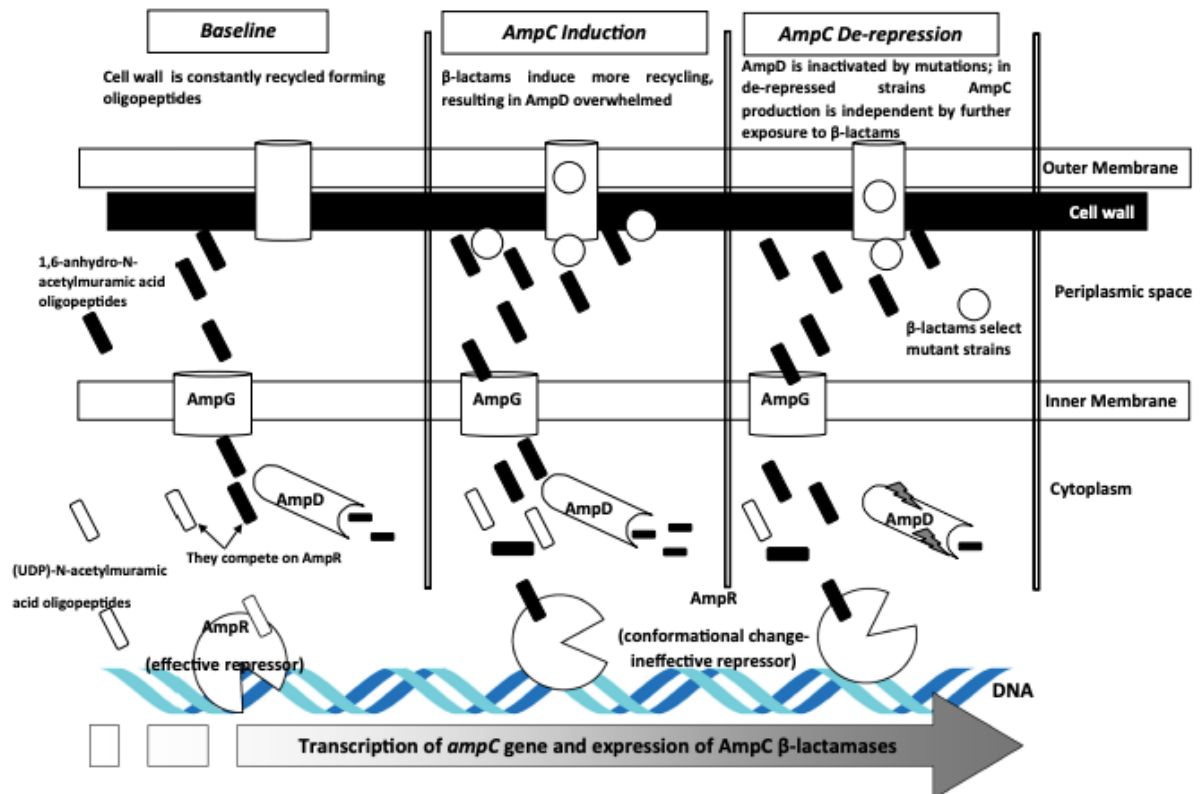


Figure 13 Régulation d'AmpC. Tiré de Meini *et al.*, 2019

5.4.2 β -lactamase type AmpC

La principale caractéristique des AmpC chromosomiques (cAmpCs) est le niveau d'expression, qui peut être constitutive ou inducible, du gène *ampC*. Si inducible, plusieurs β -lactames peuvent être des inducteurs, ce qui rend le mécanisme de résistance cliniquement pertinent. Cependant, les souches qui produisent des cAmpCs

inductibles peuvent facilement générer des mutants où l'expression d'AmpC est déréprimée de manière stable, ce qui conduit à une expression constitutive (mutants déréprimés) (Tamma *et al.*, 2013).

Sur la base de la propriété d'induction des différents antimicrobiens AmpC, ainsi que de la propension à être hydrolysable par l'enzyme induite, on peut distinguer les situations suivantes (Tamma *et al.*, 2013) :

1. Composés inducteurs/labile β -lactamines : amino-pénicillines, céphalosporines de première génération, céfoxitine, céfotétan. Ces antimicrobiens induisent l'expression d'AmpC et sont inactivés par l'enzyme. Les souches qui produisent l'enzyme AmpC de manière induite ou constitutive sont des souches résistantes à ces médicaments. En outre, l'acide clavulanique induit fortement la production d'AmpC, mais il n'a pas d'activité inhibitrice sur cette enzyme.
2. Composés de type β -lactame inductibles/stables : les carbapénèmes entrent dans cette catégorie car ils sont de puissants inducteurs de l'expression de l'AmpC, mais ils sont stables. Les souches qui produisent de l'AmpC de manière inductible ou constitutive restent sensibles aux carbapénèmes, à moins qu'il n'y ait une modification de la perméabilité membranaire causée par des modifications des porines de la membrane externe, ce qui diminue la concentration intracellulaire de carbapénème.
3. Composés β -lactames faiblement inducteurs/labiles : uréidopénicillines, par exemple pipéracilline, céphalosporines de troisième génération et aztréonam. Dans ce cas, les souches possédant une AmpC inductible sont généralement sensibles à ces composés, tandis que celles qui produisent une AmpC de manière constitutive sont résistantes. Pour cette raison, l'utilisation de ces antibiotiques doit être envisagée avec prudence dans les isolats d'*Enterobacter*

spp., malgré leur sensibilité apparente sur l'antibiogramme. L'utilisation de la pipéracilline-tazobactam entraîne souvent une sensibilité dans l'antibiogramme car la pipéracilline et le tazobactam ne sont que de faibles inducteurs, et les hydrolysats AmpC de la pipéracilline et du tazobactam n'inhibent généralement pas la pipéracilline. Par conséquent, l'utilisation de cet antibiotique pour les infections sévères avec des bactéries du groupe ESCPM produisant des cAmpCs doit être considérée avec prudence, indépendamment de la sensibilité observée dans l'antibiogramme.

4. Composés de type β -lactamines stables/faibles inducteurs : cefepime (céphalosporine de quatrième génération). Cet antibiotique conserve son activité contre les souches productrices d'AmpC. Toutefois, il a été observé que certaines souches présentent une activité accrue contre les céphalosporines de quatrième génération (Tamma *et al.*, 2013).

Enfin, des mutations de la cible bactérienne des β -lactamines se produisent rarement chez *Enterobacter*. Cependant, certaines mutations ont été observées dans le système de régulation de l'AmpC, principalement dans le gène *ampR* dans les souches AmpC dérégulées (Kuga *et al.*, 2000 ; Guérin *et al.*, 2015) associées à la résistance aux β -lactamines. En outre, plusieurs mutations ont été identifiées dans la séquence ponctuelle AmpC, qui ne se trouvent pas dans le site actif et ne sont donc pas en corrélation avec le phénotype de résistance. Cependant, des délétions d'acides aminés ont été trouvées dans la boucle Ω AmpC d'*Enterobacter*, impliquée dans la compétitivité enzymatique pour le substrat, qui pourraient jouer un rôle dans le phénotype de résistance aux β -lactamines (Livermore *et al.*, 2012).

5.5 Résistance acquise aux β -lactamines

Depuis la découverte de la pénicilline en 1929, les antibiotiques β -lactamines ont représenté jusqu'à 65% de toutes les prescriptions (Marín *et al.*, 2003). Cependant, l'émergence et la diversification des β -lactamases capables d'hydrolyser les antibiotiques β -lactames ont posé un sérieux problème de santé associé à la résistance aux antibiotiques (Sandanayaka *et al.*, 2002). Parmi tous ces mécanismes, la résistance médiée par les β -lactamases est le mécanisme le plus courant et le plus important (Drawz *et al.*, 2010) et peut être médiée par des β -lactamases plasmidiques ou chromosomiques : en général, l'expression des β -lactamases chromosomiques est inductible par nature et les β -lactamases chromosomiques sont exprimées de manière constitutive (Ur Rahman *et al.*, 2018). En outre, tous les mécanismes de résistance aux antibiotiques acquis qui ont été décrits dans le genre *Enterobacter* jusqu'en décembre 2021 sont montrés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 Mécanismes de résistance aux antibiotiques décrits chez *Enterobacter* spp., mise à jour de Davin-Regli *et al.*, 2019 (Première partie)

Groupe d'antibiotiques	Mécanisme de résistance	Type	Espèce	Référence
β-lactames	β-lactamases :			
Class A	2b : sérine (pénicillinases)	TEM-1, TEM-2, SHV-1	<i>E. cloacae</i>	Peymani <i>et al.</i> , 2014 ; Biendo <i>et al.</i> , 2008
	2be : sérine (BLSE)	SHV-2, TEM-10, GES-1, CTX-M	<i>E. hormaechei</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. kobei</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 2019 ; Andrade <i>et al.</i> , 2018, Zhou <i>et al.</i> , 2017
	2f : sérine (carbapénémases)	KPC, SME, NMC-A, GES-2	<i>E. cloacae</i> , <i>E. roggenkampii</i>	Andrade <i>et al.</i> , 2018 ; Umeda <i>et al.</i> , 2021
B	3 : métallo (carbapénémases)	IMP, VIP, NDM	<i>E. hormaechei</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>asburiae</i>	Carvalho-Assef <i>et al.</i> , 2014 ; Izdebski <i>et al.</i> , 2018 ; Markovzka <i>et al.</i> , 2019
C	1 : sérine (céphalosporinases)	AmpC, CMY, ACT-1, DHA	<i>E. cloacae</i> ,	Al-Agamy <i>et al.</i> , 2019 ; Dimitrova <i>et al.</i> , 2019
D	2d : sérine (oxacillinases)	OXA-1/30, OXA-10, OXA-23, OXA-48	<i>E. cloacae</i> , <i>E. ludwigii</i> , <i>E. hormaechei</i>	Bendjama <i>et al.</i> , 2020 ; Khajuria <i>et al.</i> , 2013 ; Sampaio <i>et al.</i> , 2014

Tableau 7 Mécanismes de résistance aux antibiotiques décrits chez *Enterobacter* spp., mise à jour de Davin-Regli *et al.*, 2019. (Deuxième partie)

Groupe d'antibiotiques	Mécanisme de résistance	Type	Espèce	Référence
Fluoroquinolones	Mutation de la cible	<i>gyA, gyrB, parC, parE.</i>	<i>E. cloacae</i>	Deguchi <i>et al.</i> , 1997
	Enzymatique	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>E. cloacae</i>	de Carvalho <i>et al.</i> , 2018;
	Mécanisme de protection	<i>qnr</i> (A, B, S, C, D)	<i>E. asburiae, E. mori.</i> <i>E. cloacae</i>	Yuan <i>et al.</i> , 2019 ; Wang <i>et al.</i> , 2021 ; Benameur <i>et al.</i> , 2018
	Efflux	<i>qepA, acrAB-tolC,</i> <i>oqxAB, sugE, emmdR</i>	<i>E. cloacae</i>	Markovska <i>et al.</i> , 2019 ; Telke <i>et al.</i> , 2017
Aminoglycosides	Enzymatique (acétyle, phospho, nucléotidyltransférase)	<i>aac, aph, ant</i>	<i>E. cloacae</i>	Huang <i>et al.</i> , 2012
	Méthylase	<i>armA, rmtB</i>	<i>E. cloacae</i>	Amin <i>et al.</i> , 2019 ; Chen <i>et al.</i> , 2017
Cyclines	Efflux	<i>acrAB-tolC</i>	<i>E. cloacae</i>	Perez <i>et al.</i> , 2012 ; Keeney <i>et al.</i> , 2007 ; Hornsey <i>et al.</i> , 2010

5.5.1 Acquisition de gènes codant pour des β -lactamases

L'acquisition de BLSE permet aux bactéries d'hydrolyser les pénicillines, les C3G, les céphalosporines de quatrième génération (C4G) et les monobactames. Les premières descriptions de résistance aux antibiotiques dans le genre *Enterobacter* concernaient *K. aerogenes*, longtemps connu sous le nom de *E. aerogenes* (de Champs *et al.*, 1991 ; Russell, 1969). Toutefois, en utilisant la classification la plus récente, il s'est avéré qu'il s'agissait d'une souche d'*E. cloacae* porteuse d'une TEM-3 β -lactamase, identifiée ultérieurement comme CTX-M-1. L'étude a été réalisée à partir d'une collection d'entérobactéries provenant de quatre hôpitaux parisiens en France. Cette étude a permis d'identifier la présence d'une souche d'*E. cloacae* portant un plasmide Inc7 auto-transférable d'une taille d'environ 85 Kb. Il codait la TEM-3 β -lactamase (CTX-1) et le *tet*(C) (Petit *et al.*, 1990). D'autres β -lactamases telles que SHV, TEM et CTX ont été associées à différents foyers de souches multirésistantes d'*E. cloacae*, principalement codées sur des plasmides mobiles et conjugatifs qui ont facilité leur dissémination dans diverses régions géographiques (Bourouis *et al.*, 2011 ; Aibinu *et al.*, 2012 ; Oteo *et al.*, 2013 ; Souna *et al.*, 2014). Ces enzymes ont contribué à la propagation mondiale rapide de la résistance aux antibiotiques β -lactamines, principalement en milieu hospitalier.

Enterobacter est désormais considéré comme la troisième entérobactérie la plus fréquemment résistante aux céphalosporines de troisième génération après *E. coli* et *K. pneumoniae* (Jarlier *et al.*, 2012). Les carbapénèmes tels que l'imipénème restent à ce jour les antibiotiques les plus efficaces dans le traitement des infections à *Enterobacter* (Moy *et al.*, 2017). Cependant, les dernières décennies ont vu l'émergence de souches résistantes aux carbapénèmes en raison de la présence d'enzymes carbapénémases comme NDM, VIM, KPC ou des β -lactamases de classe D comme OXA-48, qui ont été identifiées chez *Enterobacter* en Europe, en Asie et en Amérique (Thomson *et al.*, 2016 ; Du *et al.*, 2016 ; Shen *et al.*, 2017 ; Zhuang *et al.*, 2019 ; Potron *et al.*, 2013). Ces dernières années, une augmentation des souches résistantes aux

carbapénèmes a été observée. Des épidémies causées par des *Enterobacter* spp., porteurs de carbapénémase ont été occasionnellement décrites (Mashaly *et al.*, 2021). En outre, l'émergence de souches portant la carbapénémase OXA-204 chez *E. cloacae* codée dans un plasmide IncA/C a été décrite (Messaoudi *et al.*, 2019). Différentes études ont mis en évidence la prévalence de diverses carbapénémases chez *Enterobacter* mais leur épidémiologie décrit principalement des enzymes comme VIM, suivie de NDM, KPC, OXA-48 et IMP principalement chez *E. xiangfangensis* et *E. hormaechei* (Messaoudi *et al.*, 2019 ; Peirano *et al.*, 2018).

5.5.2 Résistance acquise aux aminosides

La résistance aux aminoglycosides par les enzymes modificateuses est principalement liée à la dissémination par des plasmides qui codent généralement des gènes de multirésistance (Paterson, 2006). Ces enzymes ont notamment été décrites chez les espèces d'*Enterobacter* : acétyltransférases (aminoglycoside-N-acétyltransférases [AAC]), phosphotransférases (aminoglycoside-O-phosphotransférases [APH]), adénylyltransférases (aminoglycoside adénylyltransférases [AADs] ou aminoglycoside-O-nucléotidyltransférases [ANTs]), et des méthyltransférases de l'ARNr 16S telles que ArmA et RmtB (Oshiro *et al.*, 2018 ; Zhu *et al.*, 2020). Certaines souches portant l'enzyme AAC(6')-Ib présentent une sensibilité réduite à l'amikacine (Kim *et al.*, 2011). D'autre part, la présence de mutations au niveau de l'AAC(6')-Ib a été associée à une moindre résistance à l'amikacine (Shamara *et al.*, 2001). Enfin, les enzymes Arm et Rmt ont été associées à des niveaux élevés de résistance à la gentamicine, à la tobramycine et à l'amikacine, à l'exception de la streptomycine (Yeganeh Sefidan *et al.*, 2018).

5.5.3 Résistance acquise aux quinolones

Comme d'autres entérobactéries, *Enterobacter* présente des modifications dans des cibles thérapeutiques telles que la topoisomérase IV de type II (Lascols *et al.*, 2007),

l'ADN gyrase (GyrA et GyrB) (Deguchi *et al.*, 1997) ainsi que la topoisomérase IV (ParC et ParE) (Georgopoulos *et al.*, 1998 ; Brisse *et al.*, 1999). Cela est dû à la présence de mutations ponctuelles dans une région spécifique appelée QRDR (pour Quinolone Resistance Determining Region) caractérisée par une courte séquence hautement conservée (Minarini *et al.*, 2012).

La résistance aux fluoroquinolones a été observée chez des souches d'*Enterobacter* portant des gènes codant pour des enzymes de type *aac(6')-Ib*, principalement l'enzyme appelée *aac(6')-Ib-cr*, qui a généralement été identifiée dans des éléments génétiques mobiles portant le gène codant pour l'enzyme OXA-1 (Kim *et al.*, 2019).

Une autre stratégie de résistance aux quinolones est la présence d'un mécanisme « protecteur » qui confère de faibles niveaux de résistance aux quinolones de première génération. Ces mécanismes sont codés par des gènes plasmidiques *qnr* (Jacoby *et al.*, 2008). De façon intéressante, il a été récemment démontré que l'origine possible de l'une de ces protéines (QnrE1) se situe dans le chromosome d'*Enterobacter*. Cependant, *Enterobacter* ne semble pas être résistant aux fluoroquinolones en raison de la présence de cette protéine sur le chromosome. (Albornoz *et al.*, 2017).

5.5.4 Modifications membranaires et pompes à efflux

L'augmentation à l'échelle mondiale de la résistance aux carbapénèmes chez les bactéries à Gram-négatif a été significative ces dernières années. Comme décrit précédemment, la résistance aux carbapénèmes est liée à la présence de carbapénémases. Cependant, plusieurs études ont montré que la diminution de l'expression ou les mutations des porines (OmpC et OmpF) sont directement liées à la résistance aux carbapénèmes en raison de la diminution de la concentration intracellulaire (Liu *et al.*, 2021 ; Yigit *et al.*, 2002 ; Chetri *et al.*, 2019). En outre, l'augmentation de l'expression des pompes à efflux influence également la

concentration à l'intérieur de la cellule bactérienne, ce qui affecte leur efficacité (Pinet *et al.*, 2020 ; Fadli *et al.*, 2014).

Les pompes à efflux sont apparues comme une question importante dans les mécanismes de résistance aux antimicrobiens. Pour qu'une bactérie puisse causer une infection, elle a besoin de plusieurs mécanismes pour éviter les composés d'attaque produits par l'hôte, et l'expression des pompes à efflux est responsable de cette tâche. Comme d'autres entérobactéries, *Enterobacter* possède la pompe à efflux AcrAB-TolC, qui est associée à la multirésistance aux médicaments lorsqu'elle est surexprimée (Masi *et al.*, 2003). Dans une étude sur *E. cloacae*, il a été constaté que la surexpression d'AcrAB-TolC est impliquée dans la résistance à divers antibiotiques telles que tétracycline, chloramphénicol, fluoroquinolones et β -lactamines (Pérez *et al.*, 2003).

5.5.5 Résistance à la colistine

Certaines modifications du LPS induisent des changements dans la sensibilité à la polymyxine B (Olaitan *et al.*, 2014 ; Moffatt *et al.*, 2019). La résistance acquise à la colistine a été principalement associée à la présence du gène *mcr-1* codé dans un plasmide conjugatif, qui a été décrit chez *Enterobacter*. Le gène *mcr-1* représente un mécanisme unique de résistance bactérienne à la colistine dans la mesure où le produit du gène (phosphoéthanolamine transférases) catalyse la modification de la fraction lipidique A sur les LPS bactériens, en modifiant la charge en LPS, et donc la perméabilité à la colistine.

5.6 Traitement des infections

L'un des principaux problèmes du traitement des infections à *Enterobacter* spp. est la résistance naturelle et acquise aux β -lactamines notamment la sélection de souches hyperproductrices de céphalosporinase sous traitement par C3G (Meini *et al.*, 2019).

Bien que les C3G aient une bonne réponse in vitro, l'émergence de mutants résistants in vivo est fréquente. Parmi les traitements les plus efficaces figurent ceux qui incluent les C4G comme le céfépime, qui diminue le risque de sélection de mutants résistants (Tamma *et al.*, 2013 ; Meini *et al.*, 2019). L'efficacité du céfépime par rapport aux autres céphalosporines est due à sa diffusion à travers la membrane bactérienne, à la grande stabilité génomique au niveau chromosomique des β -lactamases comme AmpC, et enfin, à sa grande affinité pour les protéines de liaison à la pénicilline situées dans le périplasme d'*Enterobacter* (Harris *et al.*, 2012 ; Tamma *et al.*, 2019). Cependant, les C3G et les C4G sont toutes deux hydrolysées par des BLSE.

Dans le cas des souches productrices de BLSE, les carbapénèmes se sont révélés être une bonne option pour le traitement des infections aux *Enterobacterales* (Rodríguez-Baño *et al.*, 2018). Actuellement, la résistance aux carbapénèmes reste faible chez *Enterobacter* (Zong *et al.*, 2021), ce qui en fait encore une bonne alternative thérapeutique. Cependant, leur utilisation est limitée pour éviter la sélection de souches résistantes aux carbapénèmes (Moy & Sharma, 2017). Récemment, certaines études ont montré que l'utilisation de la pipéracilline/tazobactam était une alternative appropriée dans le traitement des bactériémies causées par *Enterobacter*, ce qui réduit la sélection de mutants AmpC hyperproducteurs (Stewart *et al.*, 2021). Un certain nombre de nouvelles options thérapeutiques basées sur des combinaisons de céphalosporines et d'inhibiteurs d'usage clinique rare tels que le ceftazidime-avibactam entre autres (cefepime-zidebactam, cefepime-tazobactam, etc.) ont montré une bonne activité contre les bactéries multirésistantes, y compris les souches porteuses de β -lactamases de classe A, C, D et de classe B avec une activité intrinsèque dans les *Enterobacterales* (Vrancianu *et al.*, 2020).

Les aminoglycosides, en particulier l'amikacine, restent un antibiotique efficace sur plus de 95% des souches d'*Enterobacter* spp. La sensibilité à l'amikacine est restée stable

dans le temps et la résistance, qui est due à la présence d'un plasmide codant pour des enzymes modificatrices, reste rare (He *et al.*, 2019).

Enfin, il est recommandé d'éviter la monothérapie par C3G et une thérapie combinée utilisant un C4G-aminoside, C4G-fluoroquinolone, est conseillée pour éviter l'émergence de mutants résistants (Tan *et al.*, 2020).

6. Diagnostic d'espèces

6.1 Méthodes pour le diagnostic des espèces

Comme mentionné dans la section sur la taxonomie, le genre *Enterobacter* comprend actuellement plus de 22 espèces décrites (Wu *et al.*, 2020 ; Wu *et al.*, 2021). Cependant, toutes les espèces décrites à ce jour n'ont pas de pertinence clinique : 7 espèces (*E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* et *E. nimipressuralis*) ont longtemps été considérées comme les plus fréquemment isolées dans l'environnement hospitalier (Mezzatesta *et al.*, 2012 ; Davin-Regli *et al.*, 2019).

Comme d'autres microorganismes, les isolats d'*Enterobacter* sont identifiés en laboratoire clinique à l'aide de différentes méthodes phénotypiques semi-automatiques telles que la galerie Api 20E ou le système Vitek2 (bioMérieux). Cependant, ces systèmes ne permettent de différencier que *K. aerogenes* (anciennement *E. aerogenes*), *E. cloacae* et *E. asburiae* mais pas les autres espèces qui sont donc mal identifiées comme l'une de ces trois-là (De Florio *et al.*, 2018). La spectrométrie de masse, qui est de plus en plus couramment utilisée, notamment le système MALDI-TOF MS, permet d'identifier plus espèces, mais l'identification est souvent erronée en ce qui concerne le genre *Enterobacter* (De Florio *et al.*, 2018 ; Uchida-Fujii *et al.*, 2020 ; Godmer *et al.*, 2021). Récemment, Godmer *et al.* ont proposé une nouvelle base de données disponible en ligne couplée au MALDI-TOF qui améliore l'identification des espèces d'*Enterobacter* jusqu'à une sensibilité de 97 % pour *E. hormaechei*, 94 % pour *E. asburiae* et 78 % pour *E. bugandensis* (Godmer *et al.*, 2021).

Ces dernières années, diverses nouvelles techniques de biologie moléculaire ont permis une identification rapide et précise des espèces bactériennes (Almeida *et al.*, 2013). Par exemple, le séquençage de l'ARNr 16S a été utilisé à cette fin. Cependant, cette technologie ne permet pas de différencier deux espèces étroitement apparentées

(Mulet *et al.*, 2010 ; Tidjani *et al.*, 2017) ; elle n'est donc pas une bonne option pour identifier les différentes espèces qui composent le genre *Enterobacter*, puisque génétiquement proches les unes des autres (liaison ADN de plus de 60% avec *E. cloacae*) (Hoffmann *et al.*, 2003). Récemment, la technique MLSA, qui utilise la séquence nucléotidique de quatre à sept gènes de ménage, tels que *atpD*, *fusA*, *infB*, *gyrB*, *leuS*, *dnaA*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB* et *hsp60*, promet d'être un bon outil pour l'identification des espèces d'*Enterobacter* (Brady *et al.*, 2013). Les résultats de la MLSA sont cohérents avec l'analyse du polymorphisme mononucléotidique (SNP, en anglais single nucleotide polymorphism) pour l'attribution des espèces par le biais du WGS (Dai *et al.*, 2020).

Le séquençage d'une partie du gène *hsp60*, décrit par Hoffman et Roggenkamp en 2003, permet de différencier 12 clusters génétiques (I-XII) (Hoffmann *et al.*, 2003). Grâce à cette méthode, la dynamique épidémiologique du genre *Enterobacter* a été mieux connue ces dernières années. Cependant, contrairement à la MLSA, le recours au seul *hsp60* ne permet pas une identification précise des espèces au sein du genre, générant ainsi une confusion dans la taxonomie (Wu *et al.*, 2020).

En 2012, une nouvelle technique a été proposée qui consiste en une combinaison de deux outils méthodologiques pour l'identification des espèces d'*Enterobacter* : le MALDI-TOF MS couplé à la PCR en temps réel (Pavlovic *et al.*, 2012). Initialement, le MALDI-TOF MS permet une identification précise du genre *Enterobacter* sans différencier les espèces. Pour résoudre ce problème, Pavlovic *et al.* proposent de réaliser une PCR en temps réel en amplifiant le gène *dnaJ*. Ce gène, qui code pour la protéine de choc thermique Hsp40, a été identifié par Pham *et al.* en 2007, offre des avantages par rapport à l'ADNr 16S et à d'autres séquences de gènes housekeeping pour définir les relations phylogénétiques au sein des *Enterobacterales*. (Pham *et al.*, 2007 ; McLean *et al.*, 2019).

L'hybridation ADN-ADN (DDH) avec un seuil de coupure (cutoff) supérieur à 70 % est parfois considérée comme le « gold standard » de l'identification des espèces (Tindall *et al.*, 2010). Cependant, la reproductibilité des résultats de cette technique est faible. C'est la raison pour laquelle la comparaison ainsi que le calcul de la distance génomiques, rendus possible grâce au WGS, entre une espèce de référence et la souche problématique, sont aujourd'hui privilégiés (**Figure 14**) (Chun *et al.*, 2018 ; Besser *et al.*, 2018). Une solution à la faible reproductibilité de l'hybridation de l'ADN est l'utilisation du génome pour effectuer le calcul *in silico* de ce qu'on appelle l'hybridation ADN-ADN (isDDDH, également appelée DDH numérique [dDDH]) avec un seuil supérieur ou égal à 70%, ce qui est équivalent à la DDH traditionnelle. Une autre méthode d'identification d'espèces est par l'identité nucléotide (ANI, en anglais Average nucleotide identity) entre une souche de référence et une souche inconnue avec un seuil supérieur ou égal à 96 %. Ces deux méthodes ont largement été utilisées pour l'identification précise des espèces (Xing *et al.*, 2019 ; Richter *et al.*, 2009 ; Ciufu *et al.*, 2018). Cependant, le WGS et son analyse restent coûteux et nécessitent un personnel hautement qualifié et sont donc généralement réalisés à des fins de recherche dans les pays développés et restent inaccessibles dans de nombreux pays.

Enfin, l'identification précise est importante pour comprendre le rôle de chaque espèce du genre *Enterobacter* impliquée dans la pathologie humaine. Par ailleurs, l'identification correcte des espèces permettra de mieux comprendre leur épidémiologie, leur virulence et la différence des profils de résistance de chacune (Wu *et al.*, 2021). Actuellement, on considère qu'une mauvaise identification n'a pas d'impact sur l'antibiothérapie ; cependant, cela pourrait être dû précisément au fait que jusqu'en 2020 la taxonomie confuse du genre ne permettait pas d'analyser les différences dans les mécanismes de résistance aux antimicrobiens au sein de chaque espèce. Aujourd'hui, grâce aux nouvelles techniques de biologie moléculaire et au séquençage du génome entier, il est possible d'identifier les espèces bactériennes avec une grande précision, ce qui permettra dans un avenir proche d'étudier le pouvoir

pathogène de chaque espèce et de connaître son impact sur la thérapie antimicrobienne.

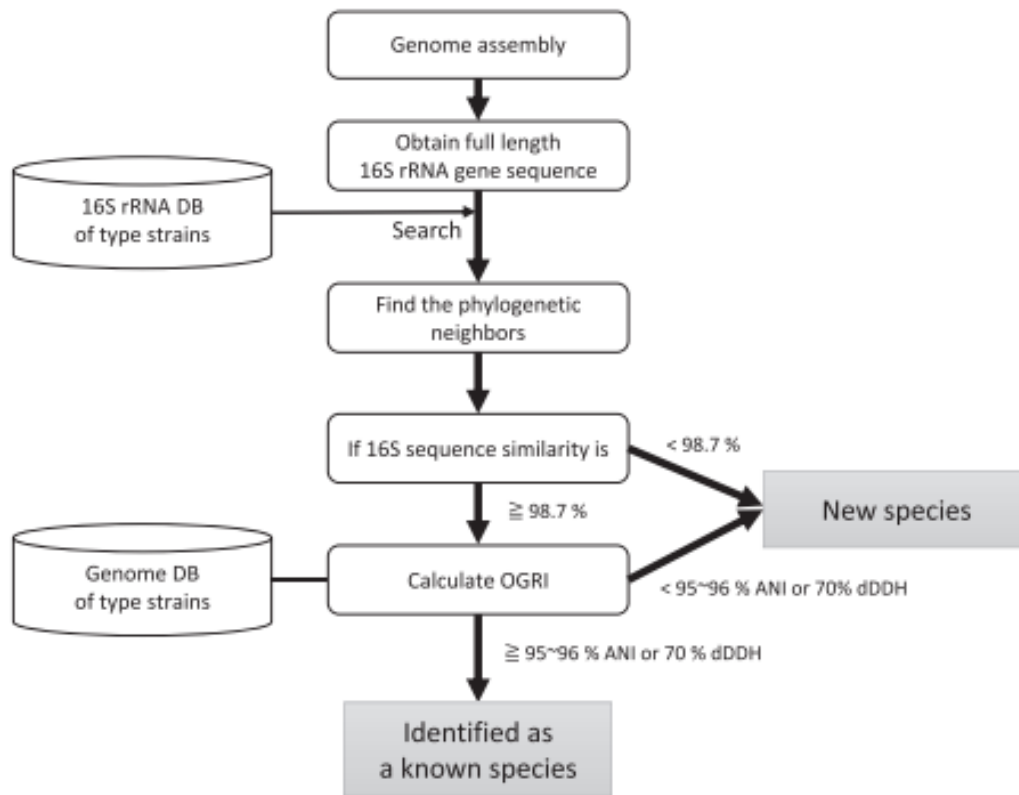


Figure 14 Schéma basé sur le génome pour la classification au niveau d'espèce. OGRI : Overall genome relatedness index (ANI et dDDH). Tiré de Chun *et al.*, 2018.

6.2 Épidémiologie moléculaire et analyse du génome

Le laboratoire clinique joue un rôle crucial pour l'épidémiologie des maladies infectieuses (Lee *et al.*, 2018). Le laboratoire est essentiel pour le diagnostic épidémiologique des épidémies, la surveillance, le typage et le sous-typage des bactéries, ainsi que la caractérisation microbiologique des agents pathogènes impliqués comme leur transmissibilité, leur résistance aux antimicrobiens, leur pathogénèse, et l'identification du réservoir primaire et de la source de contamination

pendant une épidémie. Ces dernières années, les progrès de la biologie moléculaire, outre les laboratoires de recherche, ont été adaptés aux laboratoires cliniques et de santé publique afin d'accélérer et d'identifier les agents pathogènes des maladies infectieuses avec une grande précision. La biologie moléculaire est essentielle pour le typage bactérien afin d'améliorer la compréhension de l'épidémiologie des maladies infectieuses classiques et émergentes.

Dans ce qui suit, une description des méthodes moléculaires utilisées dans ce travail pour la caractérisation de l'épidémiologie moléculaire d'*Enterobacter* sera donnée, en mettant l'accent sur les outils bioinformatiques employés pendant le développement de cette thèse.

6.2.1 Identification moléculaire des espèces bactériennes

L'identification des espèces bactériennes est une tâche importante pour le diagnostic, le pronostic et le choix du traitement. Cependant, les méthodologies pour cette tâche ont évolué au fil du temps. La nature des méthodologies couramment employées et leur pouvoir de discrimination sont illustrés dans la **Figure 15**.

6.2.1.1 Identification par séquençage Sanger

Après le séquençage Sanger, la séquence de nucléotides est analysée à l'aide du logiciel Finch TV, un visualisateur de chromatogrammes de bureau développé par Geospiza, Inc. pour l'analyse des séquences Sanger au format scf ou ab1. Le logiciel est disponible sur <https://digitalworldbiology.com/FinchTV>.

Les séquences sont copiées dans un fichier FASTA (">") pour l'alignement. Les alignements dans ce travail ont été réalisés avec le logiciel MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), un logiciel qui met en œuvre des méthodes analytiques

et des outils informatiques pour la phylogénomique et la phylomédecine. Le logiciel est disponible à l'adresse <https://www.megasoftware.net/> (Kumar *et al.*, 2018). L'une des méthodes classiques d'analyse phylogénétique est la construction d'arbres à partir de la distance évolutive à l'aide de la méthode Neighbor-joining. Cette méthode est basée sur la recherche de paires d'unités opérationnelles taxonomiques, c'est-à-dire deux séquences proches l'une de l'autre ou "voisines" qui minimisent la longueur totale de la branche à chaque étape du regroupement, générant la topologie d'un arbre parcimonieux (arbre qui nécessite le moins d'événements génétiques indépendants pour sa construction) (Saitou *et Nei.*, 1987). Le logiciel génère un fichier de sortie au format newick. Le fichier newick peut être utilisé dans différents logiciels pour affichage et modification. Dans ce travail, les logiciels FigTree et iTol ont été utilisés. iTOL (<https://itol.embl.de>) est un logiciel interactif en ligne qui permet de manipuler et d'annoter des arbres phylogénétiques (Letunic et Bork, 2019).

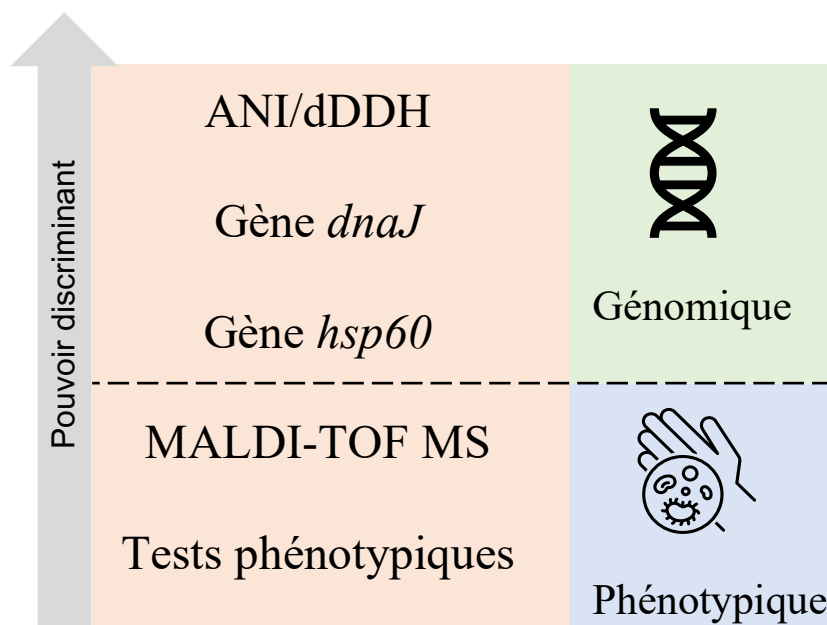


Figure 15 Méthodes phénotypiques et génotypiques pour l'identification des espèces d'*Enterobacter* spp. proposées.

L'identification des espèces par alignement est un outil facile à utiliser qui consiste en un séquençage Sanger d'un gène cible, un alignement dans MEGA X des séquences à l'aide de MUSCLE (multiple sequence alignment by log-expectation), une méthode basée sur l'espérance mathématique pour évaluer la parenté de deux séquences (Edgar, 2004). Enfin, dans la construction de l'arbre phylogénétique à mille répétitions (1000-bootstrap), la même séquence du gène cible provenant d'espèces de référence connues est intégrée. Théoriquement, deux souches de la même espèce devraient avoir un pourcentage élevé d'identité, générant des branches proches l'une de l'autre ou une branche unique avec un node commun.

6.2.1.2 Identification par WGS

Le séquençage du génome entier fournit une base de données de l'ensemble du génome. Ce séquençage massif génère des fragments d'ADN (reads) au format fastaq qui sont assemblés à l'aide de logiciels tels que PATRIC (Gillespie *et al.*, 2011) disponible sur <https://www.patricbrc.org/> pour générer des contigs au format fasta qui peuvent être utilisés dans les différentes plateformes bioinformatiques pour l'analyse génomique.

Pour une identification précise des espèces, les fichiers fasta des génomes sont utilisés pour calculer soit le pourcentage d'identité (ANI) soit la distance génomique (DDH) entre un génome inconnu et un génome connu ou référence (espèce connue et caractérisée).

La dDDH/isDDH consiste à calculer la distance génomique entre une souche de référence et la souche problématique en utilisant des « cutoff » égal ou supérieur à 70% pour l'attribution des espèces (Goris *et al.*, 2007). La dDDH peut être calculée sur le serveur en ligne de la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH

disponible sur <https://ggdc.dsmz.de/home.php> et la formule 2 est couramment utilisée (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013).

Par ailleurs, la valeur ANI est un autre outil comparable à la dDDH (Goris *et al.*, 2007) et utilise des « cutoff » d'homologie égal ou supérieur à 96% pour l'attribution des espèces. Le calcul de l'ANI peut être effectué sur le serveur web ANI Calculator disponible à l'adresse <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/> ou sur le serveur web JspeciesWS disponible à l'adresse <http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#home> (Richter *et al.*, 2016).

6.3 Typage des populations bactériennes

La compréhension de l'épidémiologie des populations bactériennes au niveau local ou mondial varie selon la méthodologie employée. Certes, chacune a ses avantages et ses inconvénients, mais la caractérisation des bactéries est nécessaire pour comprendre des phénomènes tels que la résistance aux antibiotiques ou la présence de facteurs de virulence et évidemment leur épidémiologie (**Figure 16**). La caractérisation phénotypique est importante mais ne fournit pas d'informations sur la structure des populations bactériennes au cours d'un foyer épidémiologique.

6.3.1 Typage par PCR et PFGE

L'une des techniques rapides et peu coûteuses est le typage par réaction en chaîne par polymérase (PCR) de la séquence consensus intergénique entérobactérienne (ERIC), une technique basée sur une simple PCR directement à partir de colonies bactériennes (Zaher et Cimolai, 1997). Le résultat est un profil de bandes électrophorétiques causées par la variabilité des répétitions de la séquence consensus et la distance entre les copies contiguës causée par des insertions ou des délétions d'ADN. Deux souches présentant le même profil ERIC-PCR appartiennent au même groupe clonal.

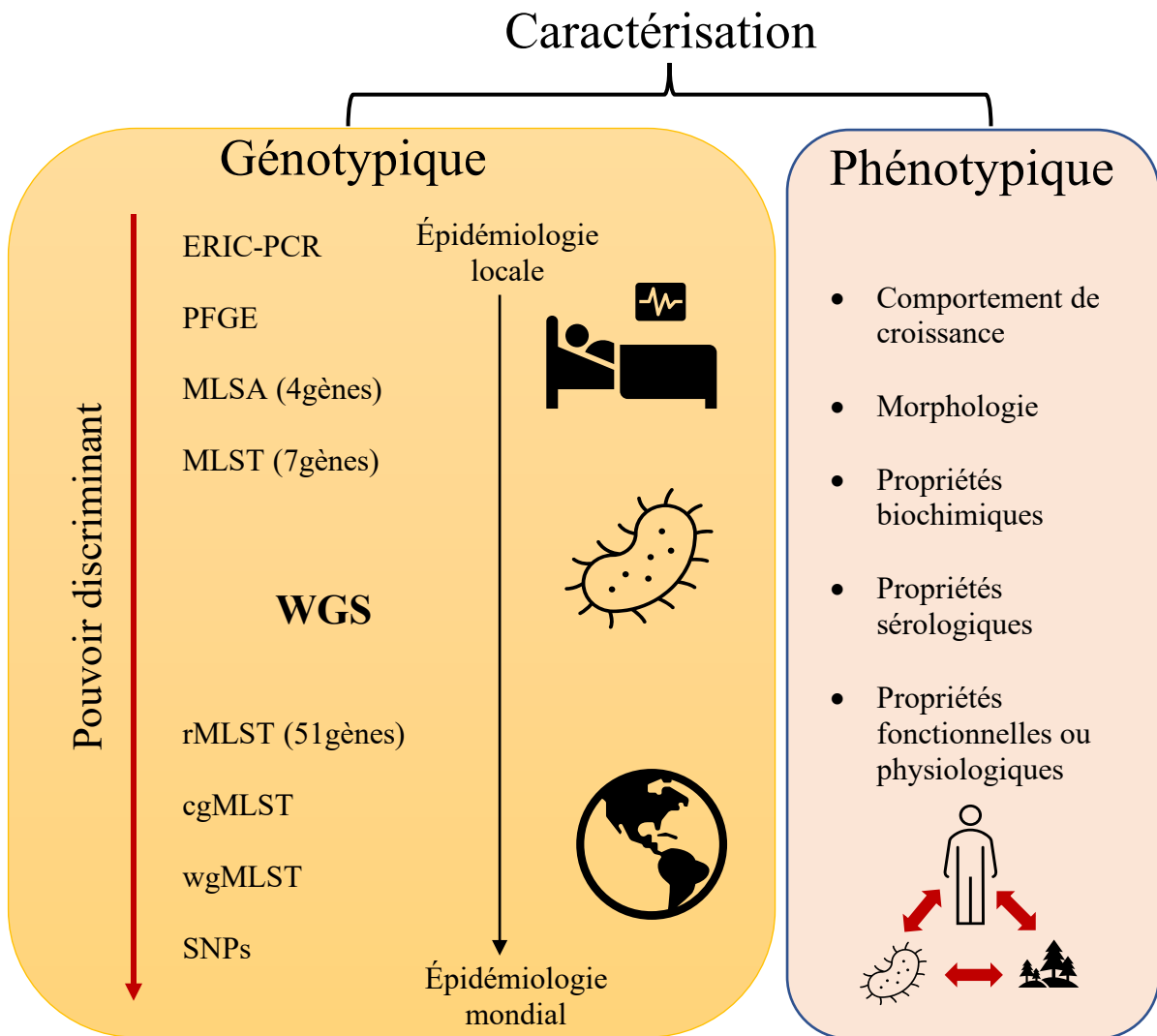


Figure 16 Caractérisation microbiologique phénotypique et génotypique pour l'épidémiologie et le typage d'*Enterobacter*.

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) est la technique de référence pour le typage bactérien. Cette méthode implique la restriction enzymatique du génome bactérien à l'aide de l'enzyme S1, la séparation des fragments d'ADN dans une chambre d'électrophorèse à champ pulsé et le classement clonale sur la base des modèles de bandes PFGE (Neoh *et al.*, 2019). Chez *Enterobacter*, les isolats présentant des motifs identiques sont considérés comme « des clones indiscernables », ceux qui diffèrent

entre 1 et 3 bandes sont considérés comme « étroitement apparentés », ceux qui présentent 4 à 6 bandes comme « possiblement apparentés » et ceux qui présentent un nombre supérieur ou égal à 7 comme « non apparentés » (Dalben *et al.*, 2008).

Le typage à l'aide du Multilocus Sequence Typing (MLST) a généré 1799 séquences types (ST) au 2022. Le typage est basé sur 7 gènes housekeeping d'*Enterobacter* (*dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leusS*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*). Pour réaliser l'identification du MLST, il est nécessaire de procéder à l'amplification individuelle de chacun des gènes séparément, puis au séquençage comme mentionné dans les sections précédentes. Le typage est effectué directement sur le serveur public https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_eiclocae_seqdef avec des fichiers fasta. Si la séquence n'est pas trouvée dans la base de données, une soumission de séquence est faite pour le traitement des allèles et l'attribution ultérieure du profil MLST et de son numéro ST respectif.

Le typage au cours d'une épidémie peut être rapidement analysé à l'aide des profils MLST, ou de la séquence concaténée des 7 gènes housekeeping d'*Enterobacter*, alignée à l'aide de MEGA X. Ces données peuvent être visualisées sur le serveur web interactif PhyloViz disponible à l'adresse <https://www.phyloViz.net/>.

6.3.2 Typage par WGS

Lorsque le génome complet est disponible, le typage est effectué directement dans PubMLST ou peut être effectué dans la plateforme interactive du Center for Genomic Epidemiology disponible sur <https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/> (Larsen *et al.*, 2012).

Le WGS permet une analyse rapide de la structure d'une population bactérienne au niveau local ou global. Cette technique peut être utilisée pour le typage en utilisant le core genome MLST (cgMLST), le whole genome MLST (wgMLST) ou le SNP.

Bien que le SNP soit actuellement considéré comme la méthode la plus adaptée à l'étude épidémiologique des pathogènes, les différentes plateformes utilisées rendent difficile la standardisation des résultats, c'est pourquoi le typage cgMLST et wgMLST représente une alternative intéressante.

Actuellement, des profils cg- et wgMLST ont été établis pour certains agents pathogènes tels que *Salmonella* ou *E. coli*, mais il n'en existe pas pour *Enterobacter*. Cependant, certains serveurs web fournissent une approximation fiable de cette analyse, comme PGADB-builder (Liu *et al.*, 2016). Le typage cg- et wgMLST nécessite une base de données des allèles pangénomiques (PGADB) pour la population d'un organisme bactérien. Cette analyse peut être effectuée sur la plateforme web PGADB-builder disponible sur <http://wgmlstdb.imst.nsysu.edu.tw/>. Le serveur génère une matrice d'allèles, une matrice de présence/absence, une matrice de distance et un arbre au format newick.

Enfin, l'analyse SNP peut être effectuée sur diverses plateformes ou en ligne de commande. Une alternative rapide et fiable pour l'analyse des SNP est la plateforme du Centre d'épidémiologie génomique. Le software (SNP)-based CSI phylogeny Web server disponible sur <https://cge.food.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/> est une méthode qui cartographie chaque contig par rapport à un génome de référence en utilisant BWA v. 0. 7.2. Ensuite, les SNP sont appelés à l'aide de SAMtools v. 0.1.18 en excluant les SNP situés à moins de 10 bases les uns des autres. Enfin, CSI renvoie un fichier newick pour la visualisation des arbres (Kaas *et al.*, 2014).

6.4 Analyse du génome

Le WGS permet l'analyse du contenu génomique d'un micro-organisme (**Figure 17**). L'analyse du contenu génomique est un outil puissant, non seulement pour l'épidémiologie moléculaire, mais aussi pour une recherche approfondie de données importantes pour le diagnostic ou le traitement. Les outils bioinformatiques utilisés dans ce travail pour la génomique comparative sont mentionnés ci-dessous.

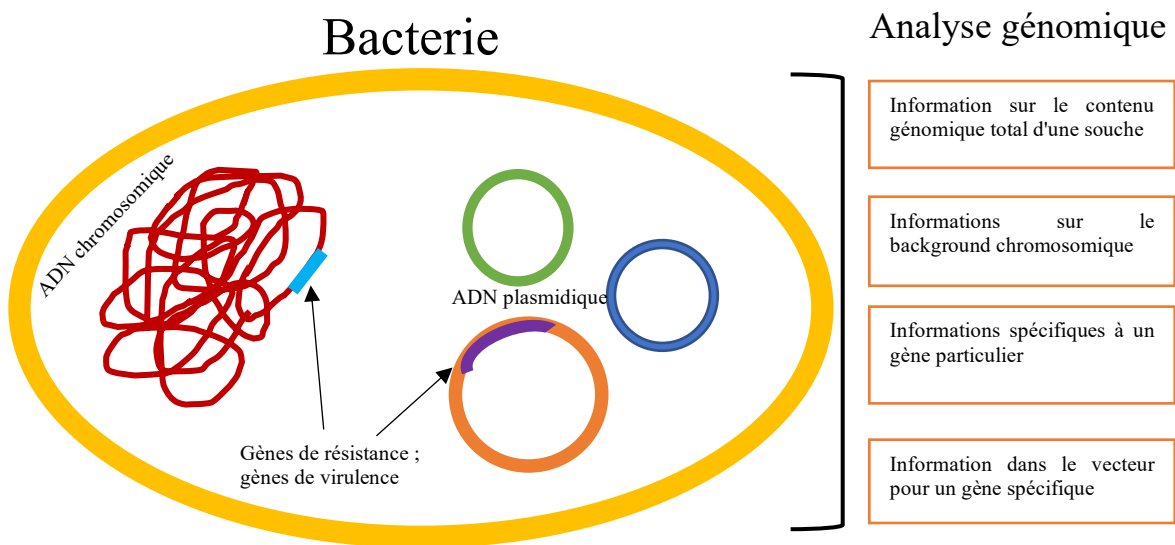


Figure 17 Analyse du contenu génomique d'un micro-organisme

Le processus consistant à passer d'un fichier de contigs (séquences de nucléotides) à un fichier contenant des séquences d'acides aminés, c'est-à-dire l'ensemble des protéines qui sont codées dans le génome, est appelé annotation du génome.

L'annotation nous permet de connaître le contenu génétique au niveau des protéines. Il existe différents outils bioinformatiques pour l'annotation et chacun d'entre eux a ses

avantages et ses inconvénients. Dans ce travail, nous avons utilisé le service RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) disponible sur <https://rast.nmpdr.org> et Prokka (Seemann, 2014). RAST et Prokka sont des services entièrement automatisés qui permettent d'annoter les génomes bactériens en identifiant les gènes codant pour les protéines, les ARNr et les ARNt, en attribuant des fonctions aux gènes et en reconstruisant le réseau métabolique (Aziz *et al.*, 2008).

L'analyse du pangénome a été réalisée à l'aide du logiciel Roary qui est un pipeline autonome de pan génome à grande vitesse, qui prend des assemblages annotés au format GFF3 (produit par Prokka) et calcule le pan génome. Il peut analyser des ensembles de données avec des milliers d'échantillons, ce qui est infaisable du point de vue informatique avec les méthodes existantes, sans compromettre la qualité des résultats (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary/>).

En outre, les archives génomiques sont abstraites. Par conséquent, les outils bioinformatiques sont importants pour visualiser le génome d'une manière graphique qui permet une meilleure compréhension du génome. Des outils tels que DNAPlotter du Sanger Institute, disponible sur <https://www.sanger.ac.uk/tool/dnaplotter/>, peuvent être utilisés pour visualiser le génome. Cet outil est une application Java interactive permettant de générer des représentations linéaires ou circulaires du génome (Carver *et al.*, 2009). Un autre outil graphique permettant la visualisation du génome et la génération de cartes circulaires est CGView Server, disponible à l'adresse <https://cgview.ca/>.

Lorsque le génome complet est disponible, un monde de possibilités s'ouvre pour étudier non seulement les gènes d'intérêt mais aussi l'ensemble du génome central d'un micro-organisme. Pour l'étude du génome central, il existe plusieurs outils qui seront sélectionnés en fonction des besoins du chercheur. Par exemple, le serveur web Center for Genomic Epidemiology propose divers outils pour l'analyse du résistome

(<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>). ResFinder 4.0 fournit des antibiogrammes *in silico* qui sont jusqu'à >95% fiables par rapport aux tests phénotypiques (Bortolaia *et al.*, 2020). Un autre outil convivial et facilement accessible pour étudier le résistome de base est CARD 2020 (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) disponible à l'adresse <https://card.mcmaster.ca/>. CARD est une base de données qui permet la comparaison BLAST pour fournir des séquences moléculaires et des données de référence de qualité entre les séquences de référence pour la prédiction du résistome (Alcock *et al.*, 2020). CARD est également disponible en tant qu'extension de CGView Server.

L'analyse du virulome de base peut être effectuée sur le serveur web du Center for Genomic Epidemiology disponible à l'adresse <https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>. Bien que la base de données VFDB (Virulence Factor Database) soit la plus couramment utilisée, elle est disponible sur le site <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>. VFDB identifie systématiquement les facteurs de virulence connus ou potentiels dans les génomes bactériens entiers et/ou en draft (Liu *et al.*, 2019). Après l'analyse, une curation manuelle des gènes peut être effectuée à l'aide de BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) du NCBI. Certains des outils bioinformatiques pour la caractérisation et le typage des génomes bactériens sont présentés dans la **Figure 18**.

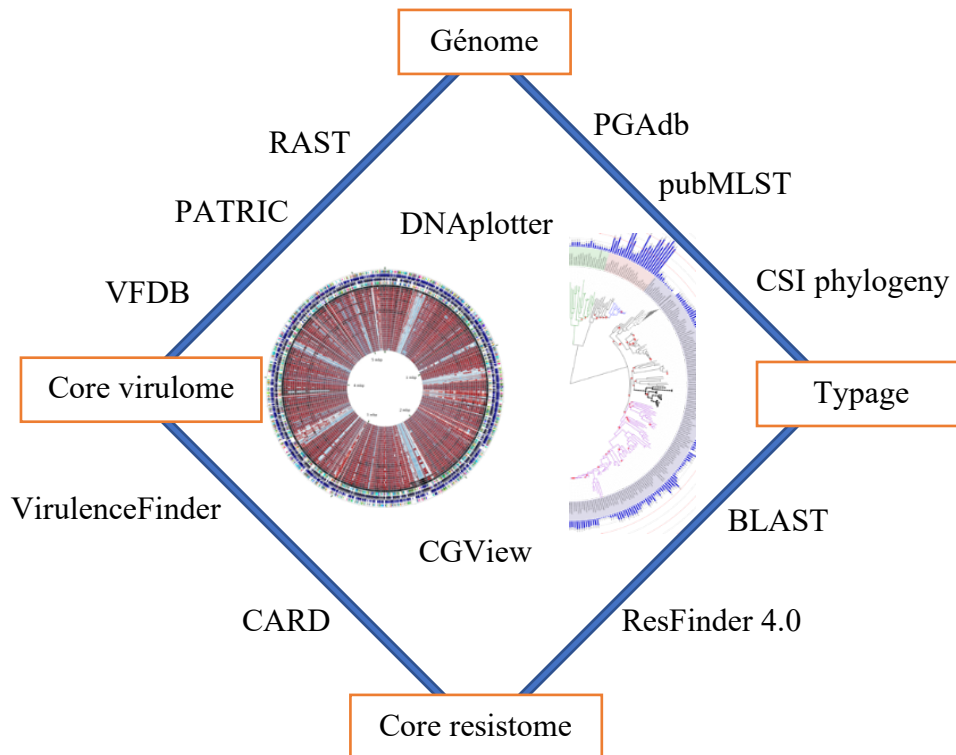


Figure 18 Schéma général présentant certains des outils bioinformatiques pour la caractérisation et le typage génomique chez les bactéries.

3. Lipopolysaccharides

7.1 Fonction et biogenèse du lipopolysaccharide

Les bactéries à Gram-négatif aussi dénommées bactéries bimembranées sont caractérisées par une enveloppe composée de deux membranes : une membrane interne (MI) et une membrane externe (ME), qui ont toutes deux pour fonction d'assurer l'interaction de la bactérie avec son environnement. Ces deux membranes sont séparées par un compartiment aqueux appelé périplasma, qui contient le peptidoglycane (**Figure 19**) (Silhavy *et al.*, 2010). La ME sert de première ligne de défense contre l'environnement extérieur et se caractérise par une bicouche hautement asymétrique contenant des phospholipides dans le feuillet interne et des molécules de LPS dans le feuillet externe (Bos *et al.*, 2007 ; Kamio & Nilkaido, 1976).

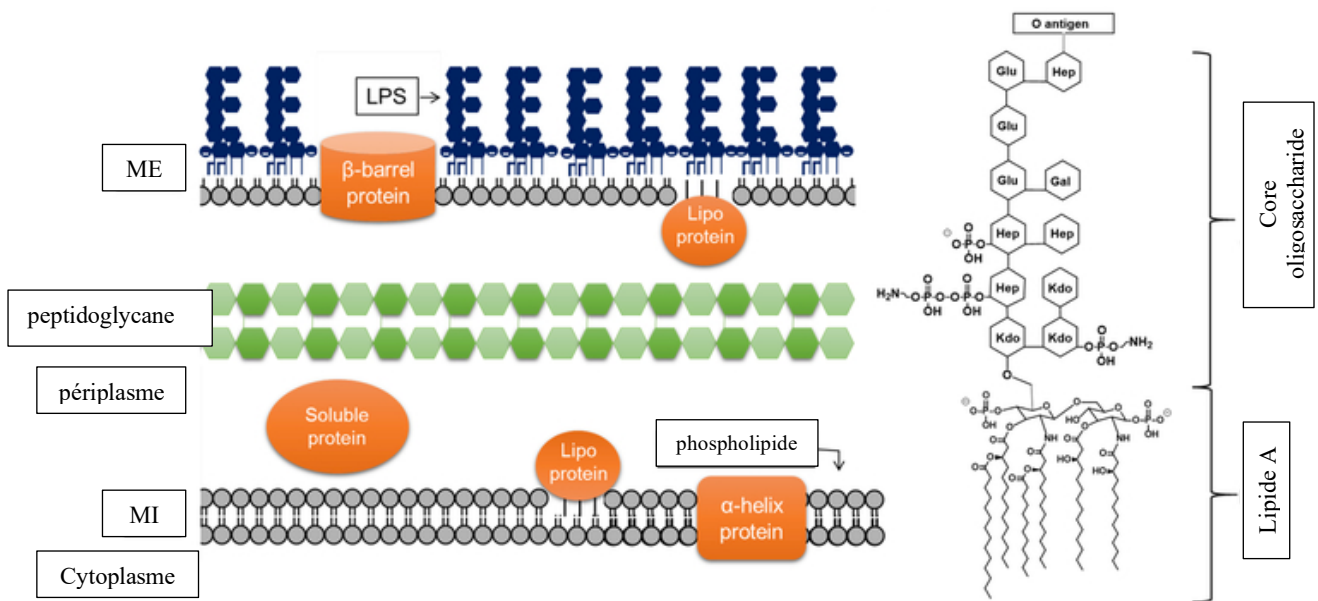


Figure 19 Architecture de l'enveloppe des bactéries à Gram-négatif. Tiré de Bertani & Ruiz, 2018.

7.2 Endotoxines, lipopolysaccharides

Le LPS est exprimé de manière ubiquitaire dans toutes les bactéries à Gram-négatif car il est nécessaire à l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la membrane externe (Whitfield & Trent, 2014 ; Erridge *et al.*, 2002 ; Simpson & Trent, 2020). La reconnaissance des LPS par le système immunitaire inné, en particulier par les monocytes et les macrophages, a évolué pour permettre à l'hôte (mammifère) de reconnaître et de réagir rapidement aux infections causées par des bactéries à Gram-négatif (Simpson & Trent, 2020). Cependant, au cours de processus de chocs septiques, où les LPS peuvent se localiser dans la circulation sanguine (systémique), une réaction inflammatoire systémique peut se produire, entraînant une défaillance multiviscérale, un choc et potentiellement la mort (Raetz & Whitfield, 2002). La distribution asymétrique des LPS sur la surface bactérienne fonctionne comme une barrière puissante, imperméable à de nombreux composés toxiques, y compris les antibiotiques (Nikaido & Vaara, 1985).

7.3 Structure du LPS

Le terme lipopolysaccharide a été utilisé pour désigner la structure de l'endotoxine constituée d'un assemblage de lipides et de glucides. Les premiers travaux sur l'élucidation de la structure des LPS ont été initiés au début des années 1950 par Luderitz et Westphal, dont les travaux basés sur une extraction acide ont montré la présence de portions d'hydrates de carbone libres, appelées lipide A (Westphal *et al.*, 1981). Dans les années 1960 à 1980, il a été démontré que le lipide A était la molécule responsable des activités biologiques (Galanos *et al.*, 1979 ; Lüderitz *et al.*, 1984). Le groupe de Tetsuo Shiba et ses collaborateurs ont démontré que le lipide A était le centre endotoxique de la molécule à partir de préparations synthétiques du lipide A (Tanamoto *et al.*, 1984).

Aujourd'hui, à l'aide de diverses méthodologies telles que la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), la CLHP « HPLC » (Chromatographie Liquide à Haute Performance) et les études d'épitopes, l'architecture générale des LPS des bactéries à Gram-négatif a été caractérisée (**Figure 20**).

La structure des LPS est un élément clé pour la compréhension de leurs activités. En effet, les activités des molécules de LPS sont entre autres définies et modulées par leurs structures et surtout par la structure de la région lipide A.

L'architecture globale des LPS, qui sont des molécules amphiphiles, peut se décomposer en trois régions distinctes : une région lipidique hydrophobe (lipide A) et une région osidique hydrophile constituée par un noyau oligosaccharidique «core», et une région polysaccharidique portant la spécificité sérologique O (chaîne O-spécifique).

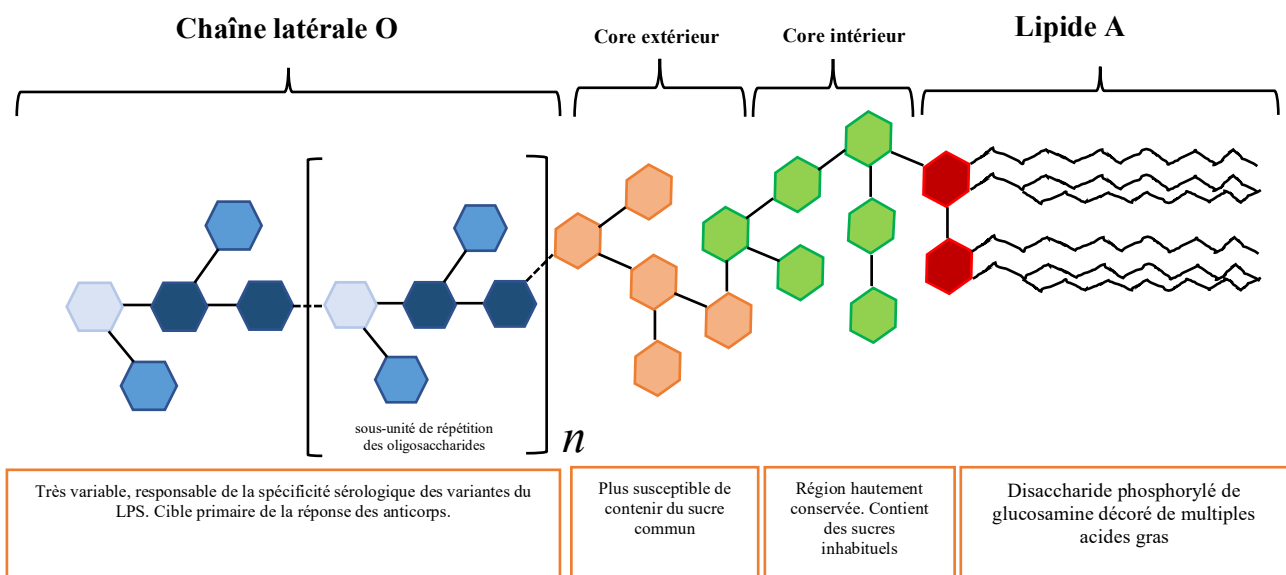


Figure 20 Structure générale du LPS des bactéries à Gram-négatif.

7.3.1 La chaîne O

La chaîne O-spécifique est un polysaccharide constitué d'unités répétées d'un à huit sucres dont la nature varie selon les souches bactériennes et pouvant se répéter jusqu'à 50 fois. Cette variabilité de chaîne, de liaison chimique, de substitution, génère ainsi une grande diversité qui est corroborée par l'observation de centaines de sérotypes pour une seule bactérie. La synthèse incomplète des chaînes génère des structures contenant entre 0 et 50 unités, ce qui donne lieu à des motifs en échelle qui est observé lors de la révélation d'une électrophorèse SDS-PAGE (Électrophorèse en Gel de Polyacrylamide contenant du Dodécysulfate de Sodium) en raison des différents poids moléculaires des LPS. Le polysaccharide est le principal antigène ciblé par la réponse immunitaire car il s'agit de la partie la plus externe, c'est donc la partie antigénique des LPS et c'est vers cette région que sont dirigés les anticorps. Elle détermine donc la spécificité sérologique de la bactérie.

La chaîne O joue un rôle dans l'activation et l'inhibition du système du complément (Joiner *et al.*, 1986), et chez de nombreux micro-organismes la chaîne O est essentielle à leur survie chez l'hôte (Joiner *et al.*, 1984 ; Saladowski *et al.*, 2001).

7.3.2 Core polysaccharide

Contrairement à la chaîne O, la région centrale des LPS, composée d'oligosaccharides, est beaucoup plus conservée entre les différentes souches et espèces bactériennes (Steimle *et al.*, 2016 ; Brandenburg & Wiese, 2004). La **Figure 21** montre un exemple de la diversité des structures centrales dans différentes bactéries à Gram-négatif pathogènes.

Contrairement au core interne, le core externe est plus variable et contient des sucres hexose plus communs tels que le glucose, le galactose, la N-acétyl glucosamine et la

N-acétyl galactosamine (région hexose). Le core interne est caractérisé par la présence de sucres plus inhabituels tels que le Kdo et l'heptose. Le Kdo est présent dans presque tous les LPS et se lie au lipide A via ses hydrates de carbone, sauf chez *Acinetobacter* et *Burkholderia cepacia* (Maldonado *et al.*, 2016 ; Vinogradov *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter que la bactérie peut se passer de la chaîne latérale O et de la majeure partie du core, mais que le résidu Kdo est absolument nécessaire (Helander *et al.*, 1988). Enfin, bien que la partie active soit le lipide A, la nature et le nombre de sucres et des substituants ont un impact sur la modulation de l'activité endotoxinique (**Figure 21** et **Figure 22**) (Raetz & Whitfield, 2002)

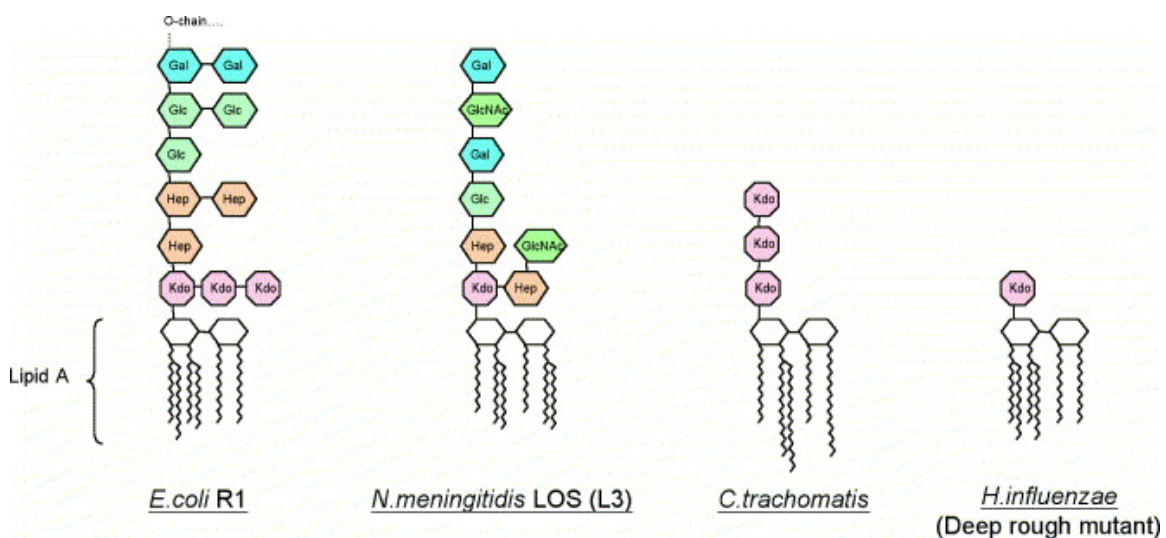


Figure 21 Structures du core de pathogènes à Gram-négatif. Exemples de types de core central montrant une variété de structures. Tiré de Erridge *et al.*, 2002.

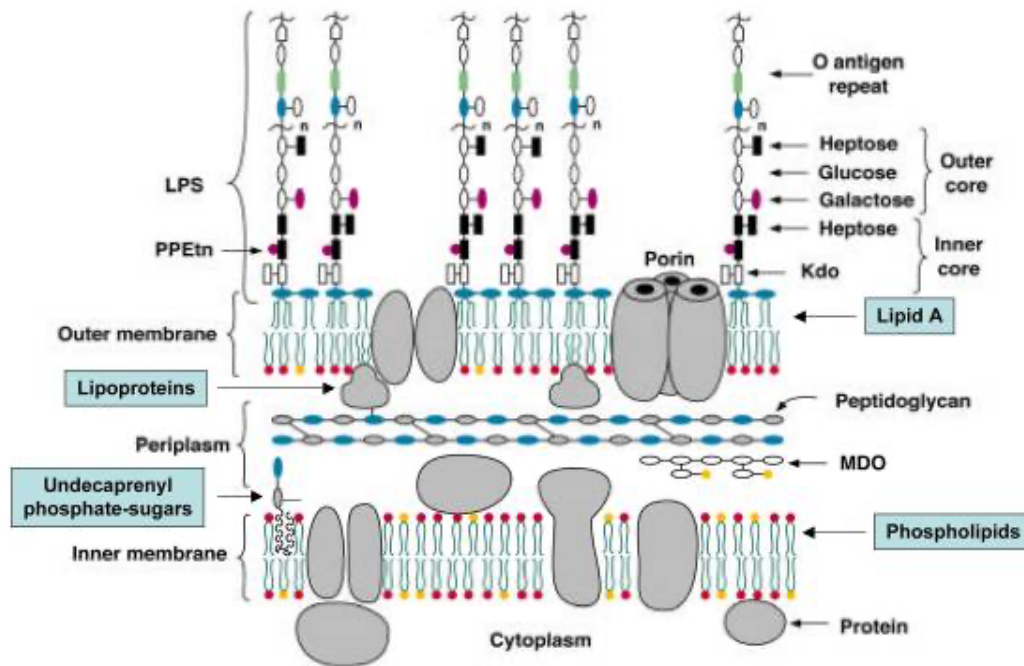


Figure 22 Modèle des membranes interne et externe de *E. coli* K-12. Tiré de Raetz & Whitfield, 2002

7.3.3 Structure générale du lipide A

Comme mentionné ci-dessus, le lipide A est la partie responsable de l'activité endotoxinique. Structurellement, il est composé d'un disaccharide de D-glucosamine liées en β -(1-6) β -D-GlcN-(1-6)- α -D-GlcN ayant deux groupes phosphates aux positions 1 et 4'. Les deux phosphates peuvent en outre être substitués par d'autres groupes phosphates, de l'éthanolamine, de l'éthanolamine phosphate, de l'éthanolamine diphosphate, du GlcN, du 4-amino-4-déoxy-L-arabino-pyranose et du D-arabino-fructose (**Figure 23**) (Steimle *et al.*, 2016 ; Homma *et al.*, 1985, Kotani *et al.*, 1985). Le lipide A est incorporé dans la membrane externe bactérienne principalement par des interactions hydrophobes et électrostatiques. La partie diglucosamine est orientée vers l'extérieur tandis que les chaînes acylées « acides gras » sont orientées vers l'intérieur hydrophobe de la membrane (Raetz & Whisfield, 2002). Cependant, les structures des lipides A varient même au sein d'une même espèce (Raetz & Whisfield,

2002). Les résidus de sucre du squelette saccharidique avec principalement des 2-amino-2-déoxy-D-glucopyranoses (D-GlcpN) peuvent également contenir un amino supplémentaire (D-GlcpN3N) (Molinaro *et al.*, 2015 ; Roppel & Mayer, 1975). Parmi d'autres différences importantes, nous pouvons trouver des variations dans le nombre, la position et la longueur des acides gras, la présence de groupes polaires ou de groupes phosphates (Raetz *et al.*, 2007). Le motif de phosphorylation n'est pas non plus conservé parmi les espèces bactériennes et le fait d'avoir une charge négative (phosphate libre) permet aux bactéries de modifier leur charge nette de surface (Molinaro *et al.*, 2015) qui varie en fonction des changements environnementaux tels que la température ou le pH. Cette charge est importante pour les mécanismes d'échappement pour contrer le système immunitaire, pour se protéger de l'action des antibiotiques ou de peptides antimicrobiens (**Figure 24**) (Steimle *et al.*, 2016).

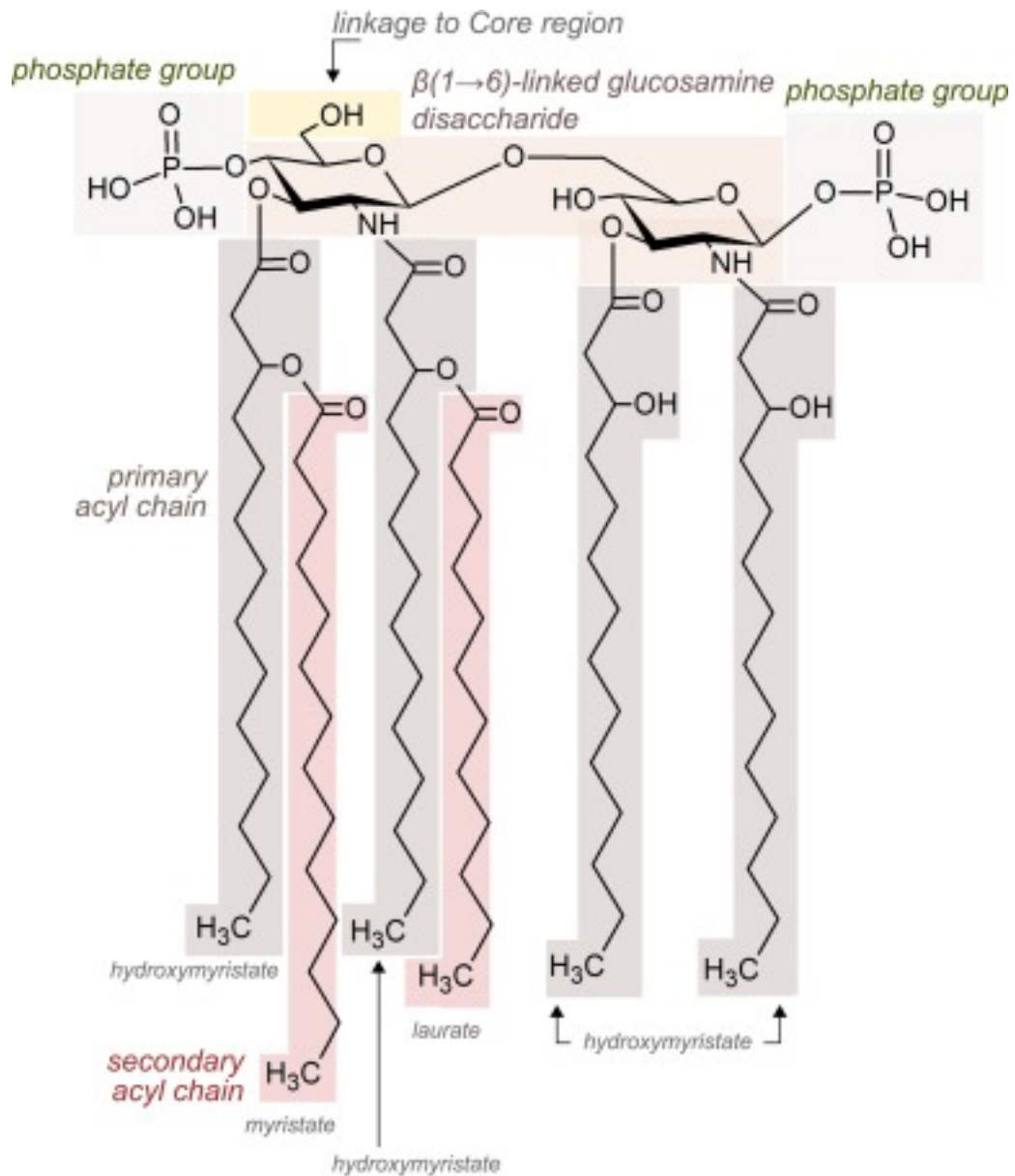


Figure 23 Structure générale du lipide A détaillé de *E. coli*. Le groupe hydroxyle (jaune clair) de la glucosamine distale relie le lipide A à la région centrale. Les deux groupes phosphates sont représentés en vert clair. Les chaînes acyle primaires (gris clair) sont directement liées aux fragments de sucre, les chaînes acyle secondaires (rouge clair) sont estérifiées avec les groupes hydroxyle des chaînes acyle primaires. Toutes les chaînes acyles primaires des lipides d'*E. coli* sont des hydroxymyristates, l'une des deux chaînes acyles secondaires est un myristate et l'autre un laurate. Tiré de Steimle *et al.*, 2016.

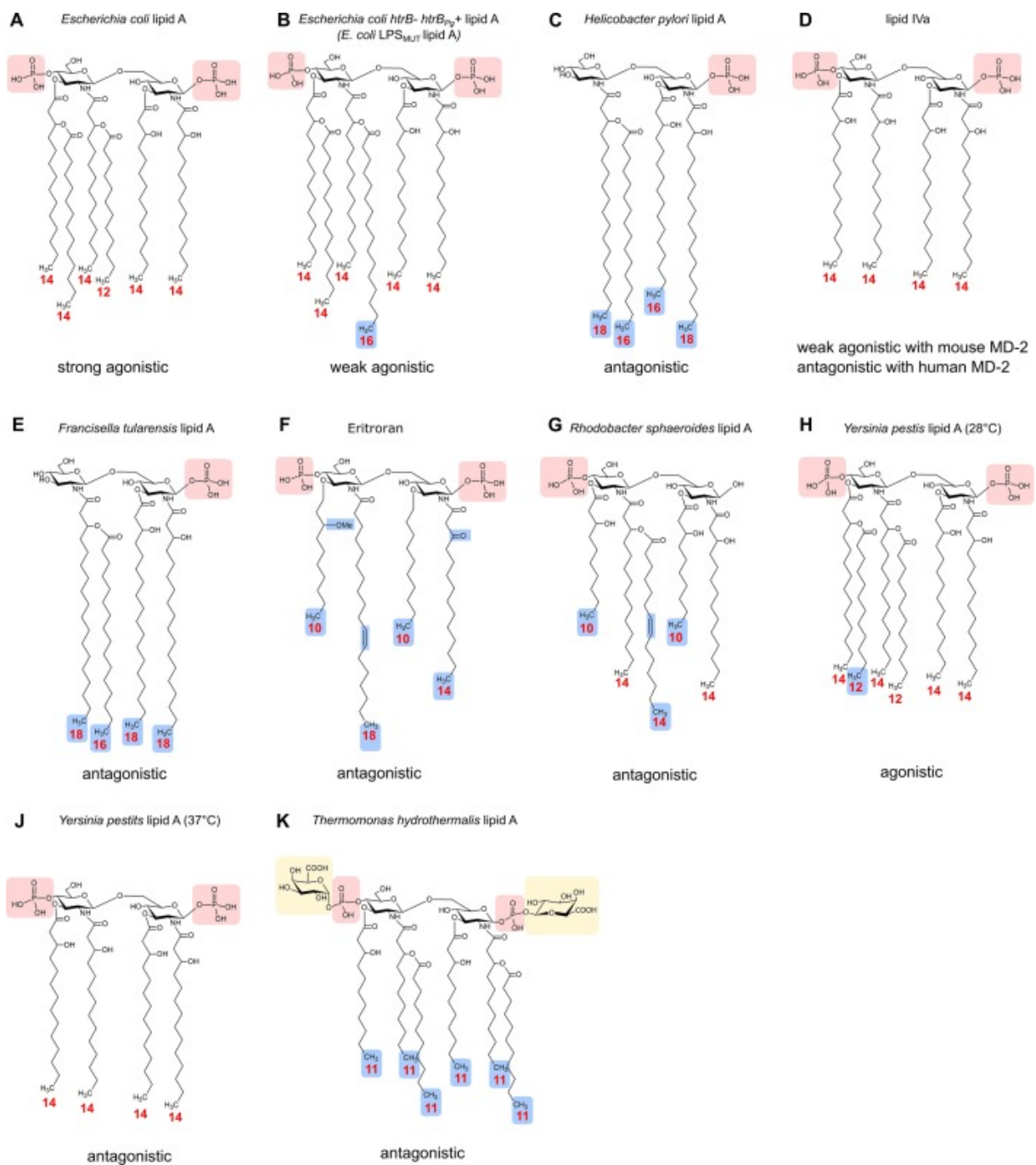


Figure 24 Différentes structures de lipides A provenant de diverses bactéries et leur potentiel immunogène. (A) Prototype de lipide A de *E. coli*. (B-C, E, G-K) structures des lipides A d'autres bactéries. (D) structure de l'antagoniste du lipide IVa. (F) structure de l'antagoniste TLR4 synthétisé chimiquement, Eritroran. Les groupes phosphates immunogènes sont surlignés en rouge clair. Tiré de Steimle *et al.*, 2016

7.4 Biogenèse du LPS

Différentes enzymes sont impliquées dans la biosynthèse du LPS (**Table 8**) à partir d'une molécule d'UDP-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) en un disaccharide-1-P, Kdo₂-lipide A aboutissant au LPS comme le montre la **Figure 25**. La première étape est la synthèse du Kdo₂-lipide A (Raetz & Whisfield, 2002), la voie est médiée par les neuf enzymes présentées dans le tableau et a lieu dans le cytoplasme et à la surface de la membrane interne. Les trois premières réactions aboutissent à l'addition de deux chaînes d'acides gras 3-OH (**Figure 25**). Le produit résultant est ensuite hydrolysé par LpxH pour former le lipide X (Banisnki *et al.*, 2002 ; Babinski *et al.*, 2002), LpxB condense le lipide X pour former le disaccharide-1-P (Crowell *et al.*, 1986). Les enzymes catalysant les réactions suivantes (LpxK, KdtA, LpxL et LpxM) forment le lipide IV A (Garet *et al.*, 1988 ; Garet *et al.*, 1997). Le lipide IV A est complété par deux résidus Kdo pour donner naissance au Kdo₂-lipide A (**Figure 25**) (Brozek & Raetz, 1990), la structure minimale nécessaire du LPS pour la viabilité des cellules.

Chez *E. coli* et *Salmonella*, les gènes nécessaires à la biosynthèse des oligosaccharides de base sont présents dans trois opérons (*gmhD*, *waaQ*, *kdtA*) (Roncero & Casadaban, 1992). L'opéron *gmhD* est nécessaire à la biosynthèse des oligosaccharides du core interne, ainsi qu'à la biosynthèse et au transfert de l'Hep et à la liaison de l'antigène O au lipide central A (Schnaitman & Klena, 1993 ; Whitfield *et al.*, 1997) tandis que l'opéron *waaQ* est responsable de la biosynthèse des oligosaccharides du core externe et de leur modification, et enfin l'opéron *kdtA* ajoute des résidus Kdo au lipide IV A (**Figure 26**) (Brozken *et al.*, 1989).

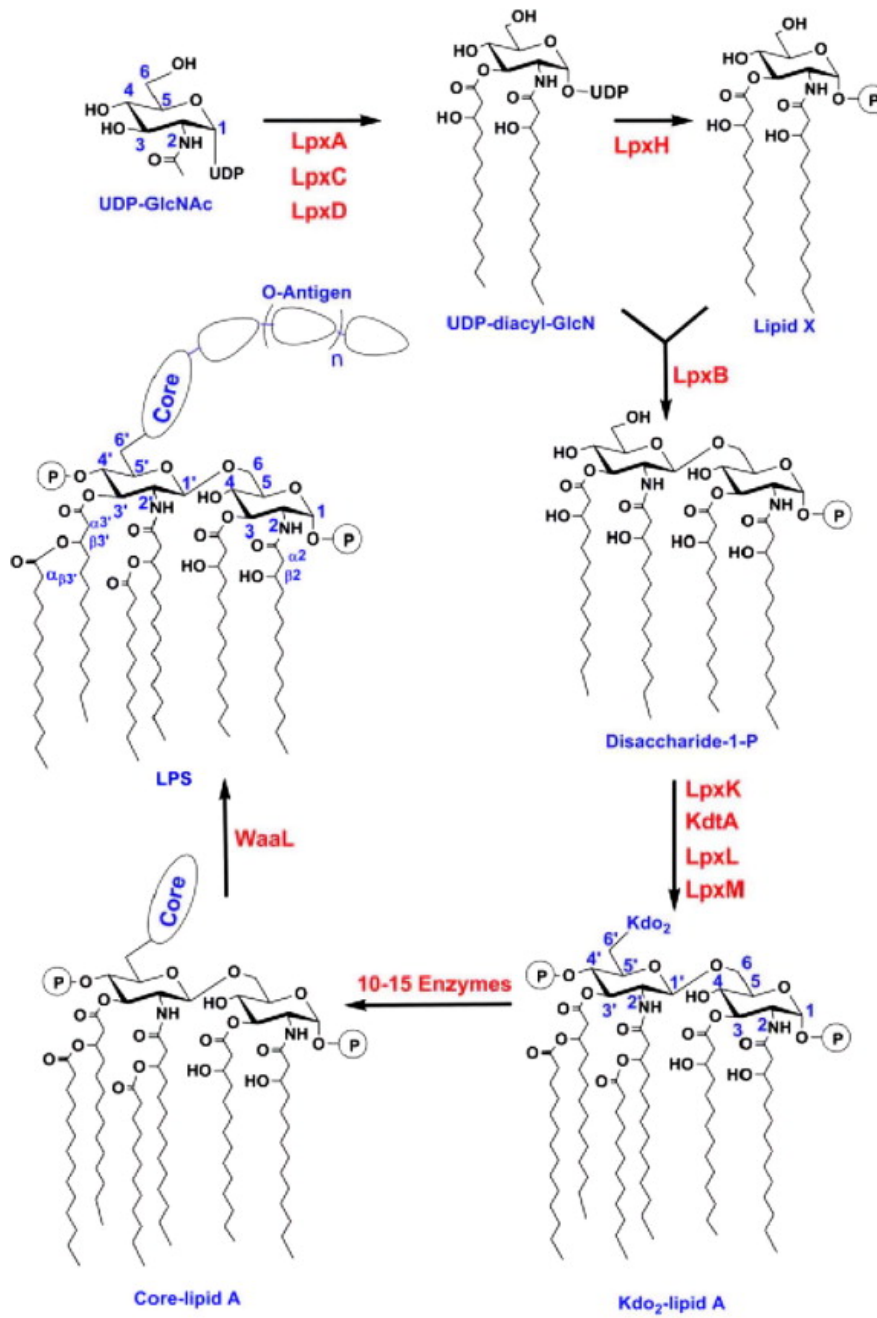


Figure 25 Voie de synthèse des LPS, en utilisant *E. coli* comme modèle pour représenter sa biogenèse.

Tiré de Wang & Quinn, 2010.

Tableau 8 Enzymes nécessaires à la biosynthèse du lipide A. Tableau modifié d'après Wang & Quinn, 2010

Enzymes	Gènes	Fonction
LpxA	<i>lpxA</i>	LpxA catalyse l'acylation grasse de l'UDP-GlcNAc. Il nécessite la protéine porteuse thioester R-3-hydroxymyristoyl acyle comme donneur
LpxC	<i>lpxC</i>	LpxC catalyse la désacétylation de l'UDP-3-O-(acyl)-GlcNAc qui est l'étape réellement engagée de la biosynthèse des lipides A
LpxD	<i>lpxD</i>	LpxD ajoute une deuxième chaîne R-3-hydroxymyristate pour fabriquer l'UDP-2,3-diacyl-GlcN
LpxH	<i>lpxH</i>	LpxH clive la liaison pyrophosphate de l'UDP-2,3-diacyl-GlcN pour former le lipide X
LpxB	<i>lpxB</i>	LpxB condense l'UDP-2,3-diacyl-GlcN avec le lipide X pour former la liaison 1'-6 dans le lipide A
LpxK	<i>lpxK</i>	LpxK phosphoryle la position 4' du disaccharide 1-phosphate généré par LpxB pour former le lipide IV _A
KdtA	<i>kdtA</i>	KdtA incorpore deux résidus Kdo en position 6' du lipide IV _A
LpxL	<i>lpxL</i>	LpxL ajoute un résidu lauroyle secondaire à la chaîne d'acide gras en position 2' du lipide A. Il préfère les donneurs d'acyl-ACP
LpxM	<i>lpxM</i>	LpxM ajoute un résidu lauroyle secondaire à la chaîne d'acide gras en position 3' du lipide A. Il préfère les donneurs d'acyl-ACP

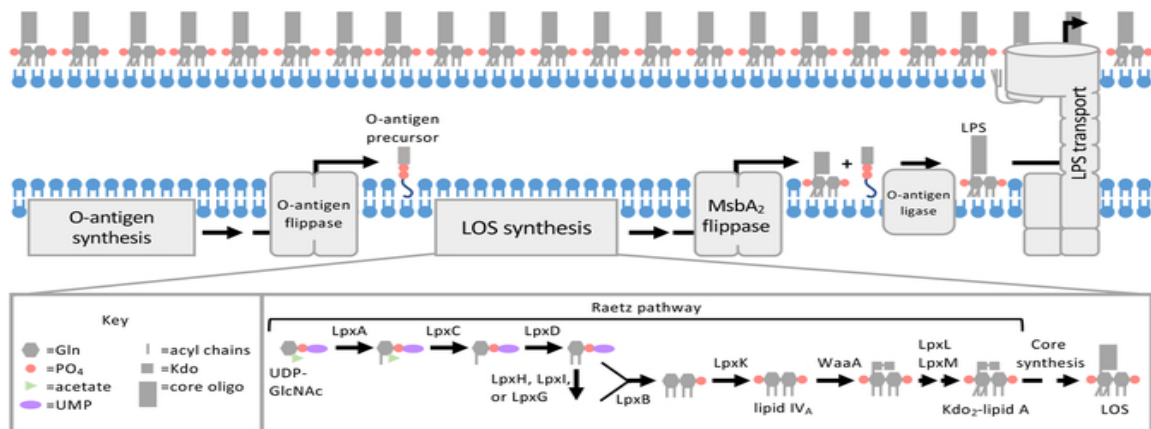


Figure 26 Ajout de l'antigène O pour former le lipopolysaccharide. Tiré de Simpson & Trent, 2019. D'après Brozken *et al.*, 1989.

L'antigène O est synthétisé sur la surface cytoplasmique de la membrane interne. Les gènes *rfb* d'*E. coli* et de *Salmonella* sont responsables de la synthèse des sucres de l'antigène O et les glycosyltransférases sont responsables de leur assemblage et de leur transfert à travers la membrane interne (Raetz & Whitfield, 2002). La structure résultante peut être homopolymérique ou hétéropolymérique, la liaison des unités peut être linéaire ou ramifiée, et chaque structure unitaire peut différer par le type de monomère, la position et la stéréochimie des liaisons O-glycosidiques. Après la synthèse, le lipide central A et le O-antigène sont transportés (**Table 9**) vers le périplasma de la membrane interne, où le O-antigène est polymérisé par *Wzy* et *Wzz* et lié au lipide central A par *WaaL*, ce qui donne un LPS naissant (**Figure 27**) (Abeyrathne *et al.*, 2005).

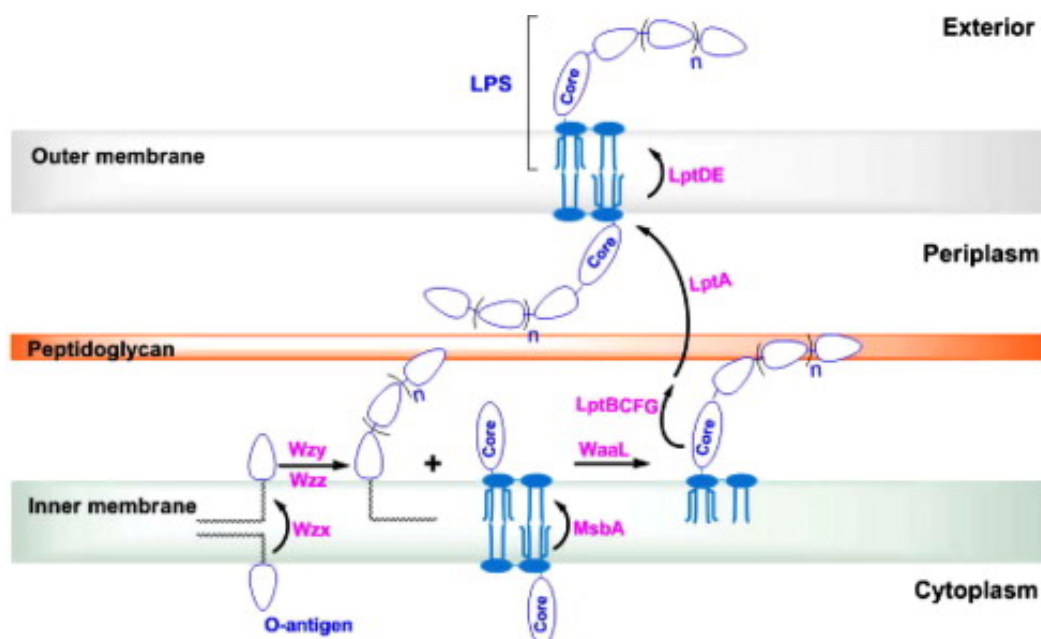


Figure 27 Étape 2 de la biosynthèse et de l'exportation des LPS et de leurs précurseurs en utilisant *E. coli* comme modèle de référence. D'après Abeyrathne *et al.*, 2005.

Tableau 9 Enzymes impliquées dans le transport du LPS et de ses précurseurs. Tableau modifié d'après Wang & Quinn, 2010

Enzymes	Gènes	Fonction
MsbA	msbA	MsbA est un transporteur ABC essentiel. Il exporte le noyau-lipide A de la face cytoplasmique vers la face périplasmique de la membrane interne
Wzx	wzx	Wzx exporte l'antigène O-phosphate d'undécoprénol de la face cytoplasmique vers la face périplasmique de la membrane interne
LptA	<i>lptA</i>	LptA est une protéine périplasmique nécessaire au transport du LPS à travers le périplasme
LptB	<i>lptB</i>	LptB est une protéine cytoplasmique associée à la membrane interne. Il est nécessaire au transport du LPS à travers le périplasme
LptC	<i>lptC</i>	LptC est une protéine de la membrane interne nécessaire au transport du LPS à travers le périplasme

LptD	<i>lptD</i>	LptD est une protéine essentielle de la membrane externe du barillet β . Il est nécessaire pour l'assemblage du LPS à la surface externe de la membrane externe
LptE	<i>lptE</i>	LptE est une lipoprotéine essentielle de la membrane externe. Il est nécessaire pour l'assemblage du LPS à la surface externe de la membrane externe
LptF	<i>lptF</i>	Le LptF est une protéine de la membrane interne nécessaire au transport du LPS à travers le périplasma
LptG	<i>lptG</i>	Le LptG est une protéine de la membrane interne nécessaire au transport du LPS à travers le périplasma

7.5 Modifications

Les bactéries à Gram-négatif n'ont pas seulement développé une extraordinaire voie de synthèse et de transport des LPS, elles ont également mis au point de nombreuses stratégies de modification de leurs LPS, ce qui est associé à la survie des bactéries car ces modifications peuvent modifier la composition de la membrane cellulaire, ce qui leur permet de résister aux changements de leur environnement et de l'hôte, En ce sens, la modification de la structure des lipides A les aide à résister aux peptides antimicrobiens cationiques (Cationic Antimicrobial Peptides ou CAMPs en anglais) libérés par le système immunitaire de l'hôte et les modifications les aident également à échapper à la reconnaissance par le récepteur TLR4, un récepteur de la réponse immunitaire innée. Les principales enzymes impliquées dans les modifications covalentes des lipides A sont présentées dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 Enzymes impliquées dans la modification structurale du lipide A chez les bactéries à Gram-négatif. Tableau modifié d'après Wang & Quinn, 2010

Enzymes	Gènes	Fonction
LpxE	<i>lpxE</i>	LpxE supprime le groupe phosphate de la position 1 du lipide A
LpxF	<i>lpxF</i>	LpxF supprime le groupe phosphate de la position 4' du lipide A
LpxO	<i>lpxO</i>	LpxO ajoute un groupe OH en position $\alpha_{\beta 3}$
ArnT	<i>arnT</i>	ArnT transfère l'unité L -Ara4N au lipide A
LpxR	<i>lpxR</i>	LpxR catalyse l'élimination de la fraction 3'-acyloxyacycle
PagL	<i>pagL</i>	PagL élimine la chaîne acyle liée en 3-O du lipide A
PagP	<i>pagP</i>	PagP transfère un palmitate des glycérophospholipides vers la position 2 du lipide A
pmrC	<i>pmrC</i>	PmrC ajoute une phosphoéthanolamine en position 1 du lipide A
LpxXL	<i>lpxXL</i>	LpxXL ajoute une très longue chaîne d'acides gras en position β_2
LpxT	<i>lpxT</i>	LpxT transfère un groupe phosphate au 1-phosphate du lipide A
LpxQ	<i>lpxQ</i>	<i>lpxQ</i> oxyde la glucosamine proximale du lipide A pour former une unité aminogluconate
LmtA	<i>lmtA</i>	LmtA catalyse la méthylation du 1-phosphate du lipide A

Récemment, il a été signalé que la régulation des modifications au niveau de la structure des lipides A est sous le contrôle du système à deux composants PhoO-PhoQ (**Figure 28**), ainsi que du système PmrA-PmrB (Guo *et al.*, 1997 ; Groisman *et al.*, 2021). Le premier est un système qui contrôle la virulence, sert de médiateur à l'adaptation à l'environnement et régule de nombreuses activités chez les bactéries à Gram-négatif (Soncini *et al.*, 1996 ; Groisman, 2001), et l'activation de ce système peut entraîner l'activation ou la répression de plus de 40 gènes (Gooderham & Hancock 2009). Dans le cas du second système, PmrA, l'exemple le plus clair est la régulation de l'opéron *arn* (**Figure 29**) (Gunn *et al.*, 1988) qui incorpore un 4-amino-4-désoxy- α -L-arabinose (α -L-Ara4N) dans le lipide A (**Figure 30**) (Raetz *et al.*, 2018 ; Breazeale *et al.*, 2003).

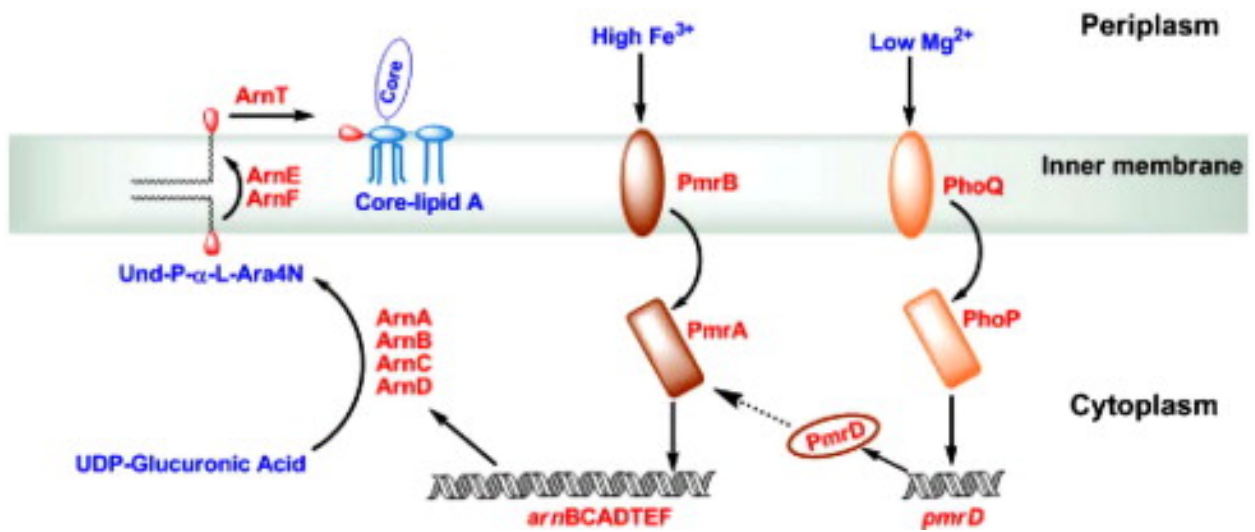


Figure 28 System à deux composants PhoP-PhoQ et PmrA-PmrB responsables des modifications du LPS. Tiré de Wang & Quinn, 2010

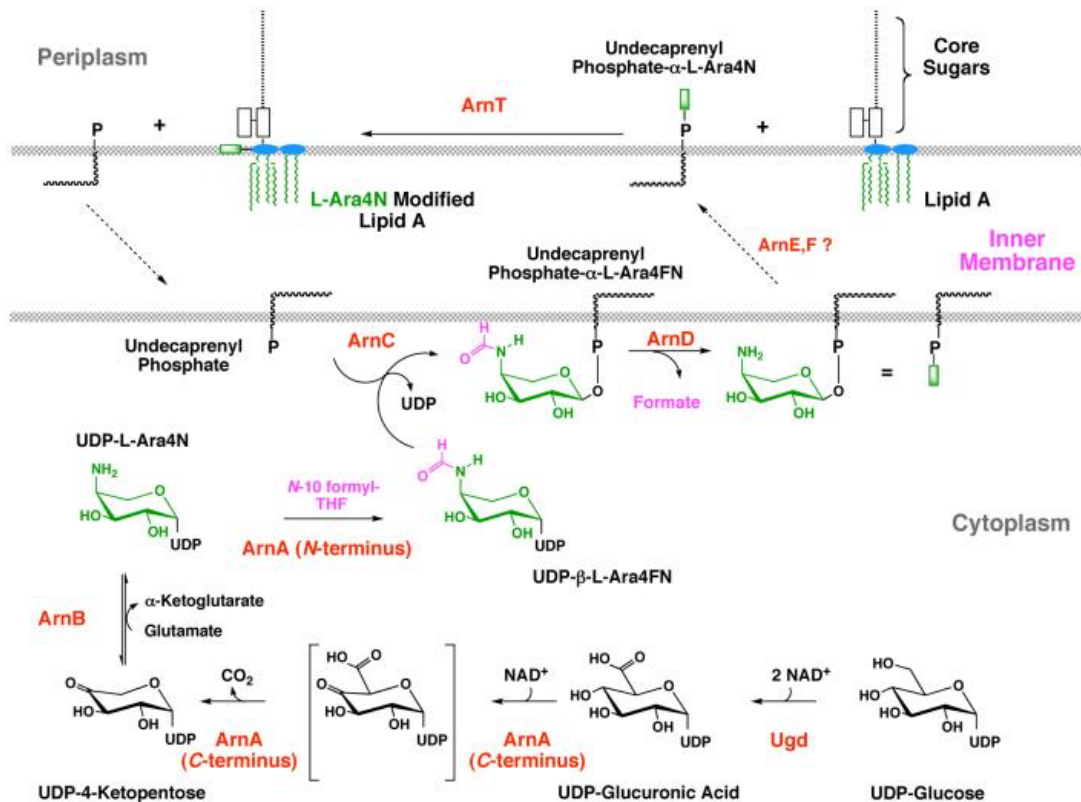


Figure 29 La formation de la fraction L-Ara4N commence par l'oxydation de l'UDP-glucose en acide UDP-glucuronique. Tiré de Raetz *et al.*, 2007

À ce jour, on a décrit quatre enzymes qui interviennent dans la modification des chaînes d'acides gras du lipide A, à savoir PgaP, PagL, LpxR et LpxO. La première d'entre elles, PagP, est une palmitoyl transférase qui transfère un palmitate au lipide A, résultant en une structure heptaacylée (Ahn *et al.*, 2004). La PagP est régulée par le système PhoP-PhoQ et confère une résistance aux CAMPs chez *Salmonella*, elle a également été caractérisée chez *E. coli* (Hwang *et al.*, 2004 ; Bishop, 2008).

La PagL est une lipase qui élimine la chaîne acyle liée en 3-O du lipide A, mais elle ne confère pas la même résistance aux CAMPs que la PagP (Kawasaki *et al.*, 2004).

LpxR est une autre enzyme qui élimine le résidu 3'-acyloxyacyl du lipide A de *Salmonella* (Reynolds *et al.*, 2006), des orthologues du gène *lpxR* existent dans plusieurs bactéries à Gram-négatif comme *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157 : H7 et *Vibrio cholerae*. LpxR n'est pas régulé par le système PhoP-PhoQ et nécessite du Ca²⁺ pour son activité enzymatique (Reynolds *et al.*, 2006).

Le gène *lpxO* (909 pb) code pour une protéine de 302 acides aminés dont la séquence est similaire à celle de l'aspartyl/asparaginyl β -hydroxylase des mammifères, une dioxygénase dépendante du Fe²⁺/ketoglutarate, et présente des similitudes avec d'autres gènes responsables de la modification des lipides A de certains pathogènes tels que *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila* et *Salmonella*. LpxO est une protéine de la membrane interne qui peut générer un 2-OH à la position 3' du lipide A de *Salmonella* (Gibbons *et al.*, 2000, 2008). Cette hydroxylation est indépendante du transport de MsbA et n'est pas régulée par les systèmes PhoP-PhoQ ou PmrA-PmrB. Enfin, les modifications spécifiques du lipide A sont présentées dans la **Figure 30**.

7.5.1 2-hydroxylation d'un acide gras

Comme mentionné ci-dessus, LpxO est une enzyme de la membrane interne sensible au stress (**Figure 31**) qui hydroxyle la chaîne latérale 3' myristoyle du Kdo₂-lipide A en présence de O₂ en utilisant Fe²⁺ et le α -ketoglutarate comme cofacteurs (Gibbons *et al.*, 2000, 2008) générant du -2-hydroxymyristate (2HM). Les études sur le rôle de cette modification dans la virulence sont rares (Fernandez *et al.*, 2018). Cependant, on sait que l'expression de cette protéine et un niveau approprié d'hydroxylation des lipides A sont cruciaux pour la réplication de *S. Typhimurium* dans les macrophages et pour la colonisation systémique chez la souris (Moreira *et al.*, 2013) en plus de la réduction de la réponse inflammatoire observée chez *Klebsiella pneumoniae* (Llobet *et al.*, 2015). Récemment, il a été démontré que la régulation de LpxO est médiée par Fnr et ArcA (**Figure 31**) (Fernandez *et al.*, 2018).

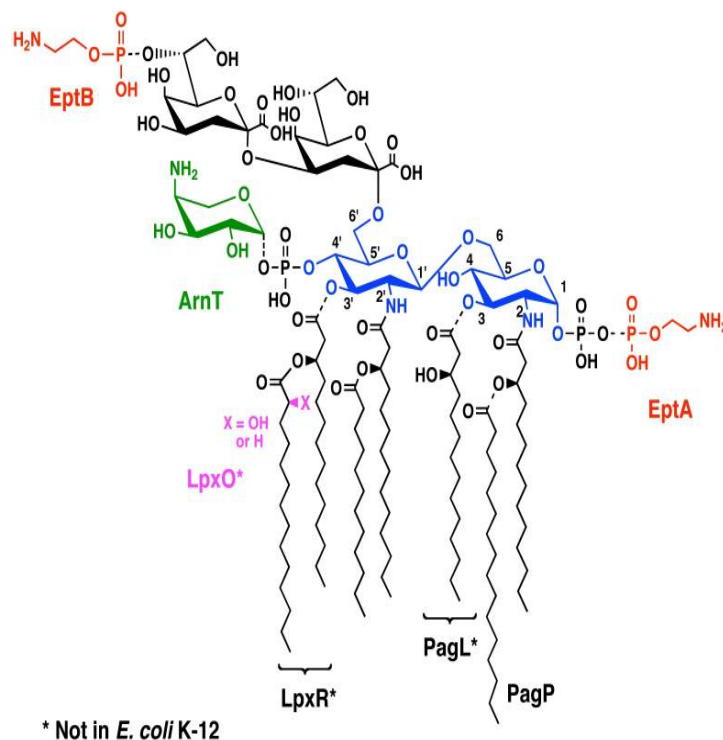


Figure 30 Principales modifications covalentes du Kdo₂-lipide A chez *E. coli* K-12 et *Salmonella* comme référence pour les modifications du LPS chez les bactéries à Gram-négatif. Tiré de Raetz *et al.*, 2007

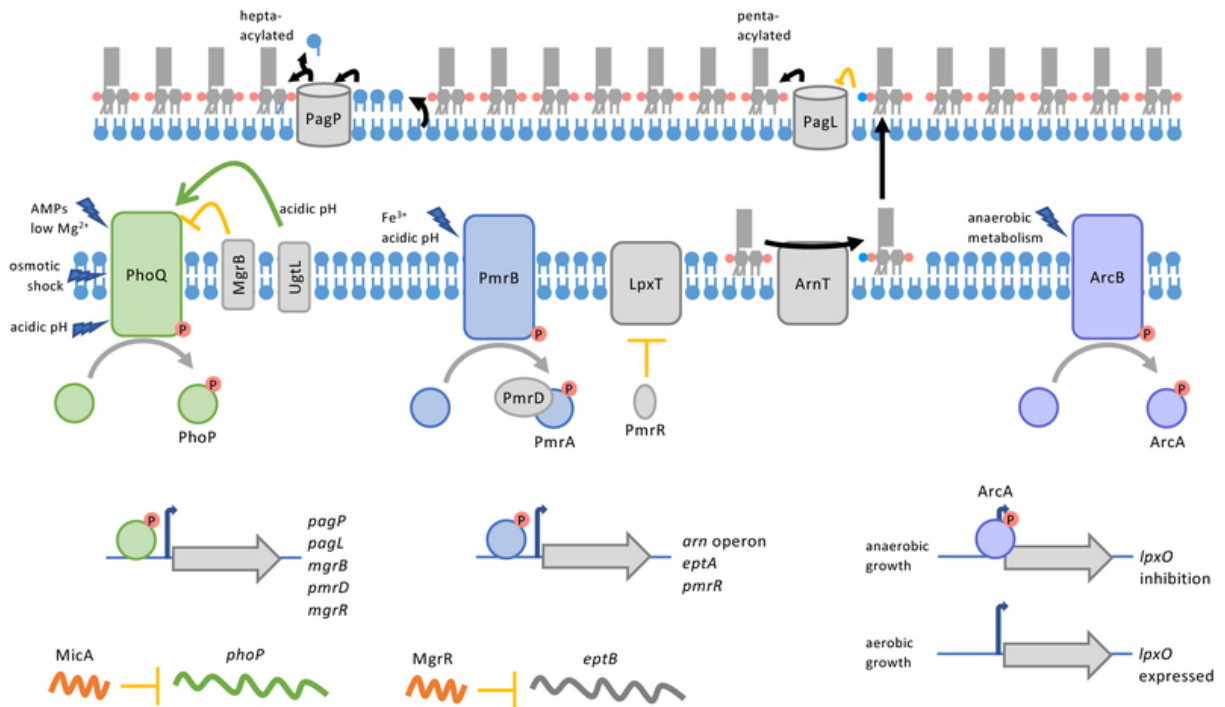


Figure 31 Régulation des enzymes de modification du LPS chez *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. Fnr et ArcA régulent l'hydroxylation des lipides A chez *Salmonella* en contrôlant l'expression de *lpxO* en réponse à la disponibilité de l'oxygène. Tiré de Fernandez *et al.*, 2018

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Contexte

L'hôpital Antoine Béchère est un établissement public appartenant à l'AP-HP (Assistance Publique - Hôpitaux de Paris), Groupe Hospitalier Universitaire (GHU) qui accueille environ 8,3 millions de patients chaque année. L'hôpital Antoine Béchère dispose d'une réanimation néonatale (RNN) adossée à une maternité de niveau III qui reçoit de nombreux nouveau-nés prématurés tout au long de l'année. C'est un hôpital d'enseignement et de recherche rattaché à l'Université Paris-Saclay. Le service de bactériologie-hygiène, quant à lui, assure le suivi microbiologique des nouveau-nés dont ceux admis en RNN, ainsi que la prévention et le contrôle des foyers épidémiques. Fin 2015, une augmentation du nombre de bactériémies à *Enterobacter* a été observée en RNN. Immédiatement après l'identification du début de cette épidémie, les mesures de prévention des infections associées aux soins ont été renforcées et un plan d'action visant à rechercher le réservoir primaire a été mis en place. À cette fin, des prélèvements de surface ont été initiés et tous les nouveau-nés admis en réanimation néonatale ont fait l'objet d'un dépistage pour la recherche d'*Enterobacter* spp.

Le taux de mortalité élevé associé au sepsis (70 %) et l'absence du profil classique de multirésistance observé dans d'autres études ont suggéré l'existence d'un profil de virulence particulier. La première difficulté majeure à laquelle l'unité de recherche a été confrontée, a été l'identification précise des espèces au sein du genre *Enterobacter*, car comme mentionné dans la section d'introduction de ce manuscrit, sa taxonomie a subi de nombreux changements au cours des 50 dernières années. Actuellement, il existe encore une ambiguïté pour l'identification des isolats par MALDI-TOF, la méthode la plus utilisée en routine pour l'identification des microorganismes au niveau de l'espèce dans la pratique clinique. Ainsi, l'intérêt est né d'approfondir les connaissances sur l'identification des espèces au sein du genre *Enterobacter* et d'étudier l'hypothèse selon laquelle certaines modifications au niveau du LPS étaient directement reliées à la gravité de la bactériémie chez les nouveau-nés.

Objectif

L'objectif de cette thèse était l'identification de marqueurs microbiologiques et épidémiologiques spécifiques des souches d'*Enterobacter* spp. responsables de bactériémies chez les prématurés en RNN.

La première partie de mon travail a consisté à développer une méthodologie moléculaire permettant l'identification précise au niveau de l'espèce des bactéries du genre *Enterobacter*, en raison de sa taxonomie complexe et de l'absence de méthodes fiables en dehors du séquençage du génome entier. Je présente, en tant que premier auteur, un premier article publié dans le journal ***Microbiology Spectrum*** de l'American Society for Microbiology (ASM) en 2021 intitulé : « ***dnaJ: a new approach to identify species within the genus Enterobacter*** ».

La deuxième partie s'intéresse aux mesures de gestion et de contrôle de l'épidémie de bactériémies à *Enterobacter* chez des nouveau-nés prématurés en utilisant le séquençage du génome entier pour caractériser le contenu génétique des souches et fournir une compréhension de la dynamique épidémiologique de l'épidémie. Je présente, en tant que première auteur, un deuxième article publié dans le journal ***Microbiology Spectrum*** de l'American Society for Microbiology (ASM) en 2022, intitulé : « ***Contaminated incubators: Source of a multispecies Enterobacter outbreak of neonatal sepsis*** ».

La troisième partie consiste en la recherche et l'analyse de marqueurs de virulence associés à la sévérité du sepsis. Nous présentons deux articles. Un premier article (manuscrit en préparation pour le journal **mBio**), en tant que premier auteur, est intitulé : « ***Comparative analysis of Enterobacter bugandensis genomes reveals lineage-specific gene differences and evidence their high virulence*** ». Cet article est également complété avec l'analyse phénotypique et génotypique du résistome

dans les souches SENSE. Enfin, je présente un deuxième article, en tant que co-auteur, publié dans la revue **iScience** de Cell Press en 2021, intitulé : « ***Presence of 2-hydroxymyristate on endotoxins is associated with death in neonates with Enterobacter cloacae complex septic shock*** ». Cet article est supplémenté avec la construction d'un mutant LpxO.

TRAVAUX PERSONNELS

PREMIER ARTICLE

dnaJ: A New Approach to Identify Species within the Genus *Enterobacter*

Enrique Hernandez-Alonso, Simon Barreault, Luis Augusto, Pierre Jatteau, Millie Villet, Pierre Tissieres, Florence Doucet-Populaire, Nadege Bourgeois-Nicolaos, on behalf of the SENSE Group

Microbiol Spectr. 2021 Dec 22;9(3):e0124221. doi: 10.1128/Spectrum.01242-21. Epub 2021 Dec 22

Contexte

L'un des plus grands défis de la microbiologie est l'identification rapide et opportune des espèces impliquées dans un processus infectieux afin d'adapter le traitement du patient pour vaincre l'infection. Au fil du temps, diverses techniques et méthodes ont été développées pour l'identification microbienne. Cependant, même aujourd'hui, il existe encore des genres microbiens pour lesquels l'identification précise des espèces reste un défi. Dans ce contexte, le genre *Enterobacter* est l'un d'entre eux. En outre, différentes stratégies d'identification ont été développées et, jusqu'à présent, le meilleur schéma d'identification est celui proposé par Hoffmann et ses collègues en 2003, qui utilise la protéine de choc thermique Hsp60. Toutefois, ce schéma classe les espèces en groupes (Clusters) et certaines espèces sont mal classées et deux sous-espèces peuvent partager le même cluster. Voici quelques-unes des questions qui ont conditionné l'élaboration du premier article :

- Existe-t-il une alternative à Hsp60 pour l'identification rapide et précise des 22 espèces du genre *Enterobacter* ?
- Quel est l'impact clinique des espèces d'*Enterobacter* ?
- L'identification précise des espèces est-elle possible sans l'utilisation du génome complet qui peut être réalisé en pratique clinique ?

L'objectif général de l'article est d'optimiser des techniques couramment utilisées comme la PCR et le séquençage d'amplicons pour permettre une identification au niveau de l'espèce validée par le séquençage du génome entier. Dans ce manuscrit, nous avons dans un premier temps réalisé l'évaluation de la polymorphie de la protéine de choc thermique DnaJ également connue sous le nom de Hsp40. Les résultats ont montré que ce polymorphisme est conservé au sein des espèces. Dans un deuxième

temps, une PCR a été conçue à l'aide d'oligonucléotides dégénérés pour amplifier une séquence spécifique du gène *dnaJ* en vue d'un séquençage ultérieur par la méthode Sanger. Une analyse phylogénétique des séquences extraites des souches de référence (ATCC) a montré une bonne discrimination permettant de différencier les différentes espèces au sein du genre. La technique a été validée en utilisant 100 génomes déposés dans les bases de données. Enfin, notre méthode a été validée sur des souches d'*Enterobacter* responsables de sepsis nosocomiaux en RNN, provenant d'une cohorte rétrospective multicentrique (cohorte SENSE) séquencés par WGS.

En résumé, cet article propose une nouvelle approche pour l'identification rapide et précise des espèces du genre *Enterobacter* dans la pratique clinique, basée sur le séquençage partiel du gène *dnaJ* préalablement amplifié par PCR.



dnaJ: a New Approach to Identify Species within the Genus *Enterobacter*

Enrique Hernandez-Alonso,^{a,b} Simon Barreault,^{a,c} Luis A. Augusto,^a Pierre Jatteau,^b Millie Villet,^b Pierre Tissieres,^{a,c,d}
 Florence Doucet-Populaire,^{a,b} Nadege Bourgeois-Nicolaos^{a,b} on behalf of the SENSE Group

^aUniversité Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-sur-Yvette, France

^bDepartment of Bacteriology-Hygiene, AP-HP Université Paris-Saclay, Antoine Beclere Hospital, Clamart, France

^cDepartment of Pediatrics Intensive Care and Neonatal Medicine, AP-HP Université Paris-Saclay, Bicêtre Hospital, Paris, France

^dFHU Sepsis, AP-HP/Université Paris-Saclay/Inserm, Le Kremlin-Bicêtre, France

ABSTRACT The taxonomy of the genus *Enterobacter* can be confusing and has been considerably revised in recent years. We propose a PCR and amplicon sequencing technique based on a partial sequence of the *dnaJ* gene for species assignment consistent with DNA-DNA digital hybridization (dDDH) and pairwise average nucleotide identity (ANI). We performed a validation of the method by comparing the type strains of each species, sequences obtained from the GenBank database, and clinical specimens. Our results show that the polymorphism of the target sequence of *dnaJ* allows the identification of species. Using this gene, we assigned the species to 100 strains deposited in the GenBank database that were consistent with the species assignment by dDDH and ANI. The analysis showed that using the partial *dnaJ* sequence is congruent with WGS as far as correct identification of *Enterobacter* species is concerned. Finally, we applied our *dnaJ* method on a national collection of 68 strains identified as *Enterobacter* isolated from the blood cultures of premature babies using an algorithm based on a type-strain library and the SeqScape software. For the first time, we identified *Enterobacter quasihormaechei* in blood cultures from four neonatal sepsis cases. We also noticed a higher prevalence of *E. bugandensis* (36.3%; 32/88) and *E. xiangfangensis* (46.5%; 41/88). *E. bugandensis* is a novel species recently described specifically in instances of neonatal sepsis. In conclusion, sequencing a part of the *dnaJ* gene could be a quick, more economical, and highly discriminating method of identifying *Enterobacter* species in clinical practice and research.

IMPORTANCE We propose a new approach for *Enterobacter* species identification based on the diversity of the gene encoding the heat shock protein DnaJ. This new tool can be easily implemented in clinical laboratories in addition to identification by MALDI-TOF.

KEYWORDS *Enterobacter bugandensis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter quasihormaechei*, *Enterobacter*, SeqScape software, *dnaJ* gene, gene PCR-sequencing, neonates, sepsis, species identification

Enterobacter species are increasingly involved in human infections particularly among critically ill patients with sepsis. The incidence of these often-nosocomial infections is particularly high in neonatology where they are facilitated by immune incompetence linked to the immaturity of premature infants. (1, 2). The taxonomy of the genus *Enterobacter* has been reevaluated in the last 10 years. Some species have been reclassified into other genera such as *Enterobacter aerogenes* which has been moved to the genus *Klebsiella* (3). Recently, Wu et al. suggested that *Enterobacter timonensis* should have been moved to a new genus called *Pseudenterobacter* (4). Moreover, the concept of subspecies in the genus *Enterobacter* has been a source of confusion and is no longer recommended (4). In recent years the use of tools such as digital DNA-DNA hybridization (dDDH) and pairwise average nucleotide identity (ANI) have allowed a more accurate classification of this genus. In particular, the

Editor N. Esther Babady, Memorial Sloan Kettering Cancer Center

Copyright © 2021 Hernandez-Alonso et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Florence Doucet-Populaire, florence.doucet-populaire@universite-paris-saclay.fr.

The authors declare no conflict of interest.

Received 11 August 2021

Accepted 19 November 2021

Published 22 December 2021

DNA-DNA hybridization (DDH) 70% cutoff is now regarded as the “gold standard” for species delineation (5). In practice, thresholds of 96.0% or 70.0% with ANI and dDDH (comparable with DDH for all intents and purposes) have been used, respectively, for species identification using Whole-Genome Sequencing (WGS) (6). The most recent taxonomic study of the genus *Enterobacter* according to the overall genome relatedness index (OGRI) using dDDH and ANI values between the type strains showed that *E. dissolvens*, *E. hoffmannii*, *E. hormaechei*, and *E. xiangfangensis* are independent species. Furthermore, *E. hormaechei* subsp. *oharae* and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* have been reclassified as *E. xiangfangensis* (4). Nowadays, the genus *Enterobacter* consists of 22 species (Table 1). In a recent study Wu et al. showed that *E. asburiae*, *E. bugandensis*, *E. cancerogenus*, *E. chengduensis*, *E. cloacae*, *E. hoffmannii*, *E. huaxiensis*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. quasiroggenkampii*, *E. roggkampii*, and *E. xiangfangensis* are frequently isolated from blood cultures (4).

Correct species identification within the genus *Enterobacter* is still a challenge. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrum (MALDI-TOF MS) is the major tool used in clinical laboratories for bacterial identification. However, species identification using MALDI-TOF MS may have its limits (7). In clinical laboratories, tests based on the phenotype and the MALDI-TOF MS usually identify *Enterobacter* isolates as *E. cloacae*, thereby neglecting the clinical importance of other species in the hospital environment (8). Nevertheless, a correct identification on the species-level is crucial for epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment, prognosis, and prevention (9, 10). According to Wu et al.’s precise species study, among the 1,960 *Enterobacter* strains submitted in the GenBank, only 80 (14.8%) of the 540 genomes labeled *E. cloacae* actually belonged to these species (4). Several other species of the genus *Enterobacter* have also been associated with infections, particularly *E. bugandensis* in neonatal sepsis (11).

Although the WGS allows correct identification on the species-level, this tool is still far from routine in clinical practice. It requires highly trained personnel for data assembly and analysis, in addition to being too expensive to use in many countries. Faster and more affordable methods of the species identification correlated with WGS as regards to species identification, are essential in clinical microbiology.

The *dnaJ* housekeeping gene that encodes the heat shock protein 40 (Hsp40) has been shown to have a high discriminating power in *Enterobacterales* showing better resolution than 16S rRNA, *tuf*, *hsp60*, or *atpD* (12, 13). The *dnaJ* gene contains an immutable sequence within each species of the genus *Enterobacter* that can be used for accurate identification (14, 15).

In this study, we propose a PCR and amplicon sequencing method to correctly identify species within the genus *Enterobacter* using a partial sequence of the *dnaJ* gene. Our method provides a highly discriminating tool in clinical practice.

RESULTS

***dnaJ* polymorphism analysis in *Enterobacter* type strains.** The genomes of the 22 type strains were obtained from GenBank (Table 1). We extracted the partial sequence of the *dnaJ* gene from position 385 to 1098 (714 bp), a region previously described for the analysis of species in *Enterobacterales* (14). The DNA fragment is characterized by the presence of two highly variable regions but identical within the same species (positions 541 to 558 and positions 1009 to 1027). We performed the alignment of the 22 sequences of the type strains. The polymorphism within the sequence was visually inspected (Fig. 1). Visual analysis showed a variation from 3.8% to 19.3% (corresponding to 27–138 different nucleotides). Using the alignment of the partial sequences of the *dnaJ* gene of the 22 type strains, we identified a percentage of similarity ranging from 87.8% to 95.9% (Table S1). The phylogenetic tree based on the target sequence of the *dnaJ* gene showed that each species of the genus forms an independent branch separated from the others that allows for species discrimination (Fig. 2). In addition, we determined the synonymous and nonsynonymous substitutions for a better understanding of the evolutive molecular dynamics of the sequence (Table 1). In all type strains, the d_N/d_S ratio was well below 1, clearly indicating a negative selection.

***In silico* validation of species-level identification using *dnaJ*.** We downloaded the genome of the 100 *Enterobacter* strains of interest that were taxonomically corrected in

TABLE 1 Classification of the 22 type strains of the genus *Enterobacter* used in this study

Species (n = 22)	Accession	Type strain	Substitution rates ^a
<i>Enterobacter asburiae</i>	CP011863.1	JCM 6051	S = 183.3 N = 530.7 $d_s = 0.2624$ $d_N = 0.0039$ $d_N/d_s = 0.0147$
<i>Enterobacter bugandensis</i>	LT992502.1	EB-247	S = 187.8 N = 526.2 $d_s = 0.2265$ $d_N = 0.0019$ $d_N/d_s = 0.0086$
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	ERR1854846	ATCC 35316	S = 190.2 N = 523.8 $d_s = 0.3061$ $d_N = 0.0098$ $d_N/d_s = 0.0322$
<i>Enterobacter chengduensis</i>	CP043318.1	WCHECI-C4	S = 175.8 N = 538.2 $d_s = 0.2814$ $d_N = 0.0038$ $d_N/d_s = 0.0136$
<i>Enterobacter chuandaensis</i>	GCF_003594915.1	090028	S = 213.6 N = 500.4 $d_s = 0.2007$ $d_N = 0.0021$ $d_N/d_s = 0.0103$
<i>Enterobacter cloacae</i>	CP001918.1	ATCC 13047	S = 186.7 N = 527.3 $d_s = 0.3218$ $d_N = 0.0019$ $d_N/d_s = 0.0060$
<i>Enterobacter dissolvens</i>	WJWQ01000001.1	ATCC 23373	S = 192.5 N = 521.5 $d_s = 0.3190$ $d_N = 0.0020$ $d_N/d_s = 0.0061$
<i>Enterobacter hoffmannii</i>	CP017186.1	DSM 14563	S = 180.2 N = 533.8 $d_s = 0.2423$ $d_N = 0.0019$ $d_N/d_s = 0.0079$
<i>Enterobacter hormaechei</i>	MKEQ01000001.1	ATCC 49162	S = 182.6 N = 531.4 $d_s = 0.2536$ $d_N = 0.0019$ $d_N/d_s = 0.0076$
<i>Enterobacter huaxiensis</i>	QZCT01000001.1	090008	S = 181.6 N = 532.4 $d_s = 0.3211$ $d_N = 0.0097$ $d_N/d_s = 0.0301$
<i>Enterobacter kobei</i>	CP017181.1	ATCC BAA-260	S = 189.0 N = 525.0 $d_s = 0.2929$ $d_N = 0.0019$ $d_N/d_s = 0.0066$
<i>Enterobacter ludwigii</i>	CP017279.1	EN-119	S = 185.6 N = 528.4 $d_s = 0.3056$ $d_N = 0.0039$ $d_N/d_s = 0.0126$
<i>Enterobacter mori</i>	AEXB00000000.1	LMG 25706	S = 189.0 N = 525.0

(Continued on next page)

TABLE 1 (Continued)

Species (<i>n</i> = 22)	Accession	Type strain	Substitution rates ^a
<i>Enterobacter oligotrophica</i>	AP019007.1	CCA6	$d_s = 0.1990$
			$d_N = 0.0039$
			$d_N/d_s = 0.0198$
			$S = 183.8$
			$N = 530.2$
<i>Enterobacter quasihormaechei</i>	SJON01000001.1	WCHEs120003	$d_s = 0.2296$
			$d_N = 0.0039$
			$d_N/d_s = 0.0169$
			$S = 181.4$
			$N = 532.6$
<i>Enterobacter quasimori</i>	RXRX00000000.1	090044	$d_s = 0.2401$
			$d_N = 0.0058$
			$d_N/d_s = 0.0242$
			$S = 181.1$
			$N = 532.9$
<i>Enterobacter quasiroggenkampii</i>	LFDQ00000000.2	WCHECL1060	$d_s = 0.2380$
			$d_N = 0.0019$
			$d_N/d_s = 0.0081$
			$S = 191.5$
			$N = 522.5$
<i>Enterobacter roggenkampii</i>	CP017184.1	DSM 16690	$d_s = 0.2672$
			$d_N = 0.0020$
			$d_N/d_s = 0.0074$
			$S = 191.4$
			$N = 522.6$
<i>Enterobacter sichuanensis</i>	POVL01000001.1	WCHECI1597	$d_s = 0.2424$
			$d_N = 0.0020$
			$d_N/d_s = 0.0081$
			$S = 194.7$
			$N = 519.3$
<i>Enterobacter soli</i>	LXES01000001.1	ATCC BAA-2102	$d_s = 0.3025$
			$d_N = 0.0020$
			$d_N/d_s = 0.0065$
			$S = 202.9$
			$N = 511.1$
<i>Enterobacter wuhouensis</i>	S JOO01000001.1	WCHEs120002	$d_s = 0.4126$
			$d_N = 0.0101$
			$d_N/d_s = 0.0244$
			$S = 187.3$
			$N = 526.7$
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	CP017183.1	LMG 27195	$d_s = 0.2919$
			$d_N = 0.0059$
			$d_N/d_s = 0.0201$
			$S = 191.6$
			$N = 522.4$
			$d_s = 0.1984$
			$d_N = 0.0020$
			$d_N/d_s = 0.0099$

^aThe parameters were calculated using the web server PAL2NAL (18). *S*, number of synonymous sites; *N*, number of nonsynonymous sites; d_s , synonymous substitution rate; d_N , nonsynonymous substitution rate.

2020 to determine the relationship between their genomes and that of the type strains by dDDH (Table S2). We found an interval between 74.4% and 100% as did other studies (3). Next, we extracted the 714 bp partial sequence of the *dnaJ* gene from those 100 strains and established the phylogenetic relationship in conjunction with the 22 *dnaJ* partial sequences of the type strains. The resulting phylogenetic tree showed separate branches for each species as was the case with dDDH (Fig. 3).

Species-identification using PCR and amplification sequencing of *dnaJ* is consistent with the results of the ANI and dDDH methods. First, we used the same 20 *Enterobacter* clinical strains previously sequenced by WGS in our laboratory (BioProject access number: PRJNA770343) in order to perform the PCR and amplicon sequencing of the *dnaJ* gene. After amplification, the 714 bp amplicon of each strain was sequenced, and the alignment



FIG 1 Logo plot of partial sequence of the *dnaJ* gene from position 385 to 1098 (714 bp). Sequence sets are shown relative to a *dnaJ* sequence of 22 different type strains of the genus *Enterobacter* (Table S2). The DNA fragment is characterized by the presence of two regions highly variable but conserved intraspecies (positions 541 to 558 and positions 1009 to 1027, showed by red line) described previously (14). All DNA sequences are listed 5' to 3'.

and construction of the phylogenetic tree was carried out in conjunction with the type strains. The tree shows a clear distribution of the different species based on the sequence of the *dnaJ* gene (Fig. 4). According to the results of the phylogenetic analysis, the species were assigned as *E. bugandensis*, *E. cancerogenus*, *E. cloacae*, *E. hoffmannii*, *E. quasihormaechei*, and *E. xiangfangensis* (Table 2).

Second, we used the WGS data to confirm the species using ANI and dDDH values. We identified a range from 98.4% to 99.9% and 87.0% to 96.8% for ANI and dDDH, respectively (Table 2). The results showed a correct species assignment using *dnaJ* confirmed by the ANI and dDDH methods for 100% of the strains studied.

Application of the *dnaJ* target sequencing to clinical specimens. First, to verify the usefulness of this new technique based on the PCR and amplicon sequencing of the target *dnaJ* sequence as a diagnostic tool, we retrospectively analyzed 68 blood cultures isolates (named SENSE1-68) previously identified using MALDI-TOF MS as *E.*

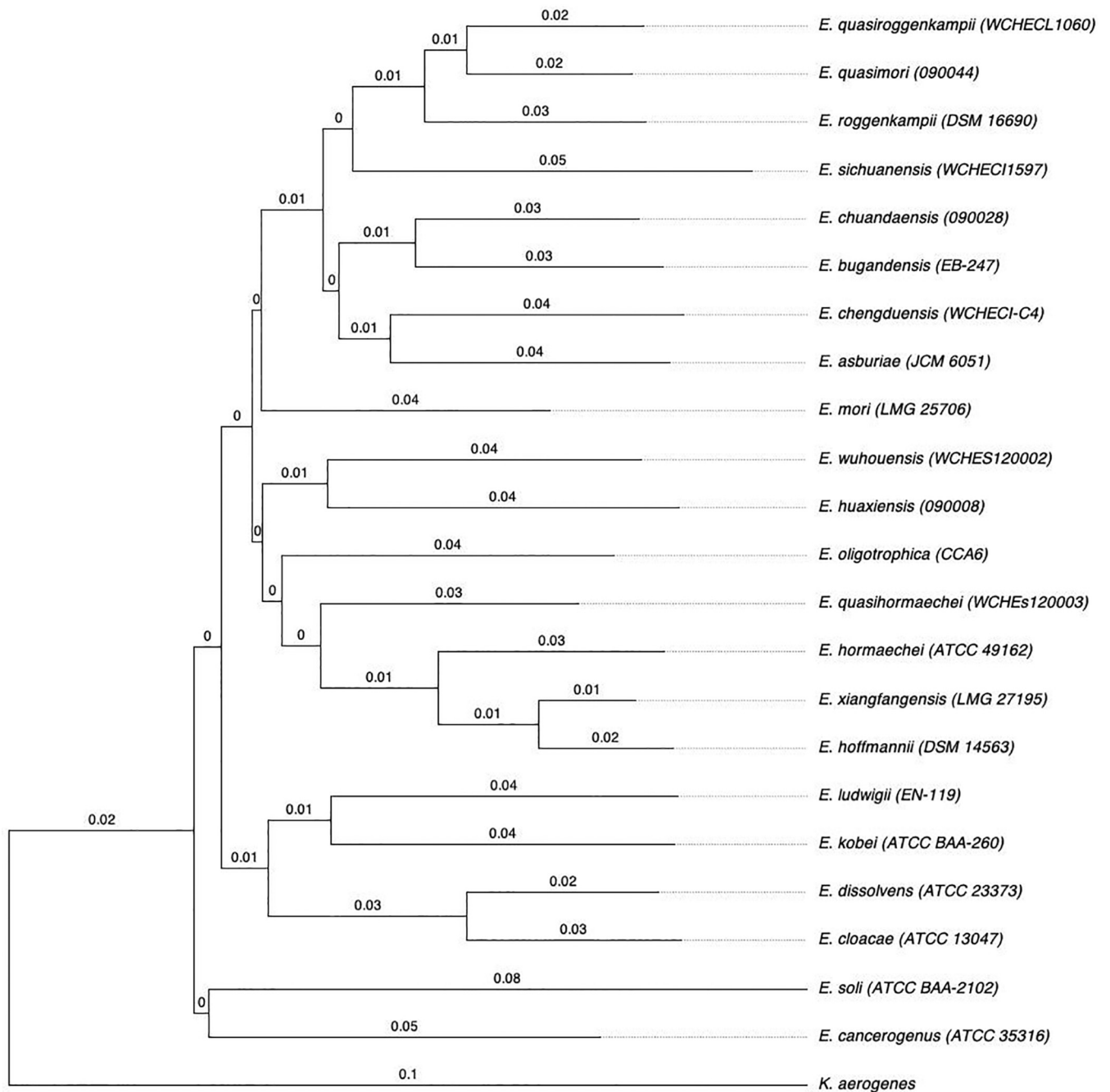


FIG 2 Molecular phylogenetic analysis of the partial sequence of the *dnaJ* gene of the type strains. The tree was inferred using the Neighbor-Joining method under the Tamura–Nei model with a 1000-bootstrap test. The analysis involved 22 partial nucleotide sequences (714 bp) of the *dnaJ* gene. The tree was rooted with the *dnaJ* sequence of *K. aerogenes* download from GenBank (AB008141.1). The *dnaJ* gene partial sequences of the type strains used are available in the Table S2.

cloacae complex. We found 9 different species: *E. bugandensis* ($n = 24$), *E. cancerogenus* ($n = 1$), *E. dissolvens* ($n = 2$), *E. hoffmannii* ($n = 7$), *E. kobei* ($n = 2$), *E. ludwigii* ($n = 1$), *E. mori* ($n = 1$), *E. quasihormaechei* ($n = 3$), and *E. xiangfangensis* ($n = 27$). The most prevalent was *E. xiangfangensis* (40.0%) followed by *E. bugandensis* (35.0%) (Fig. 5).

Second, we developed a local library using all the 22 partial sequences of *dnaJ* of the type strains in order to implement this method in the microbiology department of our hospital. This library was uploaded in the SeqScape software that provides library functions for comparison to a known group of sequences. After Sanger sequencing of partial sequence of *dnaJ* of 68 *Enterobacter* clinical strains from a national collection

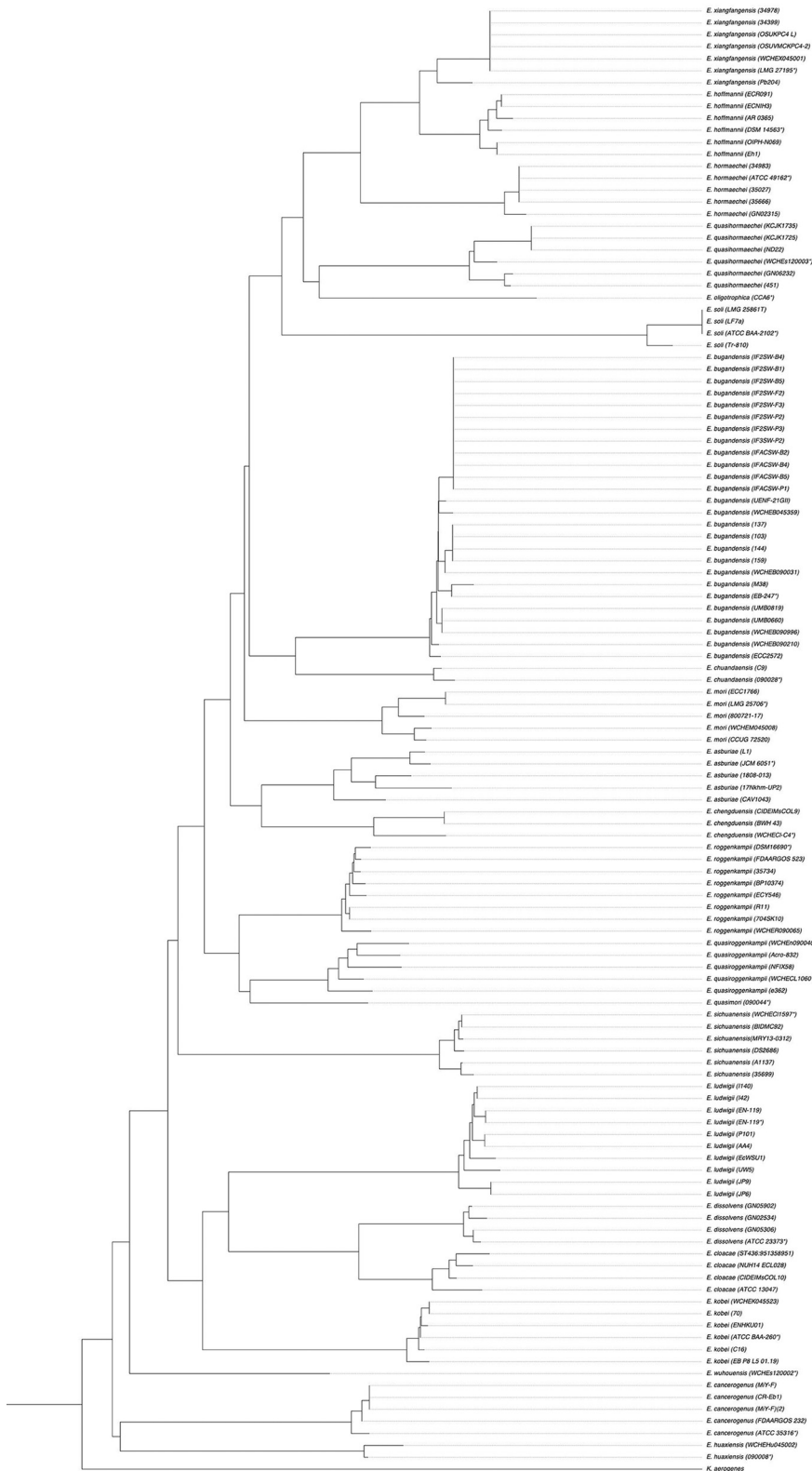


FIG 3 Molecular phylogenetic analysis of the partial sequence of the *dnaJ* gene between GenBank strains with the type strains (*). The tree was inferred using the Neighbor-Joining method under the Tamura–Nei model with a 1000-bootstrap test. The analysis involved 122 partial nucleotide sequences (714 bp) of the *dnaJ* gene. The tree was rooted with the *dnaJ* sequence of *K. aerogenes* download from GenBank (AB008141.1). All 122 *dnaJ* gene partial sequences are available in the Table S2.

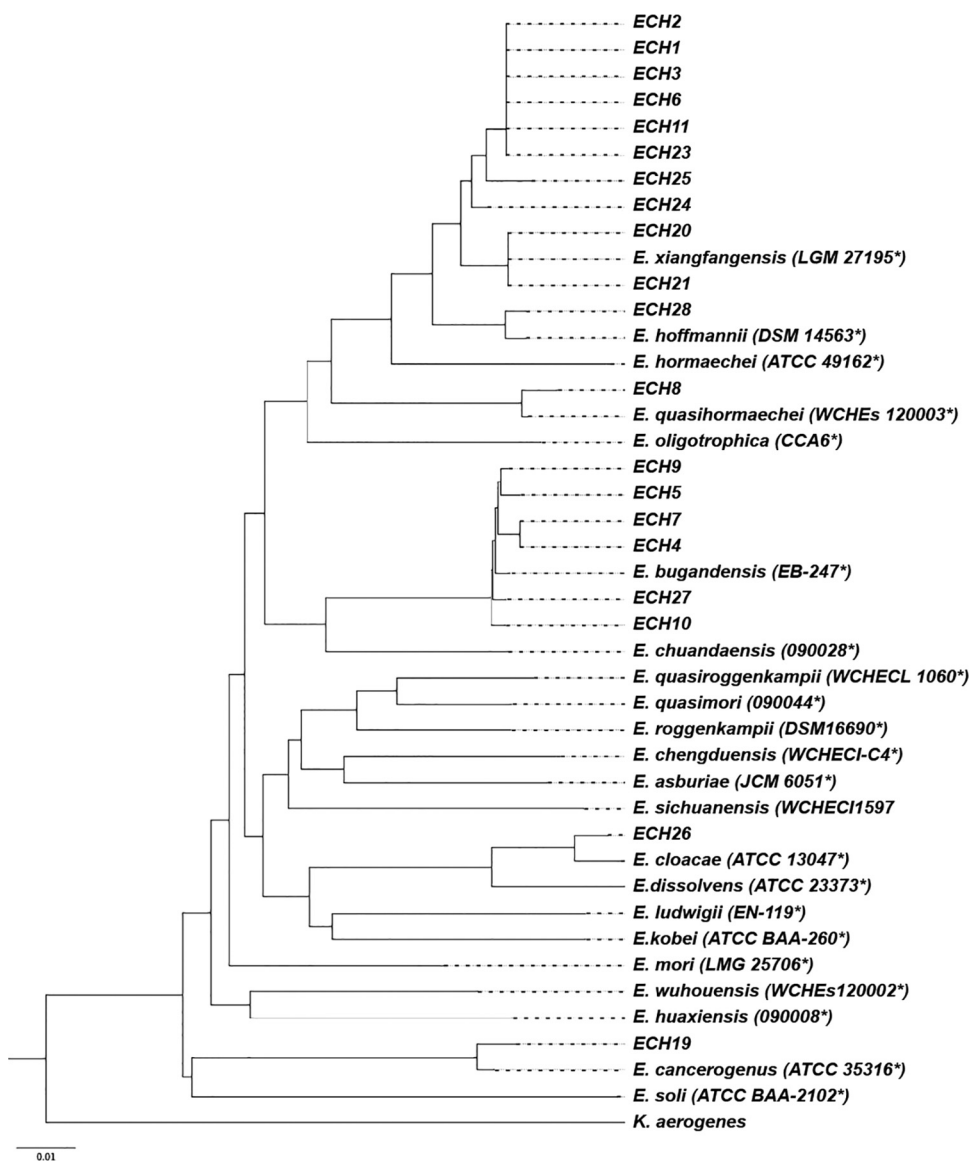


FIG 4 Molecular phylogenetic analysis of the partial sequence of the *dnaJ* gene of type strains and 20 relevant clinical strains from blood culture sequenced by WGS. The tree was inferred using the Neighbor-Joining method under the Tamura–Nei model with a 1000-bootstrap test. The analysis involved 42 partial nucleotide sequences (714 bp) of the *dnaJ* gene. The tree was rooted with the *dnaJ* sequence of *K. aerogenes* download from GenBank (AB008141.1). The *dnaJ* gene partial sequences of the type strains (*) used are available in table Supplementary text file 1 and the 20 clinical strains sequences are available in GenBank with the access number from MT665008.1 to MT665027.1.

(16) all sequencing files were compared with our library. All the 68 strains (100.0%) matched with the species previously identified by phylogenetic analysis.

DISCUSSION

The correct identification of bacterial isolates is crucial to patient care. It is essential in predicting the clinical prognosis as well as in choosing an adapted antibiotic regimen. However, for the genus *Enterobacter*, species identification is complicated. The traditional methods used in clinical laboratories, fail to correctly identify the species. Therefore, other methods are needed. Pavlovic et al. observed that MALDI-TOF MS was inadequate to differentiate *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, and *E. ludwigii* from *E. cloacae* (15). We developed a method based on a partial sequence of the *dnaJ* gene for species identification within the genus *Enterobacter*.

TABLE 2 Comparison of species identification of *Enterobacter* clinical strains by MALDI-TOF MS and *dnaJ* gene sequencing as well as OGRI

Strain	MALDI-TOF MS		<i>dnaJ</i> Organism identified ^a	OGRI	
	Organism identified	Score		ANI	dDDH
ECH1	<i>E. cloacae</i>	2.12	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99.00	91.70
ECH2	<i>E. cloacae</i>	2.09	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	98.98	91.00
ECH3	<i>E. cloacae</i>	2.08	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99.01	91.60
ECH4	<i>E. cloacae</i>	2.19	<i>Enterobacter bugandensis</i>	98.69	92.70
ECH5	<i>E. asburiae</i>	2.00	<i>Enterobacter bugandensis</i>	98.53	95.80
ECH6	<i>E. cloacae</i>	2.23	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99.99	91.60
ECH7	<i>E. cloacae</i>	2.05	<i>Enterobacter bugandensis</i>	98.68	93.80
ECH8	<i>E. cloacae</i>	2.14	<i>Enterobacter quasihormaechei</i>	98.76	95.80
ECH9	<i>E. asburiae</i>	2.02	<i>Enterobacter bugandensis</i>	98.70	95.40
ECH10	<i>E. asburiae</i>	2.11	<i>Enterobacter bugandensis</i>	98.37	96.80
ECH11	<i>E. cloacae</i>	2.12	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99.00	91.40
ECH19	<i>E. cancerogenus</i>	2.12	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99.14	91.30
ECH20	<i>E. cloacae</i>	2.24	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99.26	93.90
ECH21	<i>E. cloacae</i>	2.21	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99.24	94.00
ECH23	<i>E. cloacae</i>	2.16	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	98.99	91.20
ECH24	<i>E. cloacae</i>	2.18	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99.03	91.70
ECH25	<i>E. cloacae</i>	2.18	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99.19	93.50
ECH26	<i>E. cloacae</i>	2.09	<i>Enterobacter cloacae</i>	98.68	88.90
ECH27	<i>E. kobei</i>	2.06	<i>Enterobacter bugandensis</i>	98.44	87.00
ECH28	<i>E. cloacae</i>	2.16	<i>Enterobacter hoffmannii</i>	98.44	93.30

^aSpecies assignment according to the most recent classification. OGRI, overall genome relatedness index; ANI, average nucleotide identity; dDDH, digital DNA-DNA hybridization.

In silico analysis of the partial sequence of the *dnaJ* gene of the type strains showed a high interspecies polymorphism verified by the analysis of the phylogenetic evolution of the partial sequence of the genus *Enterobacter* ($d_N/d_S < 1$). We observed that the polymorphism of the *dnaJ* target sequence allows precise *Enterobacter* species identification.

As dDDH values have often been used in taxonomic studies, 100 recent genomes of different *Enterobacter* species were compared with the type strains to verify the correct species assignment. We observed a range from 74.4% to 100.0%. Our results were consistent with the Wu et al. study (4). We used these genome data to extract the partial sequence of the *dnaJ* gene for phylogenetic analysis and species assignment. The results show 100% accurate species assignment of the strains analyzed using *dnaJ* verified by dDDH.

A phylogenetic analysis based on the *dnaJ* gene supports the idea that, using only this partial sequence, it is possible to obtain correct species identification in the genus *Enterobacter* (Fig. 2 and 3). The method described here allows for a correct and rapid species identification as valid as OGRI.

Using our PCR-sequencing *dnaJ* method, we observed that 18/20 (86.0%) of the whole-genome sequenced *Enterobacter* clinical strains were misidentified by MALDI-TOF MS. Only one strain among 15 (6.0%) corresponded to *E. cloacae*. 3 *E. asburiae* and 1 *E. kobei* were identified as *E. bugandensis*, 11 *E. xiangfangensis* were misidentified as *E. cloacae*, and one *E. cloacae* was identified as *E. hoffmannii* (Table 2). Those results were correlated with OGRI analysis and dDDH.

Then we applied our method on a historical sampling of 68 blood culture *Enterobacter* isolates from neonates. We found a high prevalence (40.0%) of *E. xiangfangensis*. We also identified *E. quasihormaechei*, a novel species reported in 2020 (17). *E. quasihormaechei* could share the same virulence and pathogenicity mechanisms as *E. xiangfangensis*, previously identified in other studies as *E. hormaechei*, a species that often exhibits resistance to multiple commonly used antibiotics and persists in nosocomial environments (18). In this study, we report for the first time to our knowledge, four *E. quasihormaechei* isolates from blood cultures in patients with neonatal sepsis.

We also detected a high prevalence of *E. bugandensis*, another novel enterobacterial species associated with severe clinical infections, particularly with neonatal sepsis, suggesting that this element of the genus *Enterobacter* is an emergent species in Europe

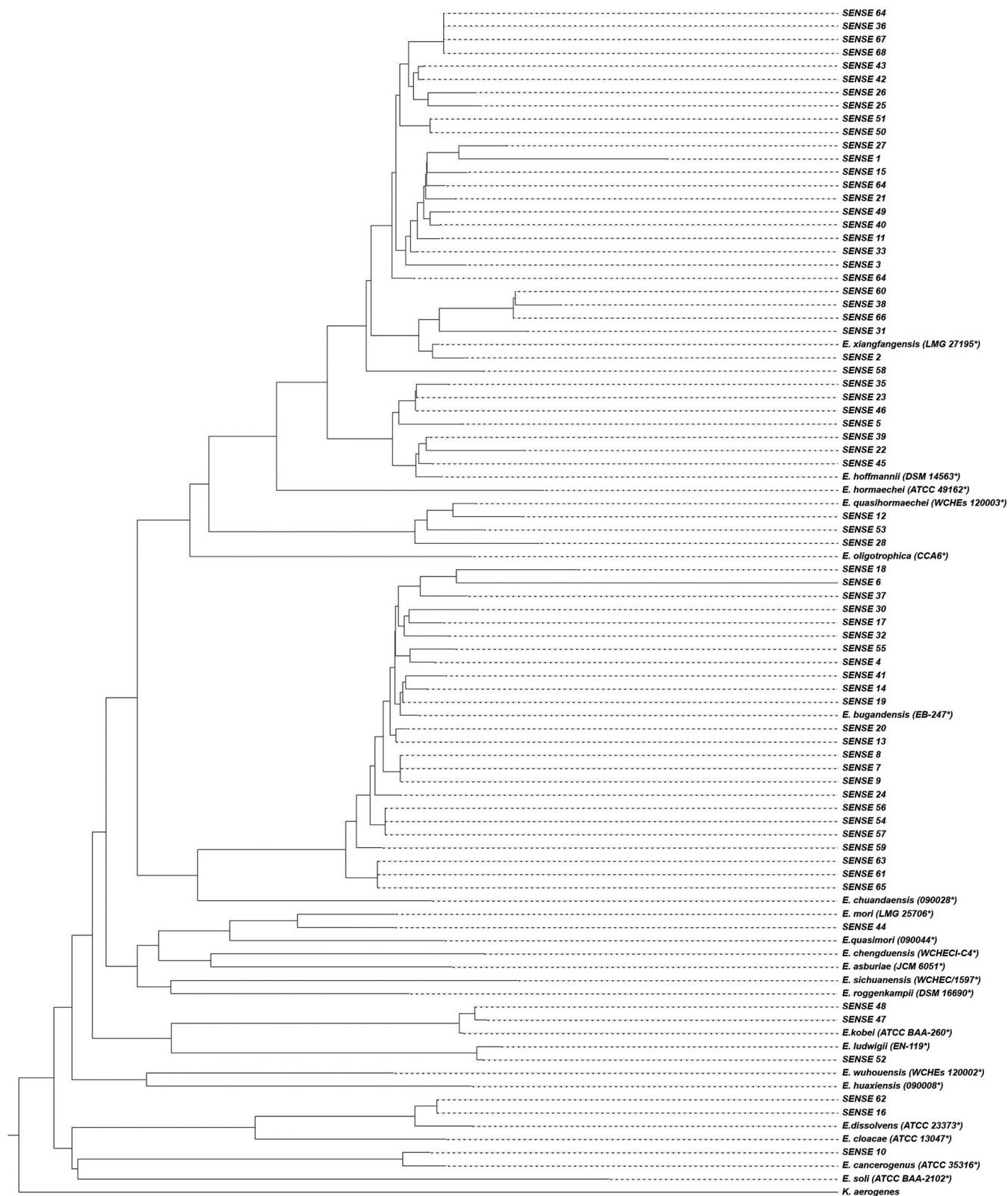


FIG 5 Molecular phylogenetic analysis of the partial sequence of the *dnaJ* gene between SENSE strains with the type strains (*). The tree was inferred using the Neighbor-Joining method under the Tamura-Nei model with a 1000-bootstrap test. The analysis involved 68 partial nucleotide sequences (714 bp) of the *dnaJ* gene. The tree was rooted with the *dnaJ* sequence of *K. aerogenes* download from GenBank (AB008141.1).

(19, 20). *E. bugandensis* is considered to be a highly pathogenic *Enterobacter* species with specific virulence mechanisms and usually a multidrug resistant profile (7, 10). Our preliminary analysis showed that our isolates identified as *E. bugandensis* are susceptible to third generation cephalosporins revealing an antibiotic resistance profile different from that previously reported (data not shown) (19).

Several epidemiological studies reported a high prevalence of *E. cloacae* in clinical isolates which is contrary to our findings where *E. cloacae* is less prevalent. The high prevalence of *E. cloacae* in other studies could be explained by species misidentification in the genus *Enterobacter* (21–23). In clinical practice bacterial identification is necessary for a better understanding of pathogenesis, virulence, and resistance to antibiotics. The fact is that identifying *Enterobacter* species has considerable medical significance since each species behaves differently: for instance, some are more likely to lead to nosocomial outbreaks while other are more prone to develop resistance to antibiotics. For example, in a recent study, we showed that *E. bugandensis* is more virulent in neonates than other species due to the presence of specific factors of virulence (24). Moreover, *E. xiangfangensis* and *E. steigerwaltii* have the highest prevalence of resistance of third generation cephalosporins and these two species were found to be especially prone to produce carbapenemases (25). In the future, the correct identification of species of the genus *Enterobacter* will also improve the understanding of their epidemiology in the clinical environment and will permit implementation of better strategies in the prevention of health care-associated infections. It will also improve patients' prognosis and treatment.

In conclusion, our method, based on a partial *dnaJ* gene PCR and amplicon sequencing, could be used in clinical practice as a specific, rapid, and highly discriminating tool, with similar results to those obtained using OGRI methods, for the correct identification of *Enterobacter* species. This improvement in correct identification can also facilitate the management of nosocomial outbreaks and promote rapid environmental monitoring.

MATERIALS AND METHODS

Phylogenetic and *in silico* analysis of the partial sequence of the *dnaJ* gene in type strains. The 22 type strain genomes were downloaded from GenBank for *in silico* analysis. We aligned the *dnaJ* gene (1146 bp) and then extracted a partial sequence from position 385 to 1098 (714 bp). The alignment and pairwise distancing were performed using the MUSCLE method (26). The Neighbor-Joining phylogenetic tree was constructed with the Tamura–Nei model and a 1000-bootstrap test using MegAlign Pro (DNASTAR) and MEGAX (27). We determined the numbers of synonymous (S) and nonsynonymous (N) sites as well as the rates of synonymous (d_s) and nonsynonymous (d_n) substitutions using the web site <http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html> (28).

Determination of overall genome relatedness. The dDDH among 100 genomes selected from GenBank (Table S1) and type strains of *Enterobacter* species were determined using the web-service <http://ggdc.dsmz.de> (formula 2). The pairwise ANI and dDDH among 20 clinically relevant bacterial isolates (Table 2) and type strains of *Enterobacter* species were determined using the web-service <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/> for ANI and the web-service GGDC for dDDH. A $\geq 70\%$ dDDH or a $\geq 96\%$ ANI value was used as the cutoff to species assignment (29). The genome of the 20 clinically relevant strains conveniently used in this study have been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the BioProject accession number PRJNA770343.

Designing of primers, PCR, and amplicon sequencing of the partial *dnaJ* gene. Degenerate primers Hsp40-Fw (5'-GACCTGCGCTACAACATGGAKCT-3') and Hsp40-Rv (5'-CCGCGYTCCAAAAGCTTCTTYGAT-3') were visually designed and analyzed (OligoAnalyzer) according to the alignment of the *dnaJ* gene sequences of the type strains. The primers were used to amplify a fragment of 750 bp. The amplification reaction was performed with Master Mix GoTaq (PROMEGA, USA), with 0.5 μ l of each primer (0.2 μ M final PCR concentration), and 2.5 μ l of DNA template in a final reaction volume of 25 μ l. PCR amplification was carried out in a thermal cycler (VERITI, Applied Biosystems) as follows: 4 min denaturation step at 94°C, followed by 30 cycles at 94°C for 50 s, 60°C for 35 s, and 72°C for 1 min, with a final extension step of 5 min at 72°C. PCR products were verified by agarose gel electrophoresis, purified using WizardSV gel and PCR clean Up System (Promega), and then sequenced using the Sanger sequencing technology with Hsp40-Fw/Hsp40-Rv primers by BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions. After sequencing, primer sequences were removed and partial sequences of the *dnaJ* gene (714 bp) were confirmed by at least two chromatograms (forward and reverse) for the phylogenetic analysis.

Bacterial strains. Eighty-eight *Enterobacter* spp. strains isolated from blood cultures of neonate patients with sepsis were included. The strains were divided in 2 groups. The first 20 strains, already sequenced by WGS were used, to validate our method (BioProject access number: PRJNA770343) (24).

The second group included 60-eight *Enterobacter* spp. clinical strains collected from 8 French neonatal intensive care units (NICUs) known as the SENSE group between 2016 to 2019. They were grown on tryptic soy agar at 37°C for 24 h in aerobic conditions, and all isolates were identified twice as *E. cloacae*

complex in the respective hospitals and in our laboratory by MALDI-TOF MS (Bruker, Leipzig, Germany). Microbial suspension at 1 on the McFarland scale was employed and 200 μ l were used for DNA extraction following the easyMAG protocol (bioMérieux, France) according to the manufacturer's instructions.

Species identification in clinical practice. We developed a local library using the partial sequence of *dnaJ*. This library allows comparison of the *dnaJ* sequence of clinical isolates with the sequences of the type strains. The local library was uploaded in the SeqScape software v4.0 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The analyze protocol was generated according to the manufactured recommendations. After Sanger sequencing, the amplicon sequences were analyzed with SeqScape Software v4.0. We employed original sequencing files and corrected sequencing files. The species identification of a submitted clinical isolate sequence was given when the software algorithm assigns to each possible way of arrangement a score, which is defined as the standard measure of sequence similarity within a set of aligned sequences (30). A score of 800 was considered a cutoff value corresponding to 98.0–100.0% of homology between type strains and clinical isolates (Fig. S1).

Data availability. Sequence data generated by this study is available at BioProject PRJNA770343 (Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank. The version described in this paper is version JAJAPC000000000-JAJAPV000000000).

The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper for the *dnaJ* gene of these 20 *Enterobacter* isolates range from MT665008.1 to MT665027.1.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.4 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, XLSX file, 0.03 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by AP-HP and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México with a fellowship to EHA from CONACYT (2019-000004-01EXTF-00028). The founders had no role in study design, interpretation, or the decision to submit the work for publication.

We thank the members of the SENSE Group: K. Allouche and D. De Luca (Antoine-Béclère, Clamart), S. Corvec and C. Flamant (Nantes), E. Bille and A. Lapillonne (Necker-Enfants malades, Paris), S. Bonacorci and L. Chafa (Robert-Debré, Paris), C. Chaplain and P. Bolot (Saint-Denis), O. Dawalder and M. Butin (Lyon), N. Fortineau and N. Le Saché (Le Kremlin-Bicêtre), F. Garnier and A. Bedu (Limoges), P. Lanotte and G. Favrais (Tours), R. Ruimy and S. Eleni Dit Trolli (Nice), M.N. Noulard and L. Desnoullez-Osselin (Arras), T. Guillard and N. Bednarek Weirauch (Reims).

We also thank Peggy Hanemann-Castex for English editing.

The study was approved by ethical committee of the French Society of Intensive Care (CE SRLF 19–40).

REFERENCES

- Kasim K, El Sadak AA, Zayed K, Abdel-Wahed A, Mosaad M. 2014. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit. *Middle-East J Sci Res* 19.
- Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. 2019. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 32:1–32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>.
- Tindall BJ, Sutton G, Garrity GM. 2017. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (approved lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (approved lists 1980). *Int J Syst Evol Microbiol* 67:502–504. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001572>.
- Wu W, Feng Y, Zong Z. 2020. Precise Species identification for *Enterobacter*: a genome sequence-based study with reporting of two novel species, *Enterobacter quasirogenkampii* sp. nov. and *Enterobacter quasimori* sp. nov. *mSystems* 5:e00527-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00527-20>.
- Richter M, Rosselló-Móra R. 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19126–19131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>.
- Ciufo S, Kannan S, Sharma S, Badretidin A, Clark K, Turner S, Brover S, Schoch CL, Kimchi A, DiCuccio M. 2018. Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:2386–2392. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002809>.
- De Florio L, Riva E, Giona A, Dedej E, Fogolari M, Cella E, Spoto S, Lai A, Zehender G, Ciccozzi M, Angeletti S. 2018. MALDI-TOF MS identification and clustering applied to *Enterobacter* species in nosocomial setting. *Front Microbiol* 9:1885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01885>.
- Mshana SE, Gerwing L, Minde M, Hain T, Domann E, Yamuya E, Chakraborty T, Imirzalioglu C. 2011. Outbreak of a novel *Enterobacter* sp. carrying blaCTX-M-15 in a neonatal unit of a tertiary care hospital in Tanzania. *Int J Antimicrob Agents* 38:265–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.05.009>.
- Tamburini FB, Andermann TM, Tkachenko E, Senchyna F, Banaei N, Bhatt AS. 2018. Precision identification of diverse bloodstream pathogens in the gut microbiome. *Nat Med* 24:1809–1814. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0202-8>.
- Campos LC, Lobianco LF, Seki LM, Santos RMR, Asensi MD. 2007. Outbreak of *Enterobacter hormaechei* septicaemia in newborns caused by contaminated parenteral nutrition in Brazil. *J Hosp Infect* 66:95–97. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.02.013>.
- Falgenhauer J, Imirzalioglu C, Falgenhauer L, Yao Y, Hauri AM, Erath B, Schwengers O, Goesmann A, Seifert H, Chakraborty T, Dojjad S. 2019. Whole-genome sequences of clinical *Enterobacter bugandensis* isolates from Germany. *Microbiol Resour Announc* 8. <https://doi.org/10.1128/MRA.00465-19>.
- McLean K, Rosenthal CA, Sengupta D, Owens J, Cookson BT, Hoffman NG, Salipante SJ. 2019. Improved species-level clinical identification of *Enterobacteriaceae* through broad-range *dnaJ* PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 57:e00986-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00986-19>.

13. Hoffmann H, Roggenkamp A. 2003. Population genetics of the nomen-species *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* 69:5306–5318. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003>.
14. Pham HN, Ohkusu K, Mishima N, Noda M, Monir Shah M, Sun X, Hayashi M, Ezaki T. 2007. Phylogeny and species identification of the family *Enterobacteriaceae* based on *dnaJ* sequences. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58: 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.019>.
15. Pavlovic M, Konrad R, Iwobi AN, Sing A, Busch U, Huber I. 2012. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. *FEMS Microbiol Lett* 328: 46–53. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02479.x>.
16. Hernandez-Alonso E, Barreault S, Allouche K, Jatteau P, Augusto L, Tissieres P, Doucet-Populaire F, Bourgeois-Nicolaos N, and the SENSE study group. 2021. *Enterobacter cloacae* complex associated with neonatal sepsis, a retrospective multicenter study in France. *Abstr 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Austria.
17. Wang C, Wu W, Wei L, Feng Y, Kang M, Xie Y, Zong Z. 2020. *Enterobacter wuhouensis* sp. nov. and *Enterobacter quasihormaechei* sp. nov. recovered from human sputum. *Int J Syst Evol Microbiol* 70:874–881. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003837>.
18. Monahan LG, DeMaere MZ, Cummins ML, Djordjevic SP, Roy Chowdhury P, Darling AE. 2019. High contiguity genome sequence of a multidrug-resistant hospital isolate of *Enterobacter hormaechei*. *Gut Pathog* 11:3. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0288-7>.
19. Doijad S, Imirzalioglu C, Yao Y, Pati NB, Falgenhauer L, Hain T, Foessel BU, Abt B, Overmann J, Mirambo MM, Mshana SE, Chakraborty T. 2016. *Enterobacter bugandensis* sp. nov., isolated from neonatal blood. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:968–974. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000821>.
20. Pati NB, Doijad SP, Schultze T, Mannala GK, Yao Y, Jaiswal S, Ryan D, Suar M, Gwozdzinski K, Bunk B, Mraheil MA, Marahiel MA, Hegemann JD, Spröer C, Goesmann A, Falgenhauer L, Hain T, Imirzalioglu C, Mshana SE, Overmann J, Chakraborty T. 2018. *Enterobacter bugandensis*: a novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. *Sci Rep* 8:5392. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23069-z>.
21. Paauw A, Caspers MP, Leverstein-van Hall MA, Schuren FH, Montijn RC, Verhoef J, Fluit AC. 2009. Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. *Microbiology (Reading)* 155:1478–1488. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024828-0>.
22. Morand PC, Billoet A, Rottman M, Sivadon-Tardy V, Eyrolle L, Jeanne L, Tazi A, Anract P, Courpied JP, Poyart C, Dumaine V. 2009. Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. *J Clin Microbiol* 47:2489–2495. <https://doi.org/10.1128/JCM.00290-09>.
23. Liu WY, Wong CF, Chung KM, Jiang JW, Leung FC. 2013. Comparative genome analysis of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One* 8:e74487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074487>.
24. Augusto L, Bourgeois-Nicolaos N, Breton A, Barreault S, Hernandez-Alonso E, Gera S, Faraut-Derouin V, Semaan N, De Luca D, Chaby R, Doucet-Populaire F, Tissieres P. 2021. Presence of 2-hydroxymyristate on endotoxins is associated with death in neonates with *Enterobacter cloacae* complex septic shock. *iScience* 24:102916. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102916>.
25. Lazarovitch T, Amity K, Coyle JR, Ackerman B, Tal-Jasper R, Ofer-Friedman H, Hayakawa K, Bogan C, Lephart PR, Kaplansky T, Maskit M, Azouri T, Zaidenstein R, Perez F, Bonomo RA, Kaye KS, Marchaim D. 2015. The complex epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacter* infections: a multicenter descriptive analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 36:1283–1291. <https://doi.org/10.1017/ice.2015.186>.
26. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
27. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
28. Yang Z, Nielsen R. 2000. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Mol Biol Evol* 17: 32–43. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026236>.
29. Chun J, Rainey FA. 2014. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 316–324. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.054171-0>.
30. Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot G, Rivollet D, Deniau M, Pralong F, Costa JM, Bretagne S. 2007. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome B gene. *J Clin Microbiol* 45:2110–2115. <https://doi.org/10.1128/JCM.02555-06>.

DEUXIÈME ARTICLE

Contaminated incubators: Source of a multispecies *Enterobacter* outbreak of neonatal sepsis

Enrique Hernandez-Alonso, Nadège Bourgeois-Nicolaos, Margaux Lepointeur, Véronique Derouin, Simon Barreault, Adam Waalkes, Luis A Augusto, Stuti Gera, Orane Gleizes, Pierre Tissieres, Stephen J Salipante, Daniele de Luca, Florence Doucet-Populaire

Microbiol Spectr. 2022 Jun 15:e0096422. doi: 10.1128/spectrum.00964-22. Epub ahead of print. PMID: 35703554.



Contexte

Le genre *Enterobacter* comprend des espèces responsables d'épidémies nosocomiales dues à des infections associées aux soins (IAS), principalement chez des patients fragiles comme les nouveau-nés prématurés hospitalisés dans des unités de soins intensifs néonataux (RNN). Déterminer la source primaire de l'infection lors d'une épidémie nosocomiale est essentiel pour gérer l'infection et améliorer le pronostic des patients. L'objectif de mon travail était de caractériser à l'aide d'outils moléculaires, notamment WGS, les souches responsables de l'épidémie. L'étude a été menée sur une période de 3 ans (2016 à 2018) incluant 20 prématurés présentant une bactériémie due à *Enterobacter*. En outre, nous mettons en évidence une nouvelle méthode d'échantillonnage des incubateurs développée pendant la gestion de l'épidémie pour faciliter l'isolement bactérien et qui a permis d'identifier la source de l'épidémie ainsi que son contrôle. L'analyse de la population bactérienne a montré que *E. xiangfangensis* était l'espèce la plus fréquente, suivie par *E. bugandensis*, une espèce récente décrite comme responsable de bactériémies chez les nouveau-nés.

En résumé, cet article rend compte de l'importance d'identifier la source primaire de contamination lors d'une épidémie pour sa gestion et son contrôle. Nous rapportons également l'utilité de l'utilisation du WGS pour la caractérisation moléculaire de l'épidémiologie microbienne responsable de l'épidémie.



Contaminated Incubators: Source of a Multispecies *Enterobacter* Outbreak of Neonatal Sepsis

 Enrique Hernandez-Alonso,^a Nadège Bourgeois-Nicolaos,^{a,b} Margaux Lepointeur,^b Véronique Derouin,^b Simon Barreault,^a Adam Waalkes,^c Luis A. Augusto,^a Stuti Gera,^b Orane Gleizes,^b Pierre Tissieres,^a Stephen J. Salipante,^c Daniele de Luca,^{d,e}
 Florence Doucet-Populaire^{a,b}

^aInstitute of Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS, CEA, Paris-Saclay University, Gif-sur-Yvette, France

^bDepartment of Bacteriology-Hygiene, AP-HP Paris-Saclay University, Hôpital Antoine Bécclère, Clamart, France

^cDepartment of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington, Seattle, Washington, USA

^dDepartment of Neonatal Intensive Care, L'Assistance Publique-Hôpitaux De Paris, Paris-Saclay University, Hôpital Antoine Bécclère, Clamart, France

^ePhysiopathology and Therapeutic Innovation Unit, INSERM U999, Paris-Saclay University, Le Kremlin-Bicêtre, France

ABSTRACT The genus *Enterobacter* includes species responsible for nosocomial outbreaks in fragile patients, especially in neonatal intensive care units (NICUs). Determining the primary source of infection is critical to outbreak management and patient outcomes. In this investigation, we report the management and control measures implemented during an *Enterobacter* outbreak of bloodstream infections in premature babies. The study was conducted in a French NICU over a 3-year period (2016 to 2018) and included 20 premature infants with bacteremia. The clinical and microbiological characteristics were identified, and whole-genome sequencing (WGS) was performed on bacteremia isolates. Initially, several outbreak containment strategies were carried out with no success. Next, outbreak investigation pinpointed the neonatal incubators as the primary reservoir and source of contamination in this outbreak. A new sampling methodology during “on” or “in use” conditions enabled its identification, which led to their replacement, thus resulting in the containment of the outbreak. WGS analysis showed a multiclonal outbreak. Some clones were identified in different isolation sources, including patients and neonatal incubators. In addition, microbiological results showed a multispecies outbreak with a high prevalence of *Enterobacter bugandensis* and *Enterobacter xiangfangensis*. We conclude that the NICU health care environment represents an important reservoir for *Enterobacter* transmission and infection. Finally, extracting samples from the neonatal incubator during active use conditions improves the recovery of bacteria from contaminated equipment. This method should be used more frequently to achieve better monitoring of the NICU for HAIs prevention.

IMPORTANCE Neonatal incubators in the NICU can be an important reservoir of pathogens responsible for life-threatening outbreaks in neonatal patients. Traditional disinfection with antiseptics is not sufficient to eradicate the microorganisms that can persist for long periods in the different reservoirs. Identification and elimination of the reservoirs are crucial for outbreak prevention and control. In our investigation, using a new strategy of microbiological screening of neonatal incubators, we demonstrated that these were the primary source of contamination. After their replacement, the outbreak was controlled. This new methodology was effective in containing this outbreak and could be a viable alternative for infection prevention and control in outbreak situations involving incubators as a reservoir.

KEYWORDS *Enterobacter*, *Enterobacter bugandensis*, infection control, NICU outbreak, health care-associated infections, sepsis, very low birth weight (VLBW) infants, bloodstream infections

Editor Karen C. Carroll, Johns Hopkins Hospital

Copyright © 2022 Hernandez-Alonso et al.

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Florence Doucet-Populaire, florence.doucet-populaire@aphp.fr.

The authors declare no conflict of interest.

Received 18 March 2022

Accepted 27 May 2022

Health care-associated infections (HAIs) have emerged as a major cause of morbidity, mortality, and rising health care costs within neonatal intensive care units (NICUs) (1). Newborns admitted to the NICU are at high risk of contracting nosocomial infections due to the immaturity of their immune system and the prevalence of invasive procedures (2). One of the most severe HAIs in this context, especially in very low birth weight (VLBW) infants (<1,500 g), is late-onset sepsis (LOS), which is frequently associated with invasive procedures (3–5). HAIs extend hospital stay by 19 days, causing 45.0% of deaths by 2 weeks of age (6). Epidemiological data show that in VLBW infants, the predominant pathogens of neonatal LOS are Gram-positive bacteria (48.0 to 70.0%) such as coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus*, but Gram-negative organisms (19.0% to 25.0%) such as *Enterobacteriales* are also important (7–9). Over the last decades, the genus *Enterobacter* has emerged as an important nosocomial pathogen in NICUs (10, 11). Today, more than 20 different species have been identified by molecular techniques (12). *Enterobacter* spp. can colonize the gastrointestinal tract, as well as surfaces or devices in the NICU, constituting an important reservoir of HAIs (13–15). Improved methodologies for identifying and monitoring outbreaks are necessary to reduce HAIs in NICUs. In this study, we describe management and control measures of a LOS *Enterobacter* outbreak in a French NICU. We used whole-genome sequencing (WGS) to characterize *Enterobacter* strain gene content and to provide a comprehensive understanding of the epidemiological dynamics of the outbreak.

RESULTS

Outbreak description and demographics. In May 2016, an outbreak alert was emitted following three cases of *Enterobacter* sepsis in the NICU. The rate of *Enterobacter* invasive infections had risen from 0.7% in 2015 to 2.14% in 2016. We initiated an outbreak investigation and surveillance program as follows:

- To exclude cross-transmission, the NICU was divided into two sectors with dedicated health care workers: one with infected and colonized babies and one *Enterobacter*-free. The movement of neonates within and between units was restricted, and entrance to the outbreak area was kept to a minimum.
- Health care workers' adherence to the infection control policies (hand hygiene, use of gloves, change of health care clothes and individual protective equipment) was assessed, followed by NICU feedback dissemination, on-site educational and training sessions, and audits of the surveillance measures.
- Biocleaning practices of equipment and hospital environment were audited, and environmental surveillance was introduced.
- Supervision of antibiotic consumption was reinforced.
- The Assistance Publique-Hôpitaux De Paris (AP-HP) infection control team held monthly meetings with the local infection control team (LICT), medical and paramedical NICU infection control staff, and the hospital management to discuss the decision needed to stop the outbreak.
- All parents and visitors were informed of the new hygiene measures and the reason for enhanced infection control of the outbreak and were provided with a written explanation.

Major outbreak control interventions are shown in Fig. 1. From January 2016 to December 2018, 1,621 newborns were admitted to our NICU. During this period, we identified 20 *Enterobacter* bacteremia cases among 20 separate newborns. In the blood cultures, the 20 strains isolated were all identified as *Enterobacter cloacae* complex by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) at the time of the outbreak.

All 20 newborns (100.0%) had a low birth weight (<1,500 g). Mean birth weight was 883.6 ± 343.8 g, gestational age was 27.0 ± 2.1 weeks, 53.0% of the patients were female, 45.0% (9 of 20) of the births were by cesarean, and the mean of CRIB II was

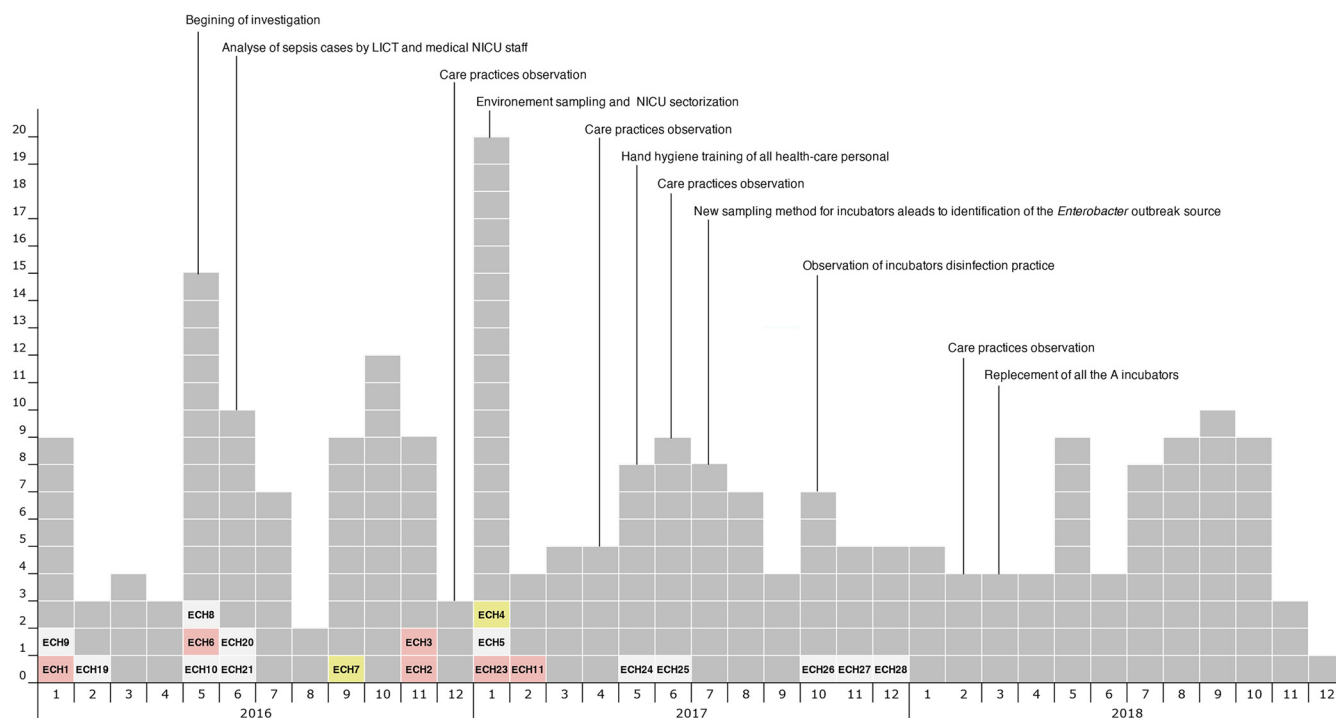


FIG 1 Monthly number of *Enterobacter* isolates from sepsis and colonized newborns (blood culture/nasopharynx and rectum) from 2016 to 2018 in the neonatal intensive care unit (NICU). Colonization strains are shown in gray, and bacteremia strains are identified by ID ECH. Pink and yellow show lineages A and B, respectively. The figure also shows the timeline of events and the overview of the implementation of the various infection prevention and control measures by the local infection control team. LICT, local infection control team.

10.0 ± 3.6. Of the 20 patients, 14 (70.0%) died during the outbreak period, and 7 of the 14 patients who died had neutropenia (50.0%).

The highest incidence of bloodstream infection caused by *Enterobacter* was registered in May to June 2016, November 2016, and January 2017. During these same periods, we identified 220 newborns (13.6%) colonized with *Enterobacter*. The highest colonization rate was in January 2017 (Fig. 1).

The 20 isolates from blood cultures were typed by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR as the outbreak progressed. It showed 11 different clusters (A-K) (Fig. 2). Two predominant cluster were identified: cluster A (25.0%) and cluster E (23.3%). In addition, cluster A was associated with *Enterobacter xiangfangensis*, and cluster E was associated with *Enterobacter bugandensis*.

Environmental microbiology investigation. At the start of the outbreak, 100 environmental samples were collected for *Enterobacter* screening from surfaces, shared devices, water, and drains in the NICU. All the cultures were negative.

After the assessment of risk factors, the neonatal incubators seemed to be the most probable source of the outbreak. The local infection control team performed a thorough examination and complete disassembly of the incubators (Fig. 3). The two models of incubators (model A [*n* = 22] and model B [*n* = 11]) were tested in both “off” and active “on” modes between July 2017 and October 2017.

In model A of incubator, 45 samples were collected. *Enterobacter* was found in 26.0% (5 of 19) in “off” conditions versus 77.0% (20 of 26) in “on” conditions. The results remained positive after changing various motor parts and all seals. In model B, 15 samples were collected. However, *Enterobacter* was not found in either “off” or “on” conditions.

The 20 *Enterobacter* strains ECE1-ECE20 isolated from model A incubators were typed by ERIC-PCR. Profiles A, E, F, G, I, and K were identified, showing the same profile clusters as isolates from blood cultures. In addition, the two strains sequenced by WGS showed that ECE1 (profile A) is a member of genetic lineage A, and ECE11 (profile E) constitutes a third lineage C with strain ECH5 (sepsis).

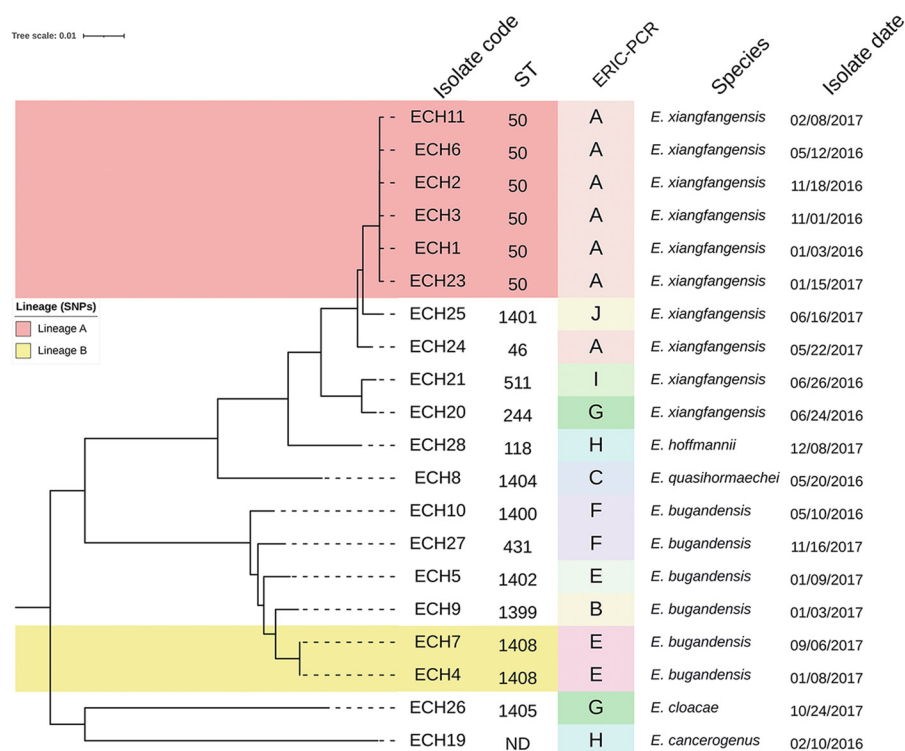


FIG 2 Phylogenetic tree of 20 *Enterobacter* strains isolated in blood culture during the outbreak period. The phylogenetic tree was performed using the core genome single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis by pairwise distance matrix of distinguishing SNPs between the isolates. ERIC, enterobacterial repetitive intergenic consensus; ND, not determined.

Genomic analysis of *Enterobacter* isolates from blood culture. We found five species belonging to *E. cloacae* complex: 50.0% (10 of 20) *E. xiangfangensis*, 30.0% (6 of 20) *E. bugandensis*, 5.0% (1 of 20) *E. cloacae*, 5.0% (1 of 20) *Enterobacter hoffmannii*, 5.0% (1 of 20) *Enterobacter quasihormaechei*, and one which did not, 5.0% (1 of 20) *Enterobacter cancerogenus*. Multilocus sequence type (MLST) analysis distinguished 5 STs among the 10 *E. xiangfangensis* isolates and 5 STs among the 6 *E. bugandensis* isolates, indicating a high genetic diversity (Fig. 2). The ST50 and ST1402 were observed in blood cultures and environmental sources, specifically in neonatal incubators (Fig. 4). In addition, ST50, ST1408, and ST118 persisted during the entire outbreak period (2 years).

A core genome phylogenetic analysis identified two distinct lineages of genetically related isolates (A and B), each of which correlated with different MLST (lineage A, ST50; and lineage B, ST1408) and with ERIC-PCR clusters (lineage A, cluster A; and lineage B, cluster E) (Fig. 2). Lineage A ($n = 6$) isolates were identified as *E. xiangfangensis*, and lineage B ($n = 2$) isolates were identified as *E. bugandensis*. Clones were present within each of the lineages, a level of genomic identity that is indicative of direct descent and/or transmission. Within lineage A, ECH1, ECH2, and ECH3 demonstrate five pairwise single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 8 for ECH2 and ECH6. Both members of lineage B were genetically indistinguishable (0 pairwise SNPs) (supplemental file 1).

Drug susceptibility testing and antibiotic resistance genes. We determined the antimicrobial and antiseptic susceptibility of the 20 strains recovered from patients with bloodstream infection due to *Enterobacter* (Table 1). All strains were susceptible to cefepime, aminoglycosides, and ciprofloxacin but resistant to colistin. In addition, in all strains, we observed a heteroresistance to colistin. We found that 30.0% (6 of 20) of the strains were cefotaxime-resistant (CTX-R). All CTX-R strains were identified as *E. xiangfangensis*, and CTX-R was associated with overproduction of the cephalosporinase

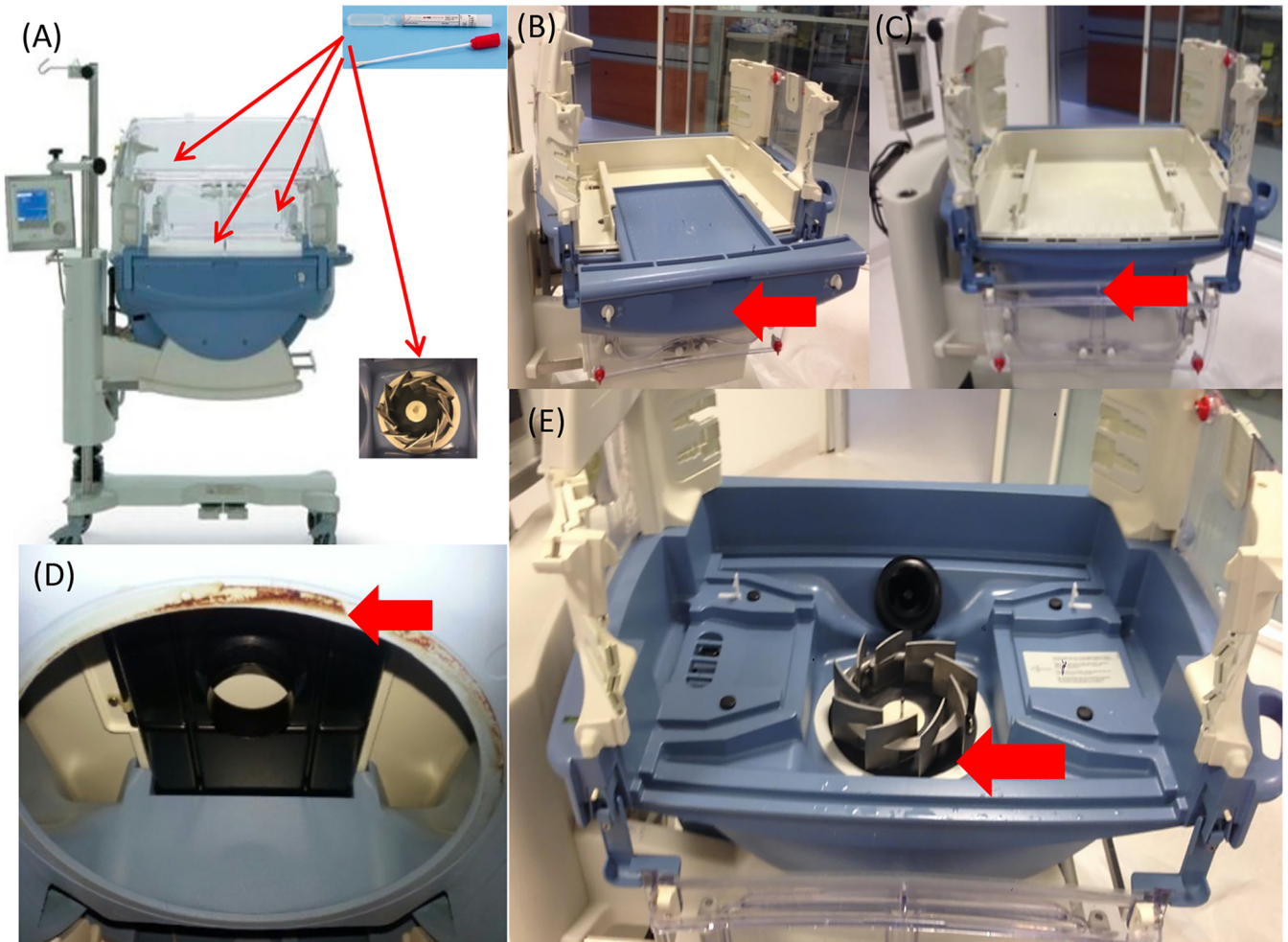


FIG 3 Incubators identified as the source of contamination during the *Enterobacter* outbreak. (A) Outdoor and indoor sites where microbiological control was performed. (B through E) Red arrows show the sites where microbiological controls were performed under “on” conditions that allowed for isolation of the *Enterobacter* strains.

AmpC. Lineage-specific patterns of resistance were also observed. Lineage A included 5 of the 6 CTX-R strains. In contrast, lineage B strains were susceptible to CTX. All strains of lineage A carried the AmpC-type β -lactamase ACT-15, even the CTX-S strain ECH23. All lineage A strains showed mutations in AmpR and AmpD. The only differences between the five CTX-R strains and the CTX-S strain (ECH23) were the presence of an insertion (Ser-Ser-Ser-Met) at the amino-terminal end and of a four-amino acid insertion at the carboxyl-terminal end in the AmpD protein in the CTX-R strains. These differences might be associated with the AmpC overproduction (supplemental file 2). The sixth CTX-R strain (ECH24) harbored an ACT-17.

WGS analysis did not show acquisition of resistance-associated genes. Patients were treated with cefepime or piperacillin-tazobactam or meropenem plus gentamicin or amikacin or ciprofloxacin according to the susceptibility of the strain. Finally, decreased susceptibility to the antiseptics evaluated (chlorhexidine and benzalkonium chloride) was observed in all the strains (100%).

DISCUSSION

In this investigation, we describe the clinical, microbiological and molecular characteristics, as well as the management and control measures, of an *Enterobacter* outbreak in one NICU over a 2-year time span. Identifying the primary source of infection is critical in the management of an outbreak and of each patient with bacteremia (16). Here,

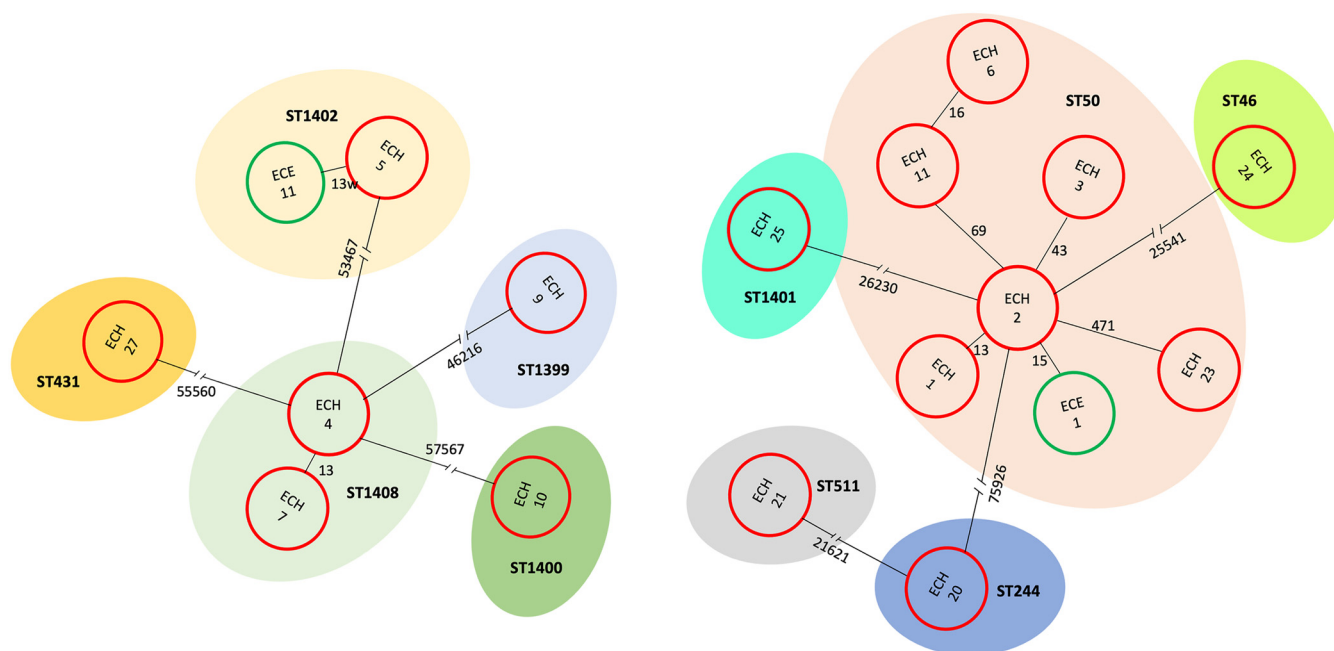


FIG 4 Evolution of pairwise distances by SNP analysis in the strains recovered from bacteremia (red circles) and neonatal incubators (green circles). (Left) *E. bugandensis* population. (Right) *E. xiangfangensis* population. Tree branch numbers indicate SNP distances between genomes (circles), and each multilocus sequence type (MLST) is represented with a different color.

we determined that the incubators were the primary source of *Enterobacter* strains responsible for the outbreak.

Clinical characteristics of the patients were consistent with the findings of other studies (11, 17). A higher mortality rate (70.0%) was observed in our study compared to other outbreaks of *Enterobacter* infection in NICUs with reported mortality rates of 34.0 to 63.6% (17–19). Recently, our group highlighted the association of fatal septic shock and the presence of lipopolysaccharide (LPS) modifications that could explain the mortality rate observed in *Enterobacter* outbreaks (20). The impact of this LPS modification on virulence has also been evidenced in other species such as *Salmonella* spp. and *Acinetobacter* spp. (21, 22).

It is known that *Enterobacter* spp. colonizes the newborn immediately after birth (23, 24). Interestingly, the cases of infection covered by this study did not necessarily occur during periods of high incidence of colonization in the NICU. Furthermore, colonization persisted after even after biocleaning, as has been reported in other studies (11, 13). *Enterobacter* colonization in newborns follows different patterns of colonization due to limited maternal contact, delayed enteral feeding, antibiotic treatment, and exposure to the NICU environment. The hypothesis that *Enterobacter* infections classically occur after intestinal colonization and translocation remains moot (11). In our study, gut colonization never preceded sepsis.

The NICU environment plays an important role as a reservoir for invasive strains causing neonatal sepsis (25). The multiclonal nature of our *Enterobacter* outbreak, quickly elucidated by ERIC-PCR and then by SNPs analysis, supports the hypothesis that cross-contamination in the NICU environment can be a cause of HAIs (25, 26). Transmission of invasive strains usually occurs from patient to patient through the hands of health care workers and through shared devices (27, 28). In this context, premature newborns are especially susceptible to *Enterobacter* infection due to their immature immune system, their low birth weight, and the invasive procedures they undergo (28, 29).

To control the outbreak, the NICU was divided into two sections in January 2017 to prevent transmission. However, the incidence of sepsis cases, as well as colonization, continued. The presence of *Enterobacter* and other pathogens in neonatal incubators is common and was suspected to be the source of contamination for HAIs in this NICU

TABLE 1 Antimicrobial and antiseptic susceptibility (MICs) of the 20 *Enterobacter* sepsis strains from neonatal intensive care unit^a

Isolate code	Bacteria	ST	ERIC-PCR	Lineage	MIC (mg/liter)																			
					CTX	FEP	MEM	PIP/ITZ	CIP	GEN	KN	COL	BZK	CHX										
ECH11	<i>E. xiangfangensis</i>	50	A	A	128	R	1	S	0.06	S	32	R	0.031	S	0.5	S	2	S	128	R	64	DS	>128	DS
ECH6	<i>E. xiangfangensis</i>	50	A	A	16	R	0.5	S	0.06	S	128	R	0.007	S	0.5	S	2	S	16	R	128	DS	>128	DS
ECH2	<i>E. xiangfangensis</i>	50	A	A	64	R	0.25	S	0.06	S	8	S	0.031	S	0.5	S	1	S	32	R	64	DS	>128	DS
ECH3	<i>E. xiangfangensis</i>	50	A	A	64	R	0.5	S	0.03	S	8	S	0.007	S	0.5	S	2	S	16	R	128	DS	>128	DS
ECH1	<i>E. xiangfangensis</i>	50	A	A	64	R	0.5	S	0.12	S	64	R	0.003	S	0.5	S	4	S	32	R	64	DS	>128	DS
ECH23	<i>E. xiangfangensis</i>	50	A	A	0.25	S	0.03	S	0.03	S	1	S	0.003	S	0.5	S	2	S	8	R	64	DS	>128	DS
ECH25	<i>E. xiangfangensis</i>	1401	J	A	0.25	S	0.03	S	0.06	S	2	S	0.031	S	0.5	S	2	S	16	R	64	DS	>128	DS
ECH24	<i>E. xiangfangensis</i>	46	A	A	32	R	0.5	S	0.06	S	4	S	0.031	S	0.25	S	0.5	4	R	64	DS	>128	DS	
ECH21	<i>E. xiangfangensis</i>	511	I	A	0.25	S	0.06	S	0.03	S	1	S	0.003	S	0.5	S	2	S	16	R	64	DS	>128	DS
ECH20	<i>E. xiangfangensis</i>	244	G	A	0.25	S	0.06	S	0.03	S	1	S	0.003	S	0.5	S	2	S	8	R	64	DS	>128	DS
ECH28	<i>E. hoffmannii</i>	118	H	A	0.06	S	0.01	S	0.06	S	4	S	0.125	S	0.5	S	32	R	128	R	64	DS	>128	DS
ECH8	<i>E. quasihormaechei</i>	1404	C	A	1	S	0.5	S	0.01	S	2	S	0.003	S	0.5	S	2	S	16	R	64	DS	>128	DS
ECH10	<i>E. bugandensis</i>	1400	F	A	0.5	S	0.06	S	0.06	S	8	S	0.007	S	0.5	S	2	S	128	R	128	DS	>128	DS
ECH27	<i>E. bugandensis</i>	431	F	A	0.25	S	0.03	S	0.06	S	1	S	0.031	S	0.5	S	2	S	128	R	64	DS	>128	DS
ECH5	<i>E. bugandensis</i>	1402	E	A	0.5	S	0.03	S	0.06	S	1	S	0.015	S	0.5	S	4	S	128	R	128	DS	>128	DS
ECH9	<i>E. bugandensis</i>	1399	B	A	0.5	S	0.06	S	0.03	S	2	S	0.031	S	0.5	S	4	S	128	R	128	DS	>128	DS
ECH7	<i>E. bugandensis</i>	1408	E	B	0.5	S	0.06	S	0.06	S	2	S	0.007	S	1	S	2	S	64	R	64	DS	>128	DS
ECH4	<i>E. bugandensis</i>	1408	E	B	0.5	S	0.06	S	0.06	S	2	S	0.015	S	0.5	S	4	S	64	R	128	DS	>128	DS
ECH26	<i>E. cloacae</i>	1405	G	A	0.5	S	0.5	S	0.06	S	2	S	0.062	S	0.5	S	4	S	16	R	64	DS	>128	DS
ECH19	<i>E. cancerogenus</i>	ND	H	A	0.5	S	0.06	S	0.06	S	2	S	0.007	S	0.5	S	2	S	32	R	64	DS	>128	DS
ATCC 13047	<i>E. cloacae</i>				0.06	S	0.03	S	0.03	S	4	S	0.031	S	0.5	S	2	S	128	R	32	S	2	S

^aERIC, enterobacterial repetitive intergenic consensus; ST, sequence type; CTX, cefotaxime; FEP, cefepime; MEM, meropenem; PIP/ITZ, piperacillin-tazobactam; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; KN, kanamycin; COL, colistin; BZK, benzalkonium chloride; CHX, chlorhexidine; S, susceptible; R, resistant; DS, decreased susceptibility; ND, not determined.

(30). We initially screened for *Enterobacter* spp. in the incubators following traditional procedures, but no *Enterobacter* strain was isolated (31). In response, the hospital's bacteriology team decided to carry out a new strategy. They collected specimens with the incubators running, which facilitated bacterial recovery by raising humidity and temperature to more optimal conditions for microorganism growth. Using this new strategy, it was possible to find *Enterobacter* isolates. In addition, several MLSTs were isolated from multiple sources (blood cultures from patients with bacteremia and incubators), supporting the hypothesis that incubators were the principal source of contamination within the NICU during this outbreak (Fig. 4), as was reported in other works (32, 33). In March 2018, due to the persistence of the outbreak despite the reinforcement of control measures, all 22 model A incubators, contaminated by *Enterobacter* were replaced. A significant decrease in the number of cases of bloodstream infections due to *Enterobacter* was observed.

Selective pressures from antimicrobials are another important factor in the emergence of *Enterobacter* in the hospital environment. Interestingly, in contrast to other studies (29, 34), multidrug-resistant (MDR) strains were not identified in our cohort. Nevertheless, given the link between antimicrobial regimens and colonization of newborns with MDR *Enterobacter* strains, control of antimicrobial therapy during and after an outbreak should be undertaken to avoid the emergence of potential MDR strains (32). Measures such as revision of antimicrobial therapy and additional training of the NICU staff to reduce antimicrobial consumption and to prevent cross-contamination in the NICU were accordingly implemented by our hospital system. In addition, the prevalence of 100% of decreased susceptibility to quaternary ammonium compounds observed in this study suggests that another method of incubator disinfection such as steam decontamination should be used to reduce the presence of pathogens in the NICU (33).

The prevalence and distribution of specific *Enterobacter* species in the NICU are not well documented due to frequent misidentification of this pathogen in clinical practice. In several studies where MALDI-TOF MS was implemented as a tool for bacterial identification, *Enterobacter* was reported as *E. cloacae* or an *E. cloacae* complex (13, 26, 28). In our investigation, WGS was used to establish the precise taxonomy of bacterial isolates, revealing *E. xiangfangensis* and *E. bugandensis* to be the most prevalent species in the outbreak. *E. bugandensis*, a recently described species, was first identified as responsible for an NICU outbreak in 2016 (19, 34). In 2018, Pati et al. (35) reported the potential of *E. bugandensis* for causing bloodstream infections, as well as its ability to induce the release of proinflammatory cytokines. These results support the hypothesis that *E. bugandensis* is an emerging pathogen in the NICU with a virulence potentially greater than other species of the genus *Enterobacter* (35, 36). However, more studies implementing tools for precise species identification are needed in additional settings to better understand its epidemiology in the NICU (12).

Although illuminating, our study has some limitations. First and foremost, our study was conducted in a single medical center, which does not authorize us to generalize about the epidemiological dynamics of *Enterobacter* in all NICUs.

Our study shows the importance of long-term broad surveillance of NICUs to identify the epidemiology of neonatal outbreaks due to the different *Enterobacter* species and shows the usefulness of WGS in understanding the transmission and prevention of hospital-acquired bloodstream infections. Additionally, we find that sampling neonatal incubators while they are in active use improves recovery of organisms from contaminated instruments. These methods should be employed more generally to achieve better surveillance of the NICUs for HAIs prevention.

MATERIALS AND METHODS

Hospital characteristics, patient population, and data collection. AP-HP is a public health institution administering 38 teaching hospitals spread throughout Paris, its suburbs, and surrounding counties, with 21,000 beds (10% of all public hospital beds in France). It serves 12 million inhabitants. Antoine-Béclère Hospital is a 400-bed teaching AP-HP hospital providing primary care to adults and neonatal

patients, including a level 3 NICU with 28 intensive care beds. A local infection control team (LICT) oversees the prevention and surveillance of HAIs in the hospital. Clinical data at birth included gestational age, weight, cesarean birth, Clinical Risk Index for Babies (CRIB) scoring and postnatal neutropenia ($<1,000$ polynuclear neutrophils/ μL). HAIs were defined by positive blood culture ≥ 48 h from NICU admission.

Outbreak management. In May 2016, a significant rise in bacteremia due to *Enterobacter* spp. was observed in the NICU. According to the accepted definition, an outbreak due to *Enterobacter* was suspected (37). Surveillance cultures of rectal and cavum swabs were obtained from all admissions to the NICU. Colonization was defined as a rectal/cavum swab sample that tested positive for *Enterobacter*. Soon after the confirmation of the outbreak, neonatal HAI prevention actions were implemented by the LICT.

Environment investigation. In January 2017, the LICT set up an environment sampling campaign to identify a possible environmental source of the outbreak. Multiple environmental sites were tested, including shared devices in the ward (gloves, sheets, plaster, ultrasound gel, neonatal incubators, etc.) using contact plates or swabs. In addition, water samples were collected in different rooms and filtered to search for *Enterobacter* spp., and multiple siphons were swabbed. The swabs were inoculated on Columbia agar with 5.0% sheep blood and Drigalski agar plates (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France). The isolated colonies were identified using the reference spectra library of the Bruker Biotyper MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics). After the absence of identification of the contamination source and as the outbreak was still active, in July 2017, we implemented two different incubator sampling protocols. Both methodologies included the sampling of the corners and of risky and unattainable areas (seals, ventilator, holes, etc.) just after cleaning. The first method was performed under "off" conditions, and the second was performed under "on" conditions, which were 37°C, and 85.0% humidity for 48 h. Both methods were used on the two incubator models (model A, $n = 22$; and model B, $n = 11$) owned by the NICU.

Microbiology diagnostic. Blood cultures were processed for the diagnosis of bacteremia with automated microbial detection systems BacT/Alert 3D system (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France). To determine the evolution of HAIs in neonatal patients and colonized babies, all newborns admitted were routinely screened for bacterial colonization and received a nasopharynx and rectum examination on their arrival in the unit and on a weekly basis following the admission. Rectal and cavum swabs collected from patients and surfaces were inoculated on Drigalski agar (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France). All inoculated samples were incubated at 36°C for 48 h. The isolates recovered were routinely identified using MALDI-TOF MS.

Antimicrobial and antiseptic susceptibility evaluation. MICs of cefotaxime (CTX), cefepime (FEP), meropenem (MEM), piperacillin-tazobactam (PIP/TZ), ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GEN), kanamycin (KN), and colistin (COL) were determined by the Mueller–Hinton broth microdilution method. Interpretation followed the recommendations of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) (38). MICs of chlorhexidine (CHX) and benzalkonium chloride (BZK) were determined by Mueller–Hinton broth microdilution method in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2019). Antiseptic decrease susceptibility was acknowledged if the MIC was less or equal to 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in keeping with previous reports (39, 40). Each antimicrobial and antiseptic susceptibility determination was performed three times. *Escherichia coli* ATCC 2592 and *E. cloacae* ATCC 13047 were used as quality control in each run.

Strains molecular typing by ERIC-PCR. To quickly identify the clonal relatedness of *Enterobacter* strains during the outbreak period, an ERIC-PCR was designed. DNA extraction was performed with the Easy Mag kit (bioMérieux, France), and 2 μL was used as the DNA templates. Subsequently, the amplification was performed using ERIC2 primers: 5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'. The amplification reaction volume was 25 μL under the following conditions: an initial denaturation for 10 min at 94°C, followed by 40 cycles with amplification at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s for alignment, elongation stage at 72°C for 1 min, and a final stage of 10 min at 72°C. The amplified products were resolved through electrophoresis and analyzed on 1.5% agarose with GelRed revelator (Biotium, USA). Patterns of different strains were compared by visual inspection, as described by Coudron et al. (41). The patterns were interpreted as identical if an identical number of bands of the same size was found.

Whole-genome sequencing and analysis. Sequencing libraries were prepared using the Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. We multiplexed and sequenced samples on an Illumina NextSeq500. We obtained *de novo* assembly using SPAdes assembler version 3.10.1. The bacterial genome was annotated using the Rapid Annotation Subsystem Technology (RAST) online server. Antibiotic resistance genes were further investigated using the Resistance Gene Identifier (RGI) of the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) and ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Assignment of isolates to species was ascertained by BLAST and ANI analysis using pyANI (42). The core genome was determined as 1,106 genes. For the investigation of molecular epidemiology, a core genome SNP analysis was performed. Reads were trimmed using fastq-mcf from ea-utils-1.1.2.779 (43), and *de novo* genome assembly of isolates was performed using ABySS 2.0.2 (44). A core genome alignment was created from these assemblies using recombination-adjusted method (roary version 3.13.0) (45) with -s and -e flags. FastTree v2.1.8 was then used to construct a phylogenomic tree (46). snp-dists v0.8.2 (47) was used to construct a pairwise distance matrix for distinguishing SNPs between the isolates. Using thresholds previously established for *Enterobacteriales*, we defined clonality as ≤ 10 pairwise SNPs in the core genome (48).

Ethics approval. The study was approved by the ethical committee of the French Society of Intensive Care (CE SRLF 19–40).

Data availability. The genome sequencing data are publicly available at the NCBI GenBank under BioProject accession number PRJNA770343.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, XLSX file, 0.01 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by L'Assistance Publique-Hôpitaux De Paris, the Dim-One health program, and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of México with a CONACYT Fellowship 2019-000004-01EXTF-00028 (E.H.-A.). The founders had no role in study design, interpretation, or the decision to submit the work for publication.

We also thank Peggy Hanemann-Castex for English editing.

REFERENCES

- Polin RA, Denson S, Brady MT, Committee on Fetus and Newborn, Committee on Infectious Diseases. 2012. Epidemiology and diagnosis of health care-associated infections in the NICU. *Pediatrics* 129:e1104–e1109. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-0147>.
- Al-Tawfiq JA, Tambyah PA. 2014. Healthcare associated infections (HAI) perspectives. *J Infect Public Health* 7:339–344. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2014.04.003>.
- Hooven TA, Polin RA. 2014. Healthcare-associated infections in the hospitalized neonate: a review. *Early Hum Dev* 90:S4–S6. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(14\)70002-7](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(14)70002-7).
- Liu J, Sakarovich C, Sigurdson K, Lee HC, Profit J. 2020. Disparities in health care-associated infections in the NICU. *Am J Perinatol* 37:166–173. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1688481>.
- Singh M, Alsalem M, Gray CP. 2021. Neonatal sepsis. *In StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island, FL.
- Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK. 2002. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 110:285–291. <https://doi.org/10.1542/peds.110.2.285>.
- Dong Y, Speer CP. 2015. Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 100:F257–F263. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306213>.
- Leoncio JM, Almeida VF, Ferrari RAP, Capobianco JD, Kerbauy G, Tacla MTGM. 2019. Impact of healthcare-associated infections on the hospitalization costs of children. *Rev Esc Enferm USP* 53:e03486. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00094-3>.
- Giannoni E, Agyeman PKA, Stocker M, Posfay-Barbe KM, Heininger U, Spycher BD, Bernhard-Stirnemann S, Niederer-Loher A, Kahlert CR, Donas A, Leone A, Hasters P, Rely C, Riedel T, Kuehni C, Aebi C, Berger C, Schlappbach LJ, Swiss Pediatric Sepsis Study. 2018. Neonatal sepsis of early onset, and hospital-acquired and community-acquired late onset: a prospective population-based cohort study. *J Pediatr* 201:106–114.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.05.048>.
- de Man P, Verhoeven BA, Verbrugh HA, Vos MC, van den Anker JN. 2000. An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *Lancet* 355:973–978. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)90015-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)90015-1).
- Ferry A, Plaisant F, Ginevra C, Dumont Y, Grandio J, Claris O, Vandenesch F, Butin M. 2020. *Enterobacter cloacae* colonisation and infection in a neonatal intensive care unit: retrospective investigation of preventive measures implemented after a multiconal outbreak. *BMC Infect Dis* 20:682. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05406-8>.
- Hernandez-Alonso E, Barreault S, Augusto LA, Jatteau P, Villet M, Tissieres P, Doucet-Populaire F, Bourgeois-Nicolaos N, SENSE Group. 2021. *dnaI*: a new approach to identify species within the genus *Enterobacter*. *Microbiol Spectr* 9:e0124221. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01242-21>.
- Rahal A, Andreo A, Le Gallou F, Bourigault C, Bouchand C, Ferriot C, Corvec S, Guillouzouic A, Gras-Leguen C, Launay E, Flamant C, Lepelletier D. 2021. *Enterobacter cloacae* complex outbreak in a neonatal intensive care unit: multifaceted investigations and preventive measures are needed. *J Hosp Infect* 116:87–90. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.07.012>.
- Eichel V, Papan C, Boutin S, Pöschl J, Heeg K, Nurjadi D. 2020. Alteration of antibiotic regimen as an additional control measure in suspected multi-drug-resistant *Enterobacter cloacae* outbreak in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 104:144–149. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.09.007>.
- Nurjadi D, Scherrer M, Frank U, Mutters NT, Heininger A, Späth I, Eichel VM, Jabs J, Probst K, Müller-Tidow C, Brandt J, Heeg K, Boutin S. 2021. Genomic investigation and successful containment of an intermittent common source outbreak of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* related to hospital shower drains. *Microbiol Spectr* 9:e0138021. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01380-21>.
- Chen HN, Lee ML, Yu WK, Lin YW, Tsao LY. 2009. Late-onset *Enterobacter cloacae* sepsis in very-low-birth-weight neonates: experience in a medical center. *Pediatr Neonatol* 50:3–7. [https://doi.org/10.1016/S1875-9572\(09\)60022-X](https://doi.org/10.1016/S1875-9572(09)60022-X).
- Kuboyama RH, de Oliveira HB, Moretti-Branchini ML. 2003. Molecular epidemiology of systemic infection caused by *Enterobacter cloacae* in a high-risk neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24:490–494. <https://doi.org/10.1086/502249>.
- Tresoldi AT, Padoveze MC, Trabasso P, Veiga JF, Marba ST, von Nowakonski A, Branchini ML. 2000. *Enterobacter cloacae* sepsis outbreak in a newborn unit caused by contaminated total parenteral nutrition solution. *Am J Infect Control* 28:258–261. <https://doi.org/10.1067/mic.2000.105286>.
- Mshana SE, Gerwing L, Minde M, Hain T, Domann E, Lyamuya E, Chakraborty T, Imirzalioglu C. 2011. Outbreak of a novel *Enterobacter* sp. carrying blaCTX-M-15 in a neonatal unit of a tertiary care hospital in Tanzania. *Int J Antimicrob Agents* 38:265–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.05.009>.
- Augusto LA, Bourgeois-Nicolaos N, Breton A, Barreault S, Alonso EH, Gera S, Faraut-Derouin V, Semaan N, De Luca D, Chaby R, Doucet-Populaire F, Tissieres P. 2021. Presence of 2-hydroxymyristate on endotoxins is associated with death in neonates with *Enterobacter cloacae* complex septic shock. *iScience* 24:102916. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102916>.
- Moreira CG, Herrera CM, Needham BD, Parker CT, Libby SJ, Fang FC, Trent MS, Sperandio V. 2013. Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host associations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:1470–1475. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215416110>.
- Bartholomew TL, Kidd TJ, Sá Pessoa J, Conde Álvarez R, Bengoechea JA. 2019. 2-Hydroxylation of *Acinetobacter baumannii* lipid A contributes to virulence. *Infect Immun* 87:e00066-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00066-19>.
- Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. 2012. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol* 7:887–902. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>.
- Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. 2019. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 32:e00002-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>.
- Stoesser N, Sheppard AE, Shakya M, Sthapit B, Thorson S, Giess A, Kelly D, Pollard AJ, Peto TE, Walker AS, Crook DW. 2015. Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. *J Antimicrob Chemother* 70:1008–1015. <https://doi.org/10.1093/jac/dku521>.
- Steffen G, Pietsch M, Kaase M, Gatermann S, Werner G, Fuchs S, Pfeifer Y, Schmitt W, Adam H, Eckmanns T, Haller S. 2019. Overestimation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit in Germany, 2015. *Pediatr Infect Dis J* 38:631–637. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002264>.
- Ulrich N, Gastmeier P, Vonberg RP. 2018. Effectiveness of healthcare worker screening in hospital outbreaks with Gram-negative pathogens: a

- systematic review. *Antimicrob Resist Infect Control* 7:36. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0330-4>.
28. Dalben M, Varkulja G, Basso M, Krebs VL, Gibelli MA, van der Heijden I, Rossi F, Duboc G, Levin AS, Costa SF. 2008. Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. *J Hosp Infect* 70:7–14. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.05.003>.
 29. Waters V, Larson E, Wu F, San Gabriel P, Haas J, Cimiotti J, Della-Latta P, Saiman L. 2004. Molecular epidemiology of Gram-negative bacilli from infected neonates and health care workers' hands in neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis* 38:1682–1687. <https://doi.org/10.1086/386331>.
 30. Brady MT. 2005. Health care-associated infections in the neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* 33:268–275. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2004.11.006>.
 31. Calil R, Marba ST, von Nowakonski A, Tresoldi AT. 2001. Reduction in colonization and nosocomial infection by multiresistant bacteria in a neonatal unit after institution of educational measures and restriction in the use of cephalosporins. *Am J Infect Control* 29:133–138. <https://doi.org/10.1067/mic.2001.114223>.
 32. Cadot L, Bruguère H, Jumas-Bilak E, Didelot MN, Masnou A, de Barry G, Cambonie G, Parer S, Romano-Bertrand S. 2019. Extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak reveals incubators as pathogen reservoir in neonatal care center. *Eur J Pediatr* 178:505–513. <https://doi.org/10.1007/s00431-019-03323-w>.
 33. Chavignon M, Reboux M, Tasse J, Tristan A, Claris O, Laurent F, Butin M. 2021. Persistent microbial contamination of incubators despite disinfection. *Pediatr Res* 90:1215–1220. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01407-8>.
 34. Doijad S, Imirzalioglu C, Yao Y, Pati NB, Falgenhauer L, Hain T, Foessel BU, Abt B, Overmann J, Mirambo MM, Mshana SE, Chakraborty T. 2016. *Enterobacter bugandensis* sp. nov., isolated from neonatal blood. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:968–974. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000821>.
 35. Pati NB, Doijad SP, Schultze T, Mannala GK, Yao Y, Jaiswal S, Ryan D, Suar M, Gwozdinski K, Bunk B, Mraheil MA, Marahiel MA, Hegemann JD, Spröer C, Goesmann A, Falgenhauer L, Hain T, Imirzalioglu C, Mshana SE, Overmann J, Chakraborty T. 2018. *Enterobacter bugandensis*: a novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. *Sci Rep* 8:5392. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23069-z>.
 36. Girlich D, Ouzani S, Emeraud C, Gauthier L, Bonnin RA, Le Sache N, Mokhtari M, Langlois I, Begasse C, Arangia N, Fournier S, Fortineau N, Naas T, Dortet L. 2021. Uncovering the novel *Enterobacter cloacae* complex species responsible for septic shock deaths in newborns: a cohort study. *Lancet Microbe* 2:e536–e544. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00098-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00098-7).
 37. World Health Organization. Disease Outbreaks. https://www.who.int/environmental_health_emergencies/disease_outbreaks/en/. World Health Organization, Cham, Switzerland.
 38. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0, 2018.
 39. Guérin F, Gravey F, Plésiat P, Aubourg M, Beyrouthy R, Bonnet R, Cattoir V, Giard JC. 2019. The transcriptional repressor SmvR is important for decreased chlorhexidine susceptibility in *Enterobacter cloacae* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e01845-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01845-19>.
 40. Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A. 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2797–2803. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2797-2803.2002>.
 41. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. 2000. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 38:1791–1796. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.5.1791-1796.2000>.
 42. Arahal DR. 2014. Whole-genome analyses: average nucleotide identity, p 103–122. In Goodfellow M, Sutcliffe I, Chun J (ed), *Methods in microbiology: new approaches to prokaryotic systematics*, Vol. 41. Elsevier Ltd., Academic Press, Oxford, England.
 43. Aronesty E. 2011. ea-utils: Command-line tools for processing biological sequencing data. <https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils>.
 44. Jackman SD, Vandervalk BP, Mohamadi H, Chu J, Yeo S, Hammond SA, Jahesh G, Khan H, Coombe L, Warren RL, Birol I. 2017. ABySS 2.0: resource-efficient assembly of large genomes using a Bloom filter. *Genome Res* 27:768–777. <https://doi.org/10.1101/gr.214346.116>.
 45. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J. 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31:3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>.
 46. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2010. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 5:e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>.
 47. Seemann T. 2018. snp-dists. Pairwise SNP distance matrix from a FASTA sequence alignment. <https://github.com/tseemann/snp-dists>.
 48. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. 2018. 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* 24:350–354. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.016>.

TROISIÈME ARTICLE

Comparative analysis of *Enterobacter bugandensis* genomes reveals lineage-specific gene differences and evidence their high virulence

Enrique Hernandez-Alonso, Nadège Bourgeois-Nicolaos, Adam Waalkes, Stephen J Salipante, Florence Doucet-Populaire

Cet article est en cours de préparation pour publication dans le journal **mBio**

Contexte

Le projet SENSE est né de l'importance d'étudier l'épidémiologie, le résistome et le virulome d'*Enterobacter* dans une collection multicentrique. L'étude nous permettrait de faire une grande collection de souches. Le résultat de cet objectif a été une collection de 88 souches. Au cours des premières années de ce travail, il a été conclu que *E. bugandensis* était une espèce particulière et que son virulome était différent de celui des autres espèces. De plus, notre équipe a collaboré avec l'Université de Washington, Seattle, USA, afin d'achever le séquençage du génome complet de notre collection. En 2021, nous avons obtenu les Drafts des génomes séquencés de notre collection d'*Enterobacter*. Pati *et al.*, ont mis en évidence le rôle de certains facteurs de virulence chez *E. bugandensis* (Pati *et al.*, 2018).

Notre laboratoire avait également démontré la présence et l'association du gène *lpxO* avec la mortalité dans les infections à *E. bugandensis*. Ces résultats préliminaires nous ont motivés à réaliser une analyse bioinformatique par génomique comparative à l'aide de divers outils bioinformatiques pour étudier les génomes d'*E. bugandensis*. A ce jour, 90 génomes d'*E. bugandensis* ont été rapportés dans la base de données GenBank, dont 6 génomes ont été téléchargés au cours de ce travail, à savoir les génomes d'*E. bugandensis* récupérés lors de l'épidémie à l'hôpital Antoine Béchère.

Pour la réalisation de cet article, nous avons utilisé les génomes d'*E. bugandensis*. Dans une première étape nous avons effectué la phylogénie et le sous-typage, dans une deuxième étape nous avons effectué la comparaison épidémiologique par polymorphisme de nucléotide simple (SNP) et wg-MLST pour l'observation du comportement phylogénétique dans les souches rapportées d'*E. bugandensis*. Dans une troisième étape nous avons procédé à l'identification des facteurs de virulence par génomique comparative. Ensuite, dans une quatrième phase, nous avons réalisé la

caractérisation du système de sécrétion de type VI (TSS6) chez *E. bugandensis* et enfin, la recherche de la présence du gène *lpxO* dans les génomes.

En résumé, nous avons réalisé une analyse suggérant que *E. bugandensis* possède différentes caractéristiques génomiques, facteurs de virulence et systèmes de sécrétion associés à sa pathogénicité et à sa virulence et qui pourraient expliquer son succès dans les infections néonatales.

1 **Comparative analysis of *Enterobacter bugandensis* genomes reveals lineage-**
2 **specific gene differences and evidence their high virulence**

3

4 Enrique Hernandez Alonso¹, Nàdege Bourgeois-Nicolaos^{1,2}, Adam Waalkes³, Stephen
5 J Salipante³, Florence Doucet-Populaire^{1,2}.

6

7 ¹Institute of Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS, CEA, Paris Saclay
8 University, Gif sur Yvette, France.

9 ²Department of Bacteriology-Hygiene, AP-HP Paris Saclay University, Hôpital
10 AntoineBéclère, Clamart, France

11 ³Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington, Seattle,
12 Washington, USA.

13

14 ***Corresponding author:** Pr Florence Doucet-Populaire.

15 AP-HP Université Paris Saclay, Hôpital Antoine Béclère, Service de Bactériologie-
16 Hygiène, Clamart, France. Electronic address: florence.doucet-populaire@aphp.fr.

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30 **Abstract.** *Enterobacter bugandensis* is considered the most virulent pathogen of the
31 genus *Enterobacter*. However, its epidemiology and mechanisms of pathogenicity are
32 unclear. The aim of this study was the characterization of 119 genomes of *E.*
33 *bugandensis*, including a collection of 35 genomes of strains responsible for
34 bloodstream infection in neonatal patients. Pan-genome analysis of the clinical isolates
35 shows that *E. bugandensis* contains 9561 pag-genes including 2192 core genes and
36 between 653 and 1753 accessory genes. Phylogenetic analysis shows the presence
37 of five clusters in the population of the 119 *E. bugandensis* genomes, four of which are
38 associated with the hospital environment and bloodstream infections and one
39 environmental cluster. Analysis by SNP and wg-MLST shows similarities and classical
40 MLST provides no evidence for epidemiology. Virulence-associated gene prediction
41 showed the presence of 14 families associated with adherence, immune system
42 evasion and iron uptake, similar to those of *Salmonella* and *E. coli* pathogens.
43 Characterization of the type 6 secretion system showed a functional system similar to
44 that of *P. aureuginosa* in *E. bugandensis*. The analysis of antibiotic resistance in the
45 strains sequenced in our laboratory shows no resistance mechanisms acquired or
46 mobilized by plasmids. In conclusion, our results suggest that *E. bugandensis* has
47 different genomic characteristics, virulence factors, and secretion systems associated
48 with its pathogenicity and virulence and that could explain its success in neonatal
49 infections.

50

51 **Introduction**

52

53 *Enterobacter bugandensis* was identified as a new species of the genus *Enterobacter*
54 during a neonatal outbreak with a case fatality rate of 35% (1) and is currently

55 considered to be the most pathogenic member of the genus (2). *E. bugandensis* has
56 recently been reported to cause life-threatening infections in immunocompromised
57 patients, such as bacteremia and neonatal sepsis (2, 3). Despite its importance at the
58 clinical level, the pathogenic mechanisms that favor its success in infectious processes
59 are poorly understood (4). The pathogenicity of *E. bugandensis* depends on a variety
60 of virulence factors such as adherence, biofilm, secretion systems, capsular
61 polysaccharides, lipid A composition, evasion of the immune response and the ability
62 to acquire iron (2). The presence of invasive proteins that facilitate persistence,
63 colonization and invasion such as adhesins are necessary for the virulence of
64 pathogens such as *Salmonella* (5, 6) and pathotypes of *E. coli* (7-9). However, the
65 presence of invasion mechanisms in *Enterobacter* species has not been studied in
66 depth. In addition, previous studies have reported the presence of potential virulence
67 factors in *Enterobacter* such as secretion systems (10). In this context, the whole
68 genome sequencing has become a powerful tool for bacterial molecular typing and
69 subtyping, as well as the prediction and identification of potential virulence factors (11-
70 13). The aim of this work was to perform a comparative analysis of genomes available
71 in the Genbank database and 35 *E. bugandensis* strains responsible for neonatal
72 sepsis sequenced in our laboratory for characterization of genomic content, subtyping,
73 and potential virulence factors prediction. The assemblage of results suggests the
74 presence of numerous virulence factors that make this bacteria an important pathogen
75 emergent that should be routinely identified in the hospital setting for infection
76 prevention.

77

78 **Results**

79

80

81 **General features of *E. bugandensis* genomes.** The average size of the 118
82 genomes of *E. bugandensis* was 4.99 ± 0.42 Mb ($4\,770 \pm 0.14$ base pairs) and 55.970
83 $\pm 0.18\%$ of G+C content. Among the 35 *E. bugandensis* genomes sequenced for this
84 study, we identified a genome size between 4.3 and 6.7 Mb which corresponds to a
85 range of 4 324 192 to 6 174 429 base pairs and a GC content between 56.1 and 64.2%.
86 In our collection of 35 *E. bugandensis* strains, we identified between 3935 and 4666
87 CDC, while the number of rRNA was between 1 and 13 and the range of tRNA was
88 between 24 and 90 and in 18 strains only one tmRNA was identified.

89

90 **Precise species identification by ANI.** To confirm precise identification to species
91 level, we performed the average nucleotide identity (ANI) analysis based on the whole
92 genome on the 35 strains used for this study. The ANI analysis confirmed that all 35
93 clinical strains used in this study belonged to *E. bugandensis*. The range of ANI values
94 was between 97.94 and 100.00%. All values were higher than the species level cut-off
95 point for ANI (95%) indicating good consistency with the reference strain genome and
96 low interspecific variation between each genome pair (**FIG 1**).

97

98 **Pan-genome analysis.** Pan-genome analysis showed that the 35 strains of *E.*
99 *bugandensis* contain 9561 genes, including 2192 core genes and between 653 and
100 1753 accessory genes (**FIG 2**). Our analysis of the total number of genes and related
101 gene clusters shows that *E. bugandensis* has an open pan-genome.

102

103 ***E. bugandensis* genomes information.** A total of 119 *E. bugandensis* genomes were
104 studied. Among the 35 *Enterobacter* strains isolated in our laboratory, 30 of them

105 (identified by ECH and S), were isolated from neonatal patients in France and 5
106 (identified by UW) were isolated from adult patients in USA. In addition, 84 genomes
107 were retrieved from the GenBank database. The origin of isolation is diverse, however,
108 67.8% (57/84) of the strains were associated with the hospital environment. Of the 57
109 hospital-associated strains, 28.0% (16/57) were isolated from blood cultures (**FIG 3**).
110 The genomes analyzed were isolated between 1999 and 2020 in different countries
111 (Brazil, China, France, Germany, India, Israel, Japan, Nigeria, Tanzania, United
112 Kingdom, USA). The classical MLST analysis showed the presence of 31 different STs,
113 with a prevalence of ST1070 and ST431.

114

115 **Subtyping of *E. bugandensis*.** Molecular analysis by SNPs in the *E. bugandensis*
116 genome population showed 5 distinct phylogenetic clusters (I-V) (**FIG 3 (A)**). Cluster II
117 contain the reference strain EB-247, which was isolated during an outbreak in the NICU
118 in Tanzania. These cluster contain 3 strains isolated from the environment and the rest
119 associated with the hospital environment. Cluster I is the largest (33 strains) and
120 contains two strains of environmental origin. Cluster III contains 2 strains of
121 environmental origin. Cluster III was mainly associated with strains of environmental
122 origin (international space station). Finally, Cluster IV was associated exclusively with
123 strains of clinical origin.

124

125 **Comparison of SNP and cgMLST.** We applied both methods to observe the behavior
126 of the *E. bugandensis* population (**Fig. 3**). The cgMLST analysis showed five
127 phylogroups (I-V) as did the SNP analysis described in the previous section, however,
128 strain 217_ECLO and EB-247 are outside their SNP group. These differences between
129 the SNP and cgMLST analysis observed are due to a combination of factors. Unlike

130 SNP analysis, a cgMLST scheme does not include intergenic regions and only one
131 allelic change is counted when there are multiple nucleotide changes within the same
132 gene. On the other hand, short insertions or deletions are ignored by many SNP
133 analyses but captured by the cgMLST scheme because they change gene sequences
134 (21). Visual analysis of both trees confirms that the *E. bugandensis* population is
135 composed of 5 clusters and is congruent in both cases.

136

137 **Virulence factors related genes prediction.** A total of 14 virulence factors groups
138 were predicted in the genomes of *E. bugandensis* (**FIG 4**). Analysis of *E. bugandensis*
139 genomes showed the presence of orthologs of the *csgBAC* and *csgDEFG* operon.
140 Orthologs of structural components related to intestinal adhesion and persistence such
141 as *lpf* (long polar fimbriae), Type 1 fimbriae and the fimbrial operon *bcf* were also
142 identified. We identified a MisL-like adhesine protein with an amino acid identity of
143 70%. In addition, as in SPI3, the MisL ortholog gene present in *E. bugandensis* is
144 preceded by an ortholog of the *rmbA* gene with 52.6% similarity, as in the genetic
145 arrangement of SPI3. In addition, a duplicated 18 amino acid region rich in Pro, Asp
146 and Val, which was also identified in the *E. bugandensis* orthologue. Orthologue of the
147 CFA/I pili type IV pili called hemorrhagic *E. coli* pili (HCP) was also identified. The
148 *iucABCD-iutA* gene cluster encoding for aerobactin and its receptor also was
149 predicted. Gene cluster encoding for enterobactin siderophore Ent, the locus *iroA* (*iroB*,
150 *iroC*, *iroD*, *iroE*, *iroN*), and *chuA*, *chuS* and *chuU* genes were also predicted.

151

152 **2-hydroxymyristic in lipid A associated with virulence.** Recently our team
153 demonstrated that the presence of 2-hydroxymyristic acid (2HM) as a secondary
154 substituent in lipid A due to *lpxO* gene, is associated with sudden death due to sepsis

155 in very low birth weight neonates (68). Our analysis showed the presence of a *lpxO*
156 gene homologue in 30 genomes (**FIG 4**). Interestingly, the *lpxO* gene was only
157 identified in clusters I, II and III. The homology between *lpxO* in *E. bugandensis* and
158 *Salmonella* is from 75.47% to 75.91%. Two alleles of *lpxO* were identified in the
159 genomes of *E. bugandensis* with a homology between them of 95.93%. The correlation
160 between the presence of 2HM and patient death in the genomes analyzed was 21.7%
161 (5/23).

162

163 **Secretion systems characterization.** Genomic analysis showed the presence of
164 components of type I and type II secretion systems in all *E. bugandensis* genomes,
165 Overall, in 55 of 57 strains the minimal functional components were present (**FIG 5**
166 **(A)**). *tssJ*, *tssK*, *tssL*, and *tssM* were absent in strain GN05729 and *PppA*, *hsiE1*, *tagJ*,
167 *tssE* were absent in strain WCHEB090029. However, it is interesting to highlight that
168 2 and in some cases 3 T6SS loci were identified in all genomes. Genomic analysis
169 showed the constant presence of the T6SS structure from the membrane complex
170 (*tssJ/L/M*) to the spike complex (VrgG and PAAR), furthermore bioinformatic analysis
171 of the structure of VgrG and PAAR (**FIG 5 (D-F)**) showed the functional structure of the
172 complex. In 89.4% (51/57) of the T6SS, the protein serine/threonine phosphatase
173 (PppA) and serine/threonine kinase ppkA, a regulatory system via threonine
174 phosphorylation (TTP) associated with T6SS regulation, were identified

175

176 **Antimicrobial resistance analysis.** Three factors associated with antibiotic
177 resistance were predicted in the 30 genomes of clinical isolates: AmpC β -lactamase
178 (ACT), FosA and efflux pumps (*oxq*, *arc*, *emr*, *mar*, *ram*). In six strains: ECH4 (ACT-
179 77); ECH7 (ACT-77); ECH5 (ACT-78); ECH9 (ACT-80); ECH10 (ACT-81); ECH27

180 (ACT-82), ACT alleles were confirmed with an identity of 100%. All other strains have
181 an allele close to ACT-49. The *fosA* gene is a phosphomycin thiol transferase that
182 inactivates the antibiotic fosfomycin. The efflux pumps are chromosomal genes and
183 are directly involved with decreased susceptibility to antibiotics and antiseptics. All
184 three predicted antibiotic resistance mechanisms are common to all strains tested. No
185 plasmid-mediated mechanism or extended-spectrum β -lactamases were observed.
186 Strains S9, S17, and S41 were resistant to cefotaxime; S9 and S41 were also resistant
187 to piperacillin/tazobactam; S20, S30, S37, S42, S54, and S59 were resistant to
188 chloramphenicol, and all strains were resistant to colistin. Resistance to cefotaxime
189 was due to overexpression of cephalosporinase ACT. All other strains were
190 susceptible to the antibiotics tested cefotaxime, cefepime, meropenem,
191 piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin, gentamicin, and chloramphenicol.

192

193 **Discussion**

194 *E. bugandensis* has been identified as the most virulent species of the *Enterobacter*
195 genus (1). In this context, we have recently reported that it is a highly prevalent bacteria
196 in the NICU (14) and is responsible for numerous outbreaks (1, 4). However, the
197 mechanisms associated with its high prevalence, colonization, and infection in
198 neonates are unclear. In an effort to understand the interaction of this pathogen with
199 host, we set out to delve into the genomic content of this pathogen for its molecular
200 characterization and to predict virulence factor-related genes by comparative genomic
201 analysis.

202 Bacteria have evolved different specialized strategies to adapt to the environment
203 including host cells. The curli system encoded in the *csgBAC* operon in
204 *Enterobacteriales* such as *Salmonella* and *E. coli*, also known as the type VIII secretion

205 system, is responsible for the secretion of curli subunits to form unbranched and highly
206 aggregative cell-associated amyloid fibrils (15, 16). The formation of these fibrils
207 promotes the formation of biofilms that protect bacteria from physical and chemical
208 stress, host immune response, and antimicrobial agents (17-19). These biofilms play
209 a crucial role in infectious diseases, such as venous catheter sepsis, prosthetic valve
210 infective endocarditis, and catheter-associated urinary tract infections (20, 21). The
211 identification of both the *csgD* regulatory operon and the *csgBAC* operon (22) in the *E.*
212 *bugandensis* genome suggests the presence of a functional curli secretion system.
213 Similarly, the presence of structural components such as *lpf*, type 1 fimbriae, and the
214 fimbrial *bcf* suggests that *E. bugandensis* may behave similarly to *Salmonella* and *E.*
215 *coli* pathogens in its adaptation and stress response mechanisms.

216 The prediction of a CFA/I and HCP orthologue could explain the mechanisms of
217 pathogenicity of some *Enterobacter* species, particularly *E. bugandensis*. On the one
218 hand, the CFA/I pili mediates the adherence of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) to
219 intestinal epithelial cells (23). On the other hand, type IV pili (HCP), expressed in
220 enterohemorrhagic *E. coli* enterohemorrhagic (EHEC) O157:H7 (16), mediates
221 different phenomena associated with pathogenicity, such as adherence to human
222 epithelial cells, epithelial cell invasion, erythrocyte hemagglutination, biofilm formation,
223 spasmodic motility, and specific binding to laminin and fibronectin (16). These data
224 suggest that *E. bugandensis* shares similar pathogenicity mechanisms to *E. coli*
225 pathogens.

226 Adhesion to the intestinal wall is one of the characteristic virulence mechanisms of
227 pathogens. The *misL* gene encodes an adhesin (25, 26) identified in *Salmonella*
228 pathogenicity island 3 (SPI3). Its product has similarity to the family of immunoglobulin
229 A1 self-transporting proteases that have been identified only in pathogenic bacteria

230 that mediate functions important for host-pathogen interactions (26, 27). Characterization
231 of MisL in in vivo models showed that it is necessary for intestinal colonization (27).
232 MisL binds to fibronectin and collagen promoting adhesion and invasion of host
233 intestinal epithelial cells (27). The MisL adhesin ortholog present in 94.9% of the
234 genomes analyzed suggests that *E. bugandensis* may employ a mechanism of
235 intestinal colonization in humans similar to *Salmonella*.

236 Prl is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes*
237 that is essential for evading the neutrophil immune response (28, 37). Helicobacter
238 pylori urease is an important colonization factor contributing to acid resistance,
239 epithelial cell damage, chemotactic behavior and nitrogen metabolism (38). The
240 presence of both virulence factors and the B and G subunits of urease, essential for
241 gastric colonization by *H. pylori* (39), identified in *E. bugandensis* could explain the
242 successful colonization and early persistence in newborns.

243 Iron is a nutrient necessary for bacterial growth and multiplication in host tissue (40).
244 The availability of this nutrient in the host is limited as most of it is predominantly found
245 in heme proteins or sequestered by ferritin. Pathogenic bacteria, such as pathogenic
246 *E. coli*, have developed different strategies to acquire this nutrient (41). One of the
247 most important mechanisms, is the synthesis of siderophores, iron chelating proteins
248 due to their high affinity for this nutrient. On the one hand, aerobactin is a siderophore
249 expressed in *E. coli* strains isolated from patients with urinary tract infection,
250 bacteremia or extraintestinal infections (42). This siderophore and its receptor encoded
251 in the *iucABCD-iutA* gene cluster were originally identified in a highly pathogenic
252 *Yersinia* island. On the other hand, Enterobactin (Ent), is considered the prototype
253 siderophore because of its high affinity for iron (43, 44), together with the salmochelins
254 (glycosylated forms of Ent) encoded by the *iroA* locus (*iroB*, *iroC*, *iroD*, *iroE*, *iroN*). The

255 presence of these three siderophores and their regulators suggests a functional iron
256 uptake system in *E. bugandensis* and support the hypothesis that this pathogen has
257 sufficient capacity and mechanisms to install and develop in the host. Interestingly, the
258 *iroA* loci is partially absent in clusters 3 and 4, which were mainly associated with
259 strains of environmental origin.

260 Several studies have shown that in uropathogenic *E. coli* iron transport depends on
261 TonB and its accessory proteins ExbB and ExbD, which are required for virulence in
262 pathogens such as *S. dysenteriae* (45), *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and
263 *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (46), *Vibrio cholerae* (47), *Pseudomonas*
264 *aeruginosa* (48) or *Haemophilus influenzae* (49). Mutations of *tonB* give rise to an
265 avirulent phenotype. These orthologs together with the siderophores identified in *E.*
266 *bugandensis* follow the presence of a highly efficient iron uptake system in *E.*
267 *bugandensis*.

268 Another method of iron acquisition is the direct utilization of host iron sources, e.g.,
269 hemoglobin, transferrin, lactoferrin and the heme group. In *E. coli* O157:H7, the *chuA*
270 gene, which codes for a 69 KDa outer membrane protein responsible for the uptake of
271 the heme group (50), is part of a locus called heme transporter, which is widely
272 distributed among pathogenic strains of *E. coli* (51). The presence of orthologs of the
273 *chuA*, *chuS*, and *chuU* genes and the siderophores aerobactin, Ent, IroA, and pioverdin
274 in *E. bugandensis* suggests that this pathogen has both iron uptake mechanisms. The
275 ability to utilize heme and hemoglobin is an advantage for pathogens, which often
276 secrete cytotoxins to access the intracellular pool of heme and thus initiate tissue
277 invasion (52).

278 Structural modifications of the LPS of gram-negative bacteria not only have an effect
279 on the permeability of the outer membrane, but also on evasion of recognition by the

280 immune system (53). The association between lipid A modification by the LpxO
281 enzyme and virulence in gram-negative bacteria has also been evidenced in
282 *Salmonella* (54), *Acinetobacter* (55), and *Klebsiella* (56). LpxO is an Fe²⁺/α-
283 ketoglutarate-dependent dioxygenase encoded by the *lpxO* gene (57). Here, our
284 analysis showed the presence of one *lpxO* homologue in 30 of the 119 genomes
285 analyzed. Interestingly, *lpxO* is absent in cluster V. Our results suggest that *lpxO* is not
286 present in all *E. bugandensis* genomes although it localizes to one chromosomal locus.
287 These results could be associated with differences in outbreaks by these bacteria,
288 some being more fatal than others.

289 Bacteria have developed different molecular mechanisms for the transfer of virulence
290 determinants across the cell membrane, such as the secretion systems (I-VI) identified
291 in gram-negative bacteria (58). The type VI secretion system (T6SS) is a molecular
292 machinery that transfers effector proteins into eukaryotic and prokaryotic cells (59, 60).
293 The effectors delivered by the T6SS include antibacterial proteins, eukaryotic effectors
294 acting on the cell cytoskeleton, and toxins such as DNAases, phospholipases, and
295 NAD⁺ hydrolases (61-63). Genomic analysis showing the presence from the
296 membrane complex to the spike complex suggests a functional structure of the
297 complex. Taken together, these findings show that the *E. bugandensis* genome
298 encodes a functional T6SS different from that of other *Enterobacter* species (64) that
299 could play an important role in the virulence of this pathogen. In contrast to other
300 *Enterobacter* species (64), we identified the presence of two probable T6SS regulatory
301 pathways in *E. bugandensis* mediated by PppA and ppKA that have been reported in
302 the H1-T6SS regulatory system of *P. aeruginosa* (65, 66). This suggests that the T6SS
303 of *E. bugandensis* may be a similar functional homolog to that of *P. aeruginosa*.

304 Some studies have evidenced the presence of BLSE in *E. bugandensis*, however our
305 analysis in the clinical strains sequenced in our laboratory do not show any acquired
306 mechanism of resistance. However, the presence of numerous efflux pumps identified
307 in the genomes of *E. bugandensis* could be mainly associated with resistance to
308 antiseptics used in the NICU such as benzalkonium chloride, which could explain the
309 numerous outbreaks of *E. bugandensis*.

310 In conclusion, *E. bugandensis* genomes analysis reveals key information about its
311 epidemiology, phylogenetic evolution, and virulence, all of these necessary for the
312 success of this pathogen in the hospital environment. However, further functional
313 studies are required to validate the findings reported here.

314

315 **Methods**

316

317 **Strains data.** In a multi-centre study of *Enterobacter*, thirty-five clinical strains isolated
318 from blood cultures of neonatal (n=30) and adult patients (n=5) hospitalized in different
319 hospitals in France and the USA were selected. The strains were identified as *E.*
320 *bugandensis* by *dnaJ* analysis (14). These thirty-five clinical strains, together with
321 eighty-four *E. bugandensis* genomes available in the National Center for Biotechnology
322 Information (NCBI) genome sequence repository database
323 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) were included in this study.

324

325 **Genome sequencing.** The genomes were sequenced and assembled in our
326 laboratory and deposited in the database under project number PRJNA224116.
327 Sequencing details were published previously (14).

328

329 **Average Nucleotide Identity (ANI) analysis.** The pairwise distance of thirty-five
330 clinical strains of *E. bugandensis* was evaluated at the genomic level using the EB-247
331 genome as reference for precise species assignment by ANI. ANI values were
332 calculated using ANI calculator web server (67). Strains with a cutoff >95% were
333 considered as the same species.

334

335 **Pan-genome analysis.** The genomes of the thirty-five clinical strains of *E.*
336 *bugandensis* were annotated using Prokka. The annotated files were then collected in
337 a local database. Pan-genome analysis was performed using Roary software and the
338 presence and absence of pan-genome genes were visualized using phandango
339 available at <http://phandango.net>.

340

341 **SNPs and wg-MLST analysis.** The single nucleotide polymorphism (SNP)-based CSI
342 phylogeny Web server (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny>) was applied
343 with default setting (68). This method maps each contig against a reference genome
344 using BWA v. 0. 7.2. Subsequently, SNPs are called using SAMtools v. 0.1.18 eluting
345 SNPs within 10 bases of each other. Finally, CSI returns a newick file for tree
346 visualization. We use the *E. bugandensis* EB-247 strain as a reference genome. The
347 PGADB web server was used to perform the cg- and wgMLST analysis by gene by
348 gene. For this analysis, 3538 and 12 852 loci were considered for the core- and whole-
349 genome, respectively. All trees in this work were visualized and annotated using iTOL
350 (74).

351

352 **Virulence factors analysis.** The Virulence Factor Database (VFDB,
353 <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) was used to search virulence-related genes of *E.*
354 *bugandensis*.

355

356 **T6SS analysis.** For BLAST searches, we used 50% and 80% identity and coverage
357 thresholds, respectively. Homologous gene analysis was performed manually using
358 Clustal Omega and BLASTn. The genes with query coverage higher than 70% and
359 similarities higher than 50% were taken as homologs.

360

361 **Antimicrobial resistance analysis.** The Comparative Antibiotic Research Database
362 (CARD) was carried out to predict the antibiotic resistance genes of *E. bugandensis*.
363 Blast + parameters were a percentage of sequence identity and coverage $\geq 80\%$. In
364 vitro susceptibility in thirty clinical strains (called S and ECH) was carried out by micro
365 broth minimum inhibitory concentration (MIC) method by triplicate using the *E. cloacae*
366 ATCC 13047 as an internal control. The results were interpreted according to the
367 EUCAST.

368

369 **Ethics approval.** The study was approved by the ethical committee of the French
370 Society of Intensive Care (CE SRLF 19–40).

371

372 **Data availability.** The genome sequencing data are publicly available at the NCBI
373 GenBank under the BioProject accession number [PRJNA770343](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA770343)

374

375 **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

376 SUPPLEMENTAL FILE 1

377

378 **ACKNOWLEDGEMENTS.** This work was supported by AP-HP, Dim-One health
379 program and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia, México with a fellowship
380 to E. H. A. from CONACYT (2019-000004-01EXTF-00028). The founders had no role
381 in study design, interpretation, or the decision to submit the work for publication.

382

383 **References**

384

385 1. Doijad S, Imirzalioglu C, Yao Y, Pati NB, Falgenhauer L, Hain T, Foessel BU, Abt B,
386 Overmann J, Mirambo MM, Mshana SE, Chakraborty T. *Enterobacter bugandensis* sp.
387 nov., isolated from neonatal blood. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016 Feb;66(2):968-974.
388 doi: 10.1099/ijsem.0.000821. Epub 2015 Dec 4. PMID: 26637818.

389 2. Falgenhauer J, Imirzalioglu C, Falgenhauer L, Yao Y, Hauri AM, Erath B,
390 Schwengers O, Goesmann A, Seifert H, Chakraborty T, Doijad S. Whole-Genome
391 Sequences of Clinical *Enterobacter bugandensis* Isolates from Germany. *Microbiol*
392 *Resour Announc*. 2019 Jul 18;8(29):e00465-19. doi: 10.1128/MRA.00465-19. PMID:
393 31320432; PMCID: PMC6639611.

394 3. Pati NB, Doijad SP, Schultze T, Mannala GK, Yao Y, Jaiswal S, Ryan D, Suar M,
395 Gwozdziński K, Bunk B, Mraheil MA, Marahiel MA, Hegemann JD, Spröer C,
396 Goesmann A, Falgenhauer L, Hain T, Imirzalioglu C, Mshana SE, Overmann J,
397 Chakraborty T. *Enterobacter bugandensis*: a novel enterobacterial species associated
398 with severe clinical infection. *Sci Rep*. 2018 Mar 29;8(1):5392. doi: 10.1038/s41598-
399 018-23069-z. PMID: 29599516; PMCID: PMC5876403.

400 4. Girlich D, Ouzani S, Emeraud, C, Gauthier L, Bonnin RA, Mokhtari M, Langlois I,
401 Begasse C, Arangia N, Fournier S, Fortineau N, Naas T, Le Sache N, Dortet L. 2021.

402 Uncovering the novel *Enterobacter cloacae* complex species responsible for septic
403 shock deaths in newborns: a cohort study. *The Lancet Microbe* 2: e536–e544.
404 [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(21\)00098-7](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(21)00098-7)

405 5. Dorsey CW, Laarakker MC, Humphries AD, Weening EH, Bäumler AJ. *Salmonella*
406 *enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds
407 fibronectin. *Mol Microbiol.* 2005 Jul;57(1):196-211. doi: 10.1111/j.1365-
408 2958.2005.04666.x. PMID: 15948960.

409 6. Tükel C, Akçelik M, de Jong MF, Simsek O, Tsolis RM, Bäumler AJ. MarT activates
410 expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica* serotype
411 Typhimurium. *J Bacteriol.* 2007 May;189(10):3922-6. doi: 10.1128/JB.01746-06. Epub
412 2007 Mar 9. PMID: 17351045; PMCID: PMC1913337.

413 7. Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Ledesma MA, Jordan DM, Francetic O,
414 Kaper JB, Puente JL, Girón JA. Intestinal adherence associated with type IV pili of
415 enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Invest.* 2007 Nov;117(11):3519-
416 29. doi: 10.1172/JCI30727. Erratum in: *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):820. PMID:
417 17948128; PMCID: PMC2030454.

418 8. Ledesma MA, Ochoa SA, Cruz A, Rocha-Ramírez LM, Mas-Oliva J, Eslava CA,
419 Girón JA, Xicohtencatl-Cortes J. The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli*
420 O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial
421 cells. *PLoS One.* 2010 Aug 12;5(8):e12127. doi: 10.1371/journal.pone.0012127.
422 PMID: 20711431; PMCID: PMC2920817.

423 9. Jansson L, Tobias J, Lebens M, Svennerholm AM, Teneberg S. The major subunit,
424 CfaB, of colonization factor antigen i from enterotoxigenic *Escherichia coli* is a
425 glycosphingolipid binding protein. *Infect Immun.* 2006 Jun;74(6):3488-97. doi:
426 10.1128/IAI.02006-05. PMID: 16714580; PMCID: PMC1479271.

427 10 Harada, K. et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial
428 resistance in *Enterobacter* spp. isolates from companion animals in Japan. *Plos One*.
429 12, e0174178 (2017).

430 11. Mustafa A, Ibrahim M, Rasheed MA, Kanwal S, Hussain A, Sami A, Ahmed R, Bo
431 Z. Genome-wide Analysis of Four *Enterobacter cloacae* complex type strains: Insights
432 into Virulence and Niche Adaptation. *Sci Rep*. 2020 May 18;10(1):8150. doi:
433 10.1038/s41598-020-65001-4. PMID: 32424332; PMCID: PMC7235008.

434 12. Lin JN, Lai CH, Yang CH, Huang YH, Lin HH. Genomic features, phylogenetic
435 relationships, and comparative genomics of *Elizabethkingia anophelis* strain EM361-
436 97 isolated in Taiwan. *Sci Rep*. 2017 Oct 30;7(1):14317. doi: 10.1038/s41598-017-
437 14841-8. PMID: 29085032; PMCID: PMC5662595.

438 13. Matteoli FP, Passarelli-Araujo H, Pedrosa-Silva F, Olivares FL, Venancio TM.
439 Population structure and pangenome analysis of *Enterobacter bugandensis* uncover
440 the presence of blaCTX-M-55, blaNDM-5 and blaIMI-1, along with sophisticated iron
441 acquisition strategies. *Genomics*. 2020 Mar;112(2):1182-1191. doi:
442 10.1016/j.ygeno.2019.07.003. Epub 2019 Jul 4. PMID: 31279858.

443 14. Hernandez-Alonso E, Barreault S, Augusto LA, Jatteau P, Villet M, Tissieres P,
444 Doucet-Populaire F, Bourgeois-Nicolaos N; SENSE Group. dnaJ: a New Approach to
445 Identify Species within the Genus *Enterobacter*. *Microbiol Spectr*. 2021 Dec
446 22;9(3):e0124221. doi: 10.1128/Spectrum.01242-21. Epub 2021 Dec 22. PMID:
447 34937187; PMCID: PMC8694106.

448 15. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark
449 S, Hultgren SJ. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber
450 formation. *Science*. 2002 Feb 1;295(5556):851-5. doi: 10.1126/science.1067484.
451 PMID: 11823641; PMCID: PMC2838482.

- 452 16. Cao B, Zhao Y, Kou Y, Ni D, Zhang XC, Huang Y. Structure of the nonameric
453 bacterial amyloid secretion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Dec
454 16;111(50):E5439-44. doi: 10.1073/pnas.1411942111. Epub 2014 Dec 1. PMID:
455 25453093; PMCID: PMC4273326.
- 456 17. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural
457 environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):95-108. doi:
458 10.1038/nrmicro821. PMID: 15040259.
- 459 18. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends*
460 *Microbiol*. 2005 Jan;13(1):20-6. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.006. PMID: 15639628.
- 461 19. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial
462 biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:85-105. doi: 10.1007/978-3-540-
463 75418-3_5. PMID: 18453273.
- 464 20. Khabbaz RF, Moseley RR, Steiner RJ, Levitt AM, Bell BP. Challenges of infectious
465 diseases in the USA. *Lancet*. 2014 Jul 5;384(9937):53-63. doi: 10.1016/S0140-
466 6736(14)60890-4. Epub 2014 Jul 1. PMID: 24996590; PMCID: PMC7137922.
- 467 21. White AP, Gibson DL, Collinson SK, Banser PA, Kay WW. Extracellular
468 polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica*
469 serovar enteritidis. *J Bacteriol*. 2003 Sep;185(18):5398-407. doi:
470 10.1128/JB.185.18.5398-5407.2003. PMID: 12949092; PMCID: PMC193744.
- 471 22. Zakikhany K, Harrington CR, Nimtz M, Hinton JC, Römling U. Unphosphorylated
472 CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol*
473 *Microbiol*. 2010 Aug;77(3):771-86. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07247.x. Epub 2010
474 Jun 9. PMID: 20545866.
- 475 23. Madhavan TPV, Riches JD, Scanlon MJ, Ulett GC, Sakellaris H. Binding of CFA/I
476 Pili of Enterotoxigenic *Escherichia coli* to Asialo-GM1 Is Mediated by the Minor Pilin

477 CfaE. *Infect Immun.* 2016 Apr 22;84(5):1642-1649. doi: 10.1128/IAI.01562-15. PMID:
478 26975993; PMCID: PMC4862694.

479 24. Ledesma MA, Ochoa SA, Cruz A, Rocha-Ramírez LM, Mas-Oliva J, Eslava CA,
480 Girón JA, Xicohtencatl-Cortes J. The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli*
481 O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial
482 cells. *PLoS One.* 2010 Aug 12;5(8):e12127. doi: 10.1371/journal.pone.0012127.
483 PMID: 20711431; PMCID: PMC2920817.

484

485

486 25. Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA. The SPI-3 pathogenicity
487 island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 1999 Feb;181(3):998-1004. doi:
488 10.1128/JB.181.3.998-1004.1999. PMID: 9922266; PMCID: PMC93469.

489 26. Oomen CJ, van Ulsen P, van Gelder P, Feijen M, Tommassen J, Gros P. Structure
490 of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J.* 2004 Mar
491 24;23(6):1257-66. doi: 10.1038/sj.emboj.7600148. Epub 2004 Mar 11. PMID:
492 15014442; PMCID: PMC381419.

493 27. Dorsey CW, Laarakker MC, Humphries AD, Weening EH, Bäumlér AJ. *Salmonella*
494 *enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds
495 fibronectin. *Mol Microbiol.* 2005 Jul;57(1):196-211. doi: 10.1111/j.1365-
496 2958.2005.04666.x. PMID: 15948960.

497 28. Terao Y, Yamaguchi M, Hamada S, Kawabata S. Multifunctional glyceraldehyde-
498 3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from
499 neutrophils. *J Biol Chem.* 2006 May 19;281(20):14215-23. doi:
500 10.1074/jbc.M513408200. Epub 2006 Mar 24. PMID: 16565520.

501 29. Winram SB, Lottenberg R. The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci
502 is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Microbiology (Reading)*.
503 1996 Aug;142 (Pt 8):2311-20. doi: 10.1099/13500872-142-8-2311. PMID: 8760943.

504 30. Bury-Moné S, Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H. The *Helicobacter pylori* Urel
505 protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its
506 activity and for acid activation. *Mol Microbiol*. 2001 Nov;42(4):1021-34. doi:
507 10.1046/j.1365-2958.2001.02689.x. PMID: 11737644.

508 30. Eaton KA, Gilbert JV, Joyce EA, Wanken AE, Thevenot T, Baker P, Plaut A, Wright
509 A. In vivo complementation of *ureB* restores the ability of *Helicobacter pylori* to
510 colonize. *Infect Immun*. 2002 Feb;70(2):771-8. doi: 10.1128/IAI.70.2.771-778.2002.
511 PMID: 11796610; PMCID: PMC127652.

512 41. Ellermann M, Arthur JC. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of
513 host-bacterial interactions. *Free Radic Biol Med*. 2017 Apr;105:68-78. doi:
514 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.489. Epub 2016 Oct 22. PMID: 27780750; PMCID:
515 PMC5401654.

516 42. Kresse AU, Rienäcker I, Valle AM, Steinrück H, Claus H, Payne SM, Tschäpe H,
517 Williams PH, Reissbrodt R. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 and non-O157
518 serovars differ in their mechanisms for iron supply. *Int J Med Microbiol*. 2007
519 Feb;297(1):9-15. doi: 10.1016/j.ijmm.2006.11.002. Epub 2007 Jan 16. PMID:
520 17224306.

521 43. Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans*.
522 2002 Aug;30(4):691-6. doi: 10.1042/bst0300691. PMID: 12196166.

523 44. Lin H, Fischbach MA, Liu DR, Walsh CT. In vitro characterization of salmochelin
524 and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J Am Chem Soc*. 2005 Aug

525 10;127(31):11075-84. doi: 10.1021/ja0522027. PMID: 16076215; PMCID:
526 PMC2536649.

527 45. Reeves SA, Torres AG, Payne SM. TonB is required for intracellular growth and
528 virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun*. 2000 Nov;68(11):6329-36. doi:
529 10.1128/IAI.68.11.6329-6336.2000. PMID: 11035742; PMCID: PMC97716.

530 46. Gorbacheva VY, Faundez G, Godfrey HP, Cabello FC. Restricted growth of ent(-)
531 and tonB mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human Mono Mac 6
532 monocytic cells. *FEMS Microbiol Lett*. 2001 Mar 1;196(1):7-11. doi: 10.1111/j.1574-
533 6968.2001.tb10532.x. PMID: 11257540.

534 47. Seliger SS, Mey AR, Valle AM, Payne SM. The two TonB systems of *Vibrio*
535 *cholerae*: redundant and specific functions. *Mol Microbiol*. 2001 Feb;39(3):801-12. doi:
536 10.1046/j.1365-2958.2001.02273.x. PMID: 11169119.

537 48. Takase H, Nitani H, Hoshino K, Otani T. Requirement of the *Pseudomonas*
538 *aeruginosa* tonB gene for high-affinity iron acquisition and infection. *Infect Immun*.
539 2000 Aug;68(8):4498-504. doi: 10.1128/IAI.68.8.4498-4504.2000. PMID: 10899848;
540 PMCID: PMC98358.

541 49. Jarosik GP, Sanders JD, Cope LD, Muller-Eberhard U, Hansen EJ. A functional
542 tonB gene is required for both utilization of heme and virulence expression by
543 *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun*. 1994 Jun;62(6):2470-7. doi:
544 10.1128/iai.62.6.2470-2477.1994. PMID: 8188372; PMCID: PMC186533.

545 50. Torres AG, Payne SM. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic
546 *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol*. 1997 Feb;23(4):825-33. doi: 10.1046/j.1365-
547 2958.1997.2641628.x. PMID: 9157252.

548 51. Wyckoff EE, Duncan D, Torres AG, Mills M, Maase K, Payne SM. Structure of the
549 *Shigella dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric

550 bacteria. Mol Microbiol. 1998 Jun;28(6):1139-52. doi: 10.1046/j.1365-
551 2958.1998.00873.x. PMID: 9680204.

552 52. Nagy G, Dobrindt U, Kupfer M, Emödy L, Karch H, Hacker J. Expression of hemin
553 receptor molecule ChuA is influenced by RfaH in uropathogenic Escherichia coli strain
554 53. Infect Immun. 2001 Mar;69(3):1924-8. doi: 10.1128/IAI.69.3.1924-1928.2001.
555 PMID: 11179376; PMCID: PMC98105.

556 53. Simpson BW, Trent MS. Pushing the envelope: LPS modifications and their
557 consequences. Nat Rev Microbiol. 2019 Jul;17(7):403-416. doi: 10.1038/s41579-019-
558 0201-x. PMID: 31142822; PMCID: PMC6913091.

559 54. Moreira CG, Herrera CM, Needham BD, Parker CT, Libby SJ, Fang FC, Trent MS,
560 Sperandio V. Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host
561 associations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 22;110(4):1470-5. doi:
562 10.1073/pnas.1215416110. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23302685; PMCID:
563 PMC3557018.

564 55. Bartholomew TL, Kidd TJ, Sá Pessoa J, Conde Álvarez R, Bengoechea JA. 2-
565 Hydroxylation of Acinetobacter baumannii Lipid A Contributes to Virulence. Infect
566 Immun. 2019 Mar 25;87(4):e00066-19. doi: 10.1128/IAI.00066-19. PMID: 30745327;
567 PMCID: PMC6434125.

568 56. Llobet E, Martínez-Moliner V, Moranta D, Dahlström KM, Regueiro V, Tomás A,
569 Cano V, Pérez-Gutiérrez C, Frank CG, Fernández-Carrasco H, Insua JL, Salminen
570 TA, Garmendia J, Bengoechea JA. Deciphering tissue-induced Klebsiella pneumoniae
571 lipid A structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Nov 17;112(46):E6369-78. doi:
572 10.1073/pnas.1508820112. Epub 2015 Nov 2. PMID: 26578797; PMCID:
573 PMC4655541.

574 57. Gibbons HS, Reynolds CM, Guan Z, Raetz CR. An inner membrane dioxygenase
575 that generates the 2-hydroxymyristate moiety of Salmonella lipid A. *Biochemistry*. 2008
576 Mar 4;47(9):2814-25. doi: 10.1021/bi702457c. Epub 2008 Feb 7. PMID: 18254598;
577 PMCID: PMC2709818.

578 58. Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M,
579 Waksman G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic
580 insights. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Jun;13(6):343-59. doi: 10.1038/nrmicro3456. PMID:
581 25978706.

582 57. Chen L, Zou Y, She P, Wu Y. Composition, function, and regulation of T6SS in
583 *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res*. 2015 Mar;172:19-25. doi:
584 10.1016/j.micres.2015.01.004. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25721475.

585 58. Monjarás Feria J, Valvano MA. An Overview of Anti-Eukaryotic T6SS Effectors.
586 *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Oct 19;10:584751. doi: 10.3389/fcimb.2020.584751.
587 PMID: 33194822; PMCID: PMC7641602.

588 59. Durand E, Cambillau C, Cascales E, Journet L. VgrG, Tae, Tle, and beyond: the
589 versatile arsenal of Type VI secretion effectors. *Trends Microbiol*. 2014 Sep;22(9):498-
590 507. doi: 10.1016/j.tim.2014.06.004. Epub 2014 Jul 17. PMID: 25042941.

591 60. Russell AB, Peterson SB, Mougous JD. Type VI secretion system effectors:
592 poisons with a purpose. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Feb;12(2):137-48. doi:
593 10.1038/nrmicro3185. Epub 2014 Jan 2. PMID: 24384601; PMCID: PMC4256078.

594 61. Hachani A, Wood TE, Filloux A. Type VI secretion and anti-host effectors. *Curr*
595 *Opin Microbiol*. 2016 Feb;29:81-93. doi: 10.1016/j.mib.2015.11.006. Epub 2015 Dec
596 24. PMID: 26722980.

597 62. Mustafa A, Ibrahim M, Rasheed MA, Kanwal S, Hussain A, Sami A, Ahmed R, Bo
598 Z. Genome-wide Analysis of Four *Enterobacter cloacae* complex type strains: Insights

599 into Virulence and Niche Adaptation. *Sci Rep.* 2020 May 18;10(1):8150. doi:
600 10.1038/s41598-020-65001-4. PMID: 32424332; PMCID: PMC7235008.

601 63. Silverman JM, Austin LS, Hsu F, Hicks KG, Hood RD, Mougous JD. Separate
602 inputs modulate phosphorylation-dependent and -independent type VI secretion
603 activation. *Mol Microbiol.* 2011 Dec;82(5):1277-90. doi: 10.1111/j.1365-
604 2958.2011.07889.x. Epub 2011 Nov 4. PMID: 22017253; PMCID: PMC3590308.

605 64. Lossi NS, Manoli E, Simpson P, Jones C, Hui K, Dajani R, Coulthurst SJ, Freemont
606 P, Filloux A. The archetype *Pseudomonas aeruginosa* proteins TssB and TagJ form a
607 novel subcomplex in the bacterial type VI secretion system. *Mol Microbiol.* 2012
608 Oct;86(2):437-56. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08204.x. Epub 2012 Aug 29. PMID:
609 22906320.

610 65. Silverman JM, Austin LS, Hsu F, Hicks KG, Hood RD, Mougous JD. Separate
611 inputs modulate phosphorylation-dependent and -independent type VI secretion
612 activation. *Mol Microbiol.* 2011 Dec;82(5):1277-90. doi: 10.1111/j.1365-
613 2958.2011.07889.x. Epub 2011 Nov 4. PMID: 22017253; PMCID: PMC3590308.

614 66. Lossi NS, Manoli E, Simpson P, Jones C, Hui K, Dajani R, Coulthurst SJ, Freemont
615 P, Filloux A. The archetype *Pseudomonas aeruginosa* proteins TssB and TagJ form a
616 novel subcomplex in the bacterial type VI secretion system. *Mol Microbiol.* 2012
617 Oct;86(2):437-56. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08204.x. Epub 2012 Aug 29. PMID:
618 22906320.

619 67. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM.
620 DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence
621 similarities. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007 Jan;57(Pt 1):81-91. doi:
622 10.1099/ijs.0.64483-0. PMID: 17220447.

623 78. Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O. Solving the problem of
624 comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. PLoS One.
625 2014 Aug 11;9(8):e104984. doi: 10.1371/journal.pone.0104984. PMID: 25110940;
626 PMCID: PMC4128722.

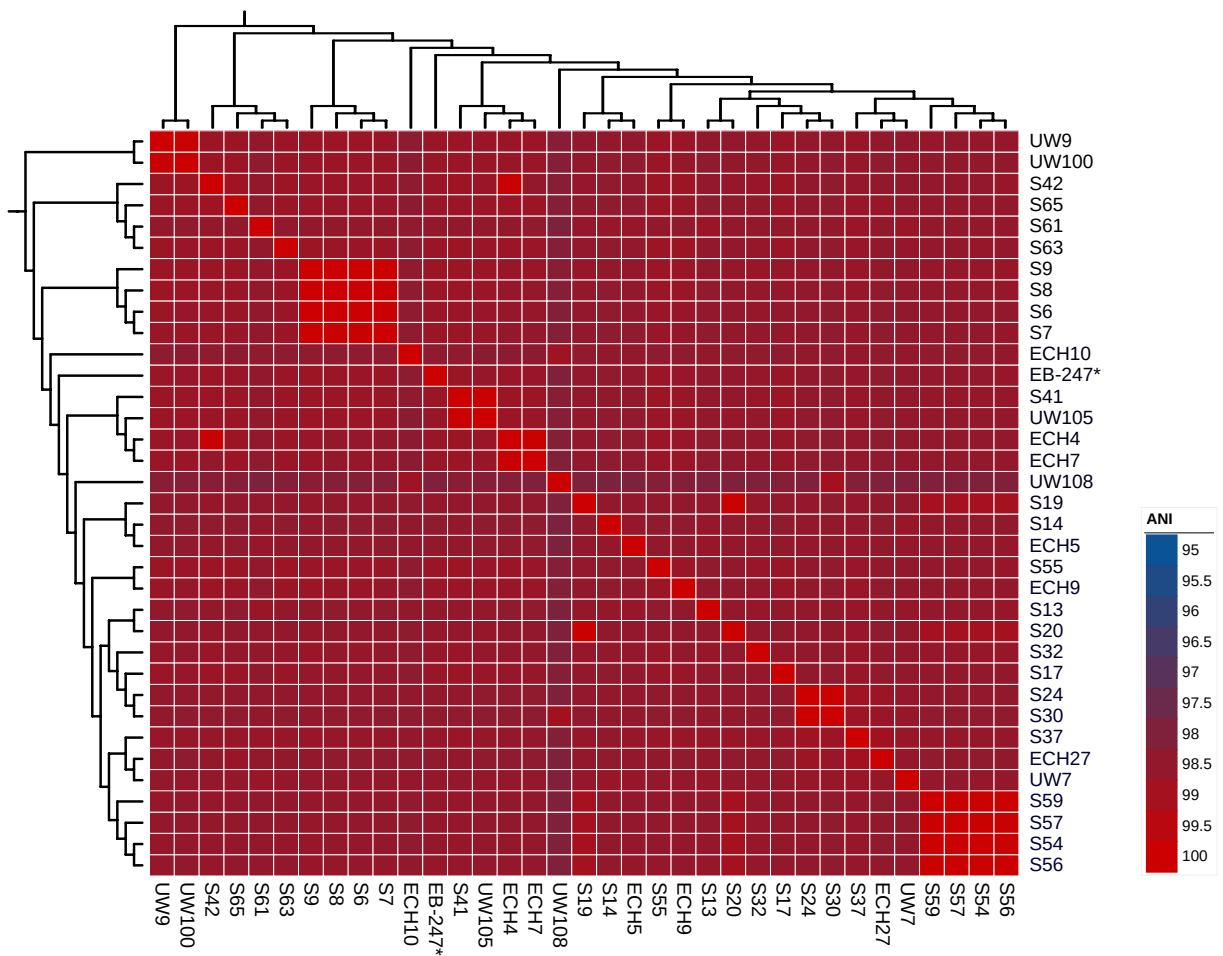


FIG 1 Precise species identification by Average Nucleotide Identity (ANI) analysis of the 35 strains of *E. bugandensis* included in this study.

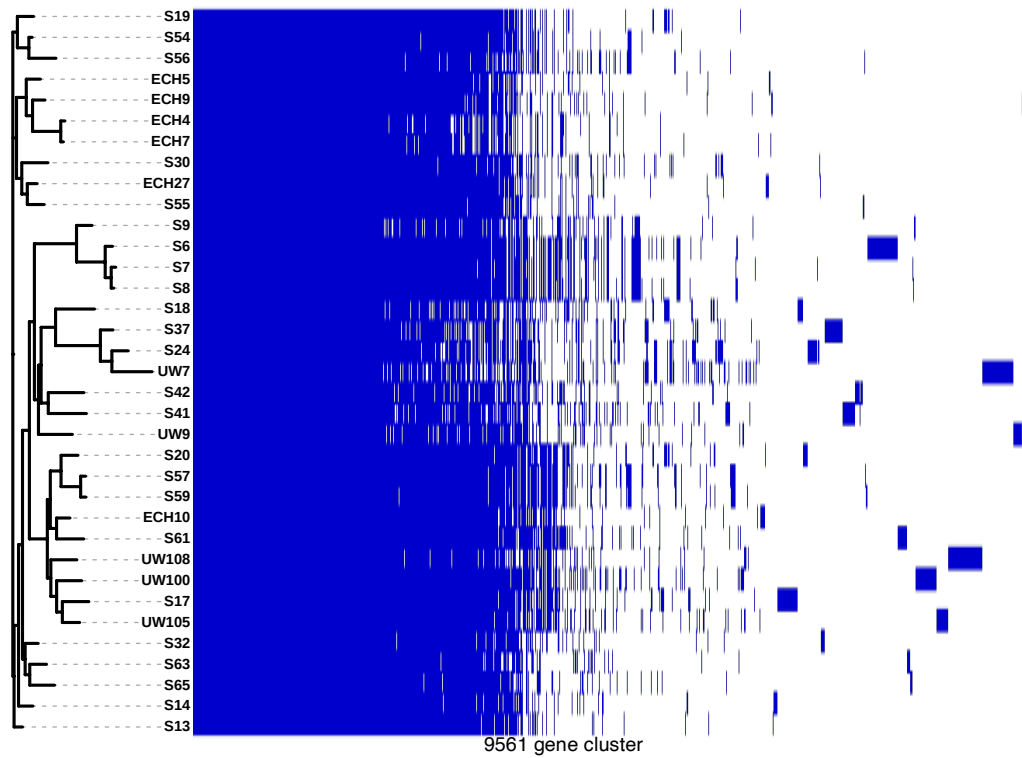


FIG 2 Representation of the pan-genome distribution of 35 strains of *E. bugandensis*. The tree represents the evolutionary relationship, and the blue figure represents the presence and absence of core-, accessory- and unique genes.

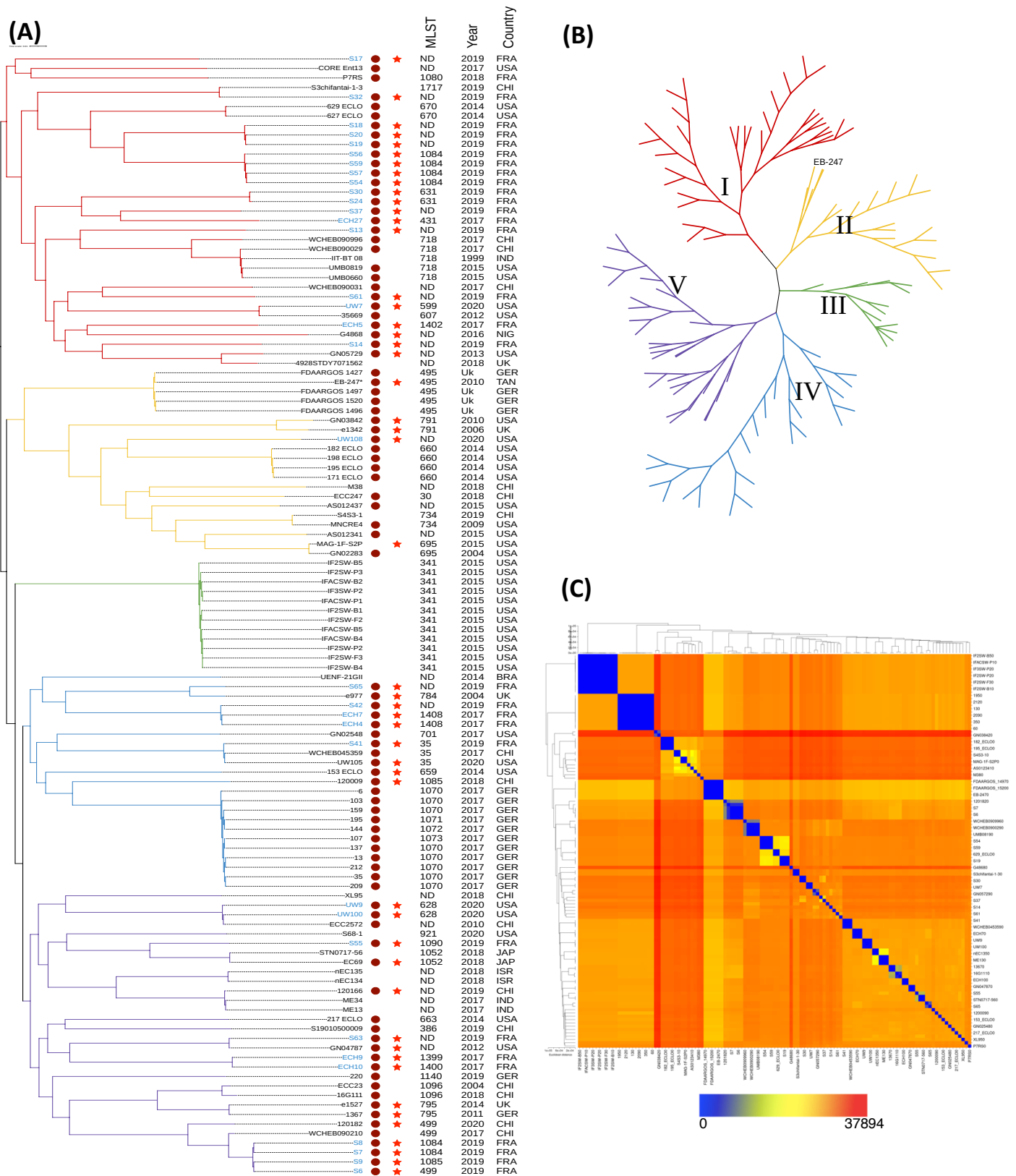


FIG 3 Molecular phylogenetic analysis of 119 genomes of *E. bugandensis*. **(A)** Phylogenetic tree based on single nucleotide polymorphism (SNP). The tree shows strains associated with hospital infections (red circles), isolates associated with bloodstream infections (stars), classical MLST, year of isolation and country of

isolation. **(B)** Subtyping of *E. bugandensis*. The tree shows the presence of 5 clusters. **(C)** Heatmap showing SNP distance. The 35 home-sequenced genomes are shown in blue.

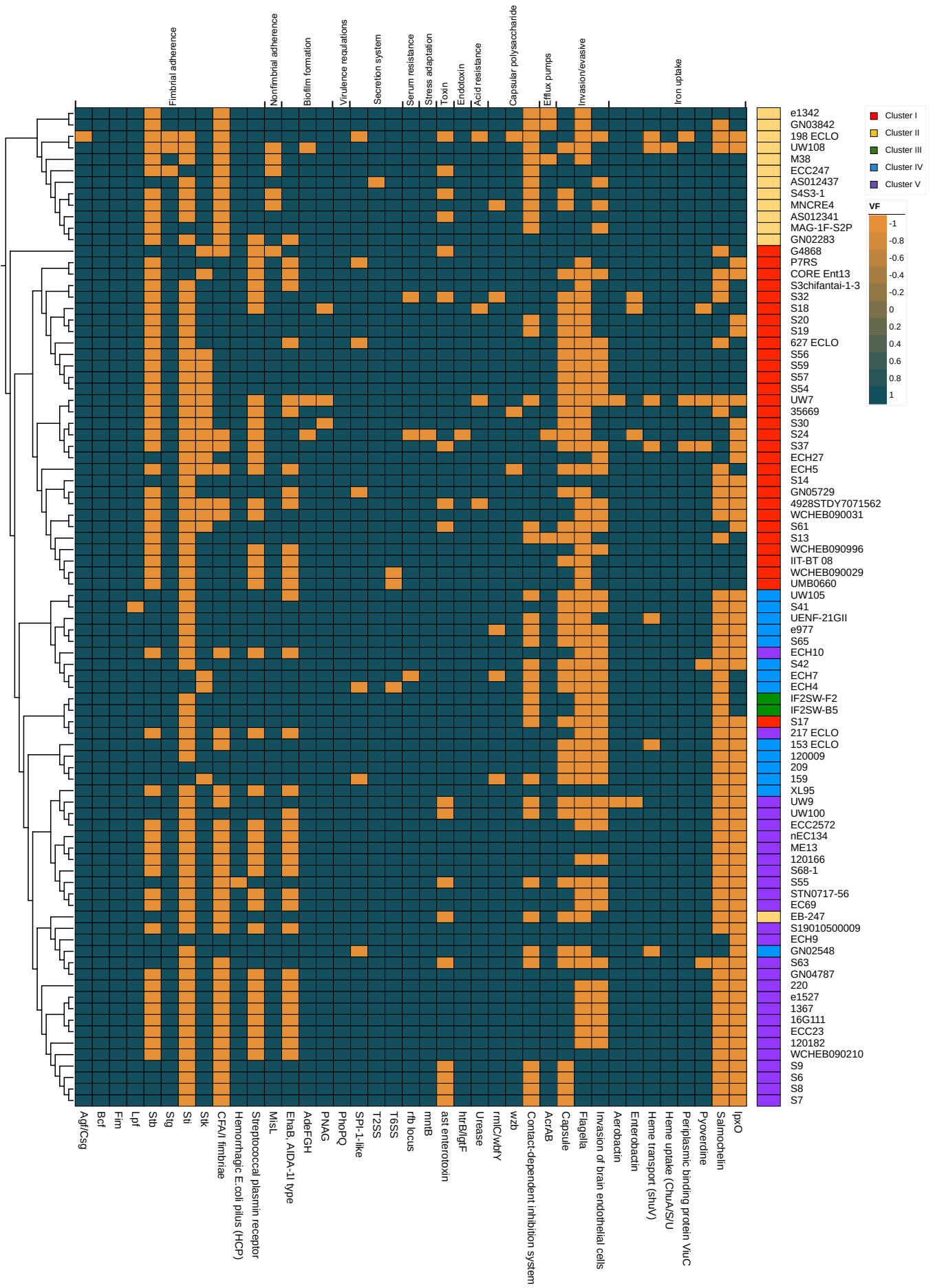


FIG 4 Heatmap of the presence and absence of virulence factors in the non-clonal genomes of *E. bugandensis* (n=87). The cg-MLST phylogenetic tree was inferred using the core-genome. The predicted virulence gene families are shown at the top and virulence genes at the bottom. 1 represents the presence and -1 the absence of genes. The clusters predicted by SNP are shown on the right side of the figure.

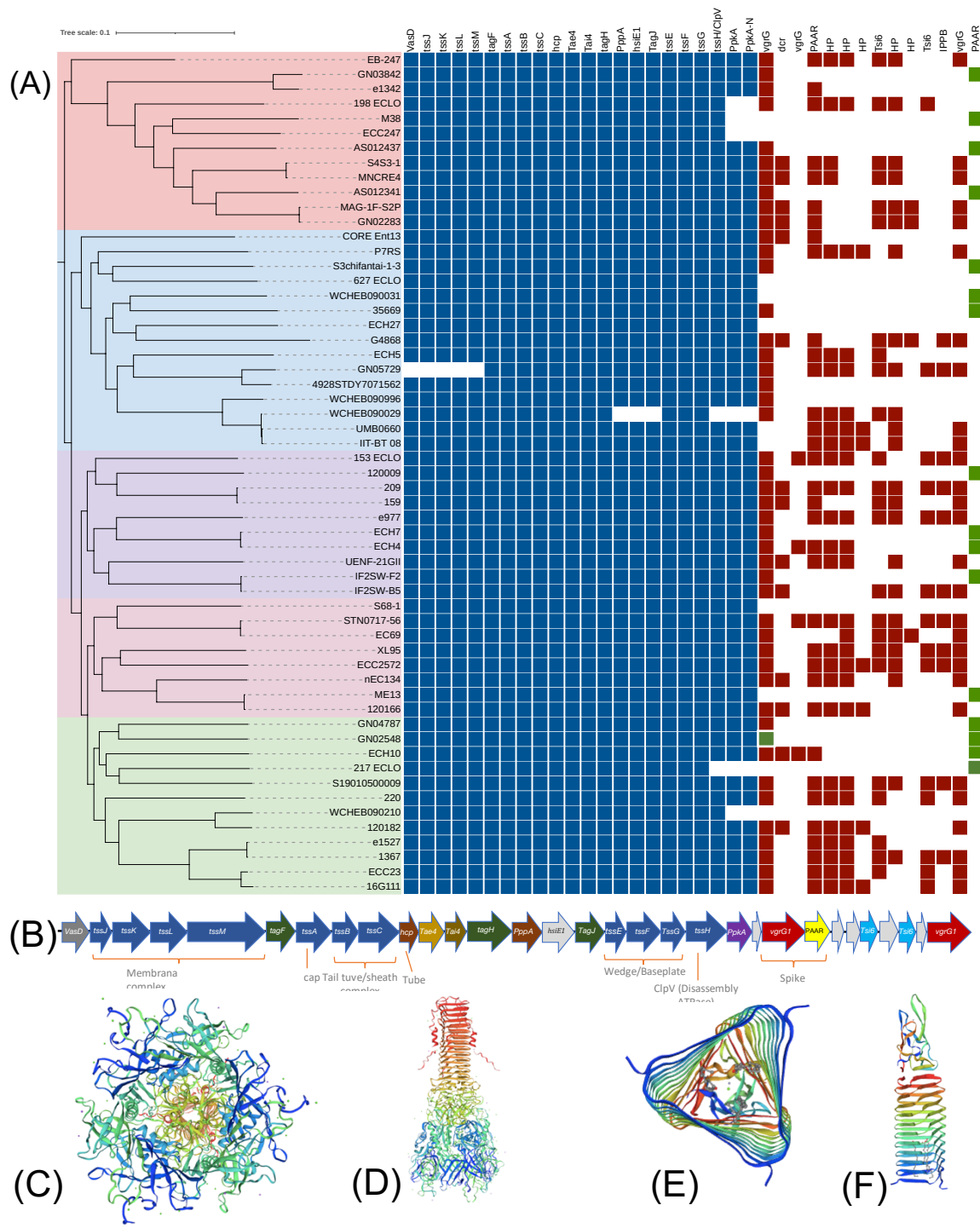


FIG 5 Heatmap of T6SS-associated genes in *E. bugandensis*. (A) Blue color represents the presence and red color the absence of genes. (B) Genetic architecture of T6SS in *E. bugandensis*. (C-F) Prediction of the three-dimensional structure of the T6SS spike.

Résistance aux antibiotiques de la cohorte SENSE

Une identification précise des espèces d'*Enterobacter* a été réalisée en utilisant le génome complet de 86 souches. Les valeurs d'ANI sont présentées dans la **Figure 32**. Nous avons identifié 30 (34,0%) souches d'*E. bugandensis*, 2 souches d'*E. cancerogenus*, 1 souche d'*E. cloacae*, 2 souches d'*E. dissolvens*, 7 souches d'*E. hoffmannii*, 2 souches d'*E. kobei*, 1 souche d'*E. ludwigii*, 1 souche d'*E. mori*, et 38 (43,1%) souches d'*E. xiangfangensis*.

L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion en gélose montre un phénotype de résistance de type sauvage (29.5%,). Malgré le fait que *Enterobacter* a une résistance naturelle à la céfoxitine (FOX), nous avons observé 25% (13/88) des isolats sensibles à FOX. Globalement, l'origine, l'espèce précise et l'antibiogramme des 88 souches récupérées dans les RNN sont présentés dans la **Figure 32**.

Les concentrations minimales inhibitrices 50 et 90 des antibiotiques testés sont présentées dans le **Tableau 11**. Les CMI₅₀ pour le céfotaxime étaient de 0,25 mg/L pour *E. bugandensis*, de 0,5 mg/L pour *E. xiangfangensis*, 32 mg/L pour *E. hoffmannii* et de 0,5 mg/L pour les autres espèces. Parmi les 88 isolats testés, 23 (26,1%) isolats étaient résistants au cefotaxime dont 3 % *E. bugandensis*, 15 (17,0%) *E. xianfangensis* et 4(4,5%) *E. hoffmannii* et 1 (1,1%) *E. quasihormaechei*

Les phénotypes des résistances au cefotaxime était pour 91,6 % (22/24) des isolats une hyperproduction AmpC et 8,3 % (2/24) avaient une BLSE de type *bla*_{CTX-M-15} (*E. xiangfangensis* (n=1) et *E. hoffmannii* (n=1).

En outre, 2,2 % (2/88) étaient résistants à la céfépime, 15,9 % (14/88) étaient résistants à la pipéracilline/tazobactam. Les 88 souches étaient sensibles au Meropenem et résistantes à la colistine. Les CMI₅₀ pour la colistine étaient de 64 mg/L pour *E.*

bugandensis, de 16 mg/L pour *E. xiangfangensis*, 16 mg/L pour *E. hoffmannii* et de 32 mg/L pour les autres espèces. L'analyse par séquençage du génome entier (WGS) a montré des mutations dans la régulation d'AmpC (AmpD et AmpR) impliquées dans l'hyperproduction. En général, aucune acquisition de gènes associés à la résistance liés aux plasmides n'a été identifiée dans l'ensemble de la collection de souches.

Trois facteurs moléculaires associés à la résistance aux antibiotiques ont été identifiés : l'AmpC -lactamase (ACT), FosA et les pompes d'efflux (*oxq*, *arc*, *emr*, *mar*, *ram*). Toutes sont de nature chromosomique. Dans six souches : de *E. bugandensis*, ECH4 (ACT-77) ; ECH7 (ACT-77) ; ECH5 (ACT-78) ; ECH9 (ACT-80) ; ECH10 (ACT-81) ; ECH27 (ACT-82), les allèles ACT ont été confirmés avec une identité de 100%. Toutes les autres souches ont un allèle proche de l'ACT-49. Chez *E. xiangfangensis*, l'allèle ACT était varié avec une prévalence des allèles ACT-15 et ACT-17 et chez *E. hoffmannii* de l'allèle ACT-24.

Les pompes à efflux sont directement impliquées dans la diminution de la sensibilité aux antibiotiques et aux antiseptiques. Ces trois mécanismes de résistance aux antibiotiques sont communs à toutes les souches. Enfin, parmi les souches résistantes au céfotaxime, 82,6 % (19/23) étaient des hyperproducteurs AmpC et seulement 8,6 % (2/23) étaient porteurs d'une BLSE (CTX-M-15).

En conclusion, la présente étude a établi différents schémas de résistance selon les espèces d'*Enterobacter*. *E. xiangfangensis* et *E. hoffmannii* sont plus fréquemment résistants aux antimicrobiens testés que *E. bugandensis*.

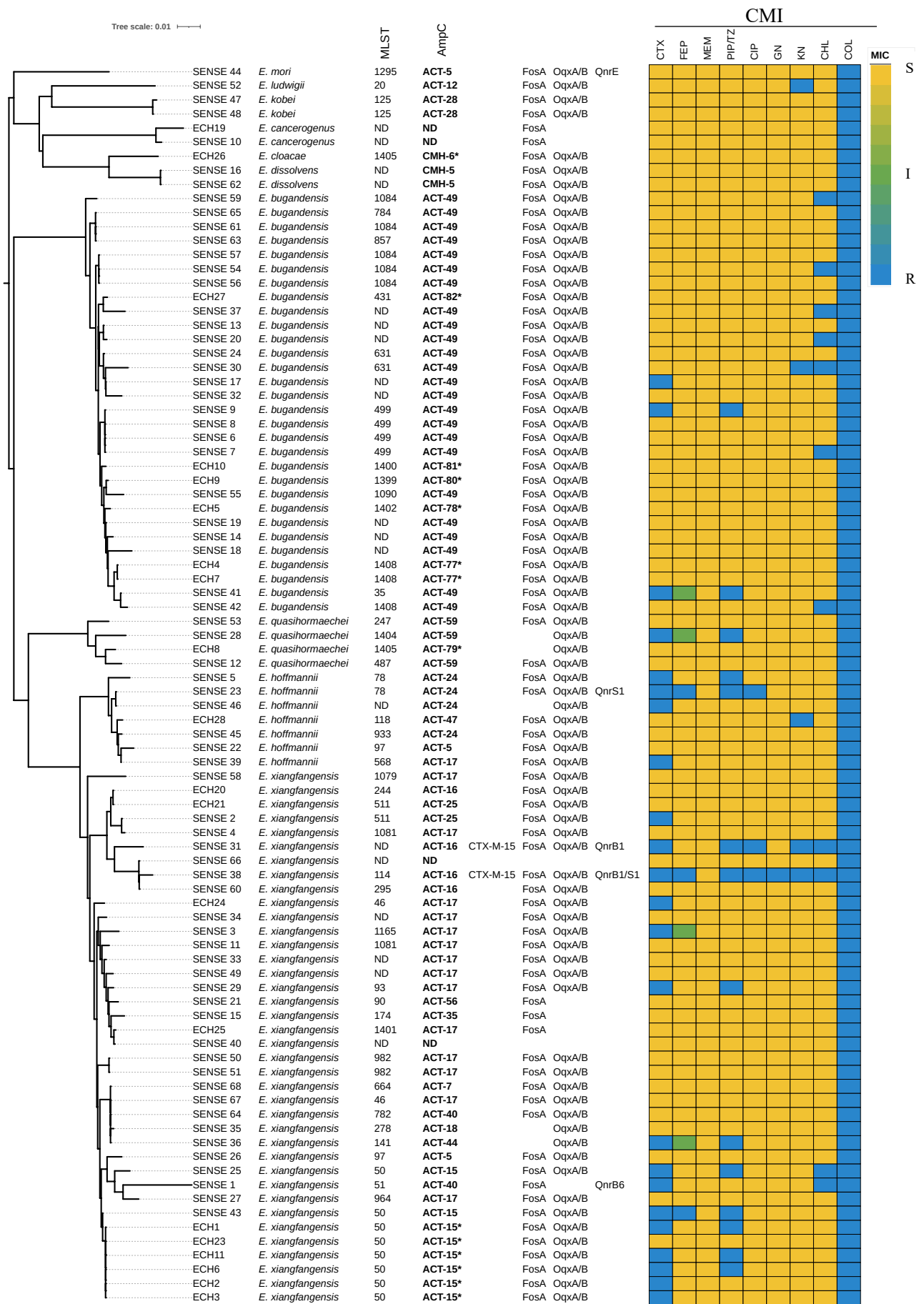


Figure 33 Corrélation entre le résistome génomique et la concentration minimale inhibitrice de la cohorte *Enterobacter* spp. ND : non déterminé, S : susceptible, I : intermédiaire, R : résistant

Tableau 11 Évaluation de la résistance aux antibiotiques par la méthode de microdilution en bouillon des souches non clonales d'*Enterobacter* spp. (n=81) isolées à partir d'hémocultures de nouveau-nés.

<i>Enterobacter</i> species	No. of strains	Antibiotic	Resistant strains (%)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)
<i>E. bugandensis</i>	24	Cefotaxime	8.3 (n=2)	0.25	0.5	0.125 to >128
		Cefepime	0.0 (n=0)	0.0625	0.125	0.0313 to 2
		Meropenem	0.0 (n=0)	0.0625	0.25	0.0313 to 2
		Piperacillin/tazobactam	4.16 (n=1)	1	4	0.5 to 64
		Ciprofloxacin	0.0 (n=0)	0.0078	0.0313	0.0039 to 0.0313
		Gentamicin	0.0 (n=0)	0.5	1	0.25 to 2
		Chloramphenicol	16.6 (n=4)	4	16	4 to 32
		Colistin	100.0 (n=24)	64	>128	64 to > 128
<i>E. xiangfangensis</i>	37	Cefotaxime	37.8 (n=14)	0.5	128	0.125 to >128
		Cefepime	2.6 (n=1)	0.125	2	0.0313 to 32
		Meropenem	0.0 (n=0)	0.0625	0.125	0.0313 to 0.25
		Piperacillin/tazobactam	21.6 (n=8)	2	64	0.5 to 256
		Ciprofloxacin	5.3 (n=2)	0.0039	0.0625	0.0039 to 8
		Gentamicin	2.6 (n=1)	0.5	0.5	0.25 to 64
		Chloramphenicol	10.5 (n=4)	4	8	2 to >128
		Colistin	100.0 (n=37)	16	32	4 to >128
<i>E. hoffmannii</i>	7	Cefotaxime	57.1 (n=4)	32	128	0.5 to >128
		Cefepime	14.2 (n=1)	0.0625	0.5	0.0625 to >128
		Meropenem	0.0 (n=0)	0.0625	0.125	0.0313 to 0.125
		Piperacillin/tazobactam	28.5 (n=2)	4	64	2 to 256
		Ciprofloxacin	14.2 (n=1)	0.0039	0.125	0.0039 to 0.5
		Gentamicin	0.0 (n=0)	0.5	1	0.25 to 1
		Chloramphenicol	0.0 (n=0)	4	8	4 to 8
		Colistin	100.0 (n=7)	16	32	4 to 128
Other species:	13	Cefotaxime	7.7 (n=1)	0.5	1	0.0625 to >128
		Cefepime	0.0 (n=0)	0.125	0.5	0.0313 to 2
<i>E. cancerogenus</i> (n=2)		Meropenem	0.0 (n=0)	0.0313	0.25	0.0156 to 0.25
<i>E. cloacae</i> (n=1)		Piperacillin/tazobactam	7.7 (n=1)	2	2	1 to 256
<i>E. dissolvens</i> (n=2)		Ciprofloxacin	0.0 (n=0)	0.0078	0.0625	0.0039 to 0.0625
<i>E. kobei</i> (n=2)		Gentamicin	0.0 (n=0)	0.5	1	0.25 to 1
<i>E. ludwigii</i> (n=1)		Chloramphenicol	0.0 (n=0)	4	8	4 to 8
<i>E. mori</i> (n=1)		Colistin	100.0 (n=13)	32	128	16 to >128
<i>E. quasihormaechei</i> (n=4)						

QUATRIÈME ARTICLE

Presence of 2-hydroxymyristate on endotoxins
is associated with death in neonates
with *Enterobacter cloacae* complex septic
shock

*Luis A Augusto, Nadège Bourgeois-Nicolaos, Aude Breton, Simon Barreault, **Enrique Hernandez Alonso**, Stuti Gera, Véronique Faraut-Derouin, Nada Semaan, Daniele De Luca, Richard Chaby, Florence Doucet-Populaire, Pierre Tissières*

iScience. 2021 Jul 30;24(8):102916. doi: 10.1016/j.isci.2021.102916. eCollection 2021 Aug 20.

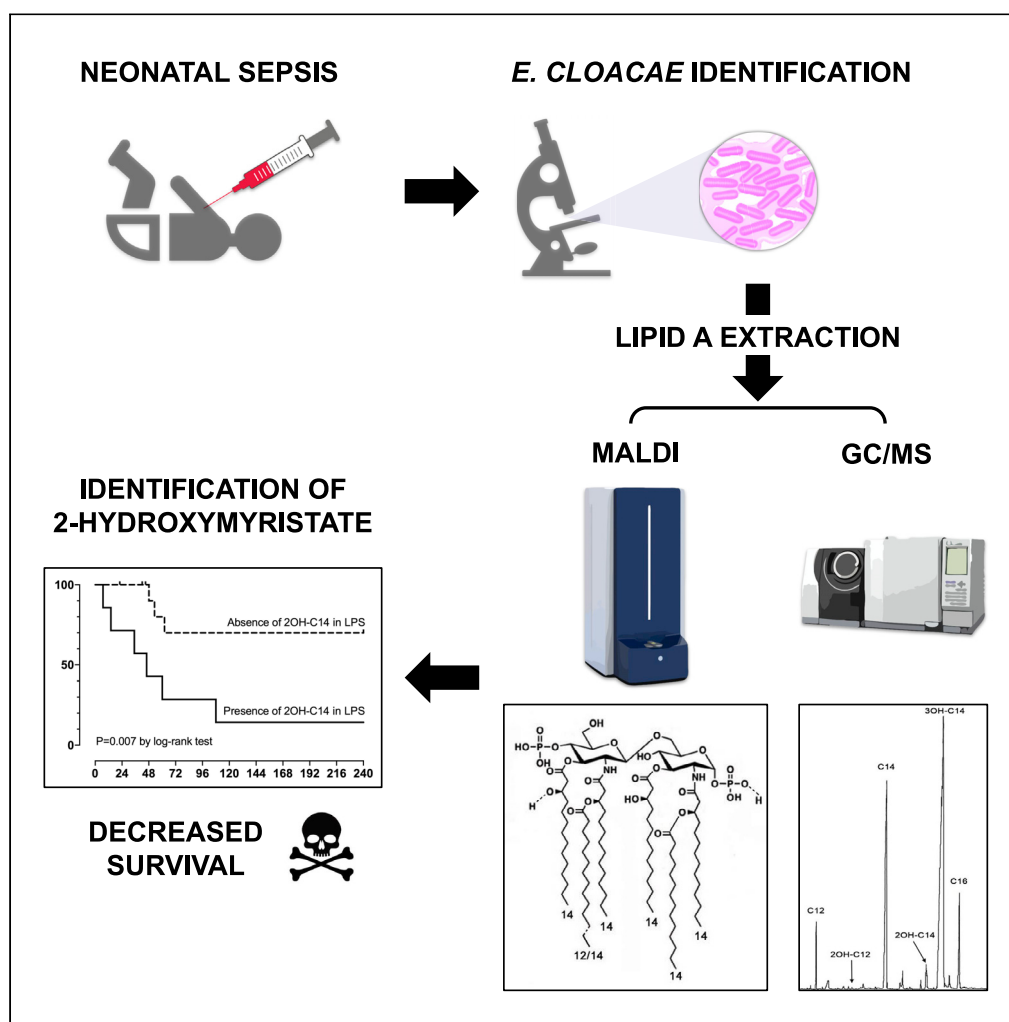
Contexte

Suite à l'épidémie de bactériémie à *Enterobacter* en RNN de l'hôpital Antoine Béclère, un taux de mortalité élevé (70%) a été observé chez les nouveau-nés. Notre équipe de recherche a proposé l'hypothèse selon laquelle les endotoxines comme le lipopolysaccharide (LPS), et plus particulièrement le lipide A, pourrait être impliqué dans la gravité du sepsis et serait lié à la mortalité des nouveau-nés. Dans ce travail, mes objectifs étaient de corrélérer les modifications structurelles du LPS associées à la virulence et à la sévérité des sepsis néonataux en fonction des espèces ainsi que de construire un mutant du marqueur associé à cette virulence.

L'étude a porté sur 19 souches d'*Enterobacter* isolées d'hémocultures de nouveau-nés atteints de bactériémie. Les espèces bactériennes comprenaient *E. hormaechei* (n=11), *E. bugandensis* (n=7) et une souche d'*E. cloacae* (n=1). Ensuite, l'analyse de la structure du lipide A a montré la présence d'une molécule d'acide α -hydroxymyristique (2OH-C₁₄) chez *E. bugandensis*. L'analyse *in silico* des génomes a révélé la présence d'un homologue du gène codant pour l'enzyme LpXO qui génère le 2-hydroxymyristate (2HM) par hydroxylation du myristate transféré au lipide A par l'acétyltransférase MsB/LpxM.

La présence du marqueur était significativement associée à plus de défaillance rénale (oligurie ; 71% vs. 15% ; p=0,02) et hémodynamique (score VIS médian ;200 vs. 40 ; p=0,03), et la probabilité de décès parmi ces enfants était plus élevée avec un hazard-ratio à 5,55 (p=0,007 par logrank test), particulièrement chez *E. bugandensis*. Pour étudier le rôle de virulence de LpxO chez *E. bugandensis*, des mutants du gène doivent être construits. Dans ce contexte, mon travail a consisté à générer un mutant LpxO. Cependant, en raison de la crise sanitaire de la COVID-19, cet objectif a été partiellement atteint avec la construction d'un mutant LpxO, à savoir la souche ECH4.

Article

Presence of 2-hydroxymyristate on endotoxins is associated with death in neonates with *Enterobacter cloacae* complex septic shock

Luis A. Augusto, Nadège Bourgeois-Nicolaos, Aude Breton, ..., Richard Chaby, Florence Doucet-Populaire, Pierre Tissières

luis.augusto@i2bc.paris-saclay.fr (L.A.A.)
pierre.tissieres@i2bc.paris-saclay.fr (P.T.)

Highlights

Fifteen different molecular species of lipid A is found in *E. cloacae* complex

2-Hydroxymyristate moiety on Lipid A is a virulence marker of the *E. cloacae* complex

Presence of 2-hydroxymyristate is associated with mortality in neonatal sepsis

Augusto et al., iScience 24, 102916
August 20, 2021 © 2021 The Author(s).
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102916>

Article

Presence of 2-hydroxymyristate on endotoxins is associated with death in neonates with *Enterobacter cloacae* complex septic shock

Luis A. Augusto,^{1,6,*} Nadège Bourgeois-Nicolaos,^{1,2,6} Aude Breton,¹ Simon Barreault,^{1,3} Enrique Hernandez Alonso,¹ Stuti Gera,² Véronique Faraut-Derouin,² Nada Semaan,^{1,3} Daniele De Luca,⁴ Richard Chaby,¹ Florence Doucet-Populaire,^{1,2} and Pierre Tissières^{1,3,5,7,*}

SUMMARY

***Enterobacter cloacae* complex species are involved in infections among critically ill patients. After a recent *E. cloacae* outbreak of fulminant neonatal septic shock, we conducted a study to determine whether septic shock severity and its lethal consequence are related to structural features of the endotoxin (lipopolysaccharide [LPS]) of the strains isolated from hospitalized infants and more specifically its lipid A region. It appeared that the LPSs are very heterogeneous, carrying fifteen different molecular species of lipid A. The virulence was correlated with a structural feature identified by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and gas chromatography coupled with mass spectrometry: the presence of 2-hydroxymyristic acid as a secondary substituent in lipid A. This is the first published evidence linking LPS structural moiety to neonatal sepsis outcome and opens the possibility of using this fatty acid marker as a detection tool for high-risk patients, which could help reduce their mortality.**

INTRODUCTION

Species of a *Enterobacter cloacae* complex, gram-negative bacteria of the Enterobacteriaceae family, are commonly isolated from soil, plants, and from the digestive tract of mammals and insects [Jang and Nishijima, 1990; Marchini et al., 2002]. As a facultative anaerobe, it has the ability to survive in various environments, including dry soil, water pipes, and metal or plastic medical equipment [Herson et al., 1987]. The *E. cloacae* complex is a common catheter contaminant [Watson et al., 2005; Harbarth et al., 1999] and can be an opportunistic pathogen of immunocompromised adults and neonates [Mayhall et al., 1979; Davin-Regli et al., 2019]. The *E. cloacae* complex includes various species where *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter bugandensis*, and *Enterobacter hormaechei* represent the most frequently isolated species in clinical infections, especially in the neonatal intensive care unit (NICU) [Davin-Regli et al., 2019; Pati et al., 2018]. In humans, the *E. cloacae* complex is a member of the normal gut microbiota [Keller et al., 1998]. In recent years, the *E. cloacae* complex has emerged as one of the most commonly found nosocomial pathogen in the NICU, but little is known and has been published about its virulence-associated factors [Dalben et al., 2008]. The aim of this study was to search for an eventual correlation between lipopolysaccharides (LPS) structure and the pathogenicity of strains of the *E. cloacae* complex isolated in premature infants with septic shock.

Endotoxins (LPS) are recognized virulence factor by interfering with host recognition, immune response, and action of antimicrobial agents. Modifications of the lipid A region of the LPS molecules are known to modify the penetration ability of some antimicrobial agents [Nikaido, 2003]. Similarly, an increased virulence of Gram-negative bacteria can be due to increased resistance to different host cationic antimicrobial peptides (CAMPs) such as defensins, human neutrophil peptide (HNP-1), human cationic protein 18 (hCAP18 or LL-37), and the human platelet-derived kinocidin [Peschel and Sahl, 2006]. The main mechanisms of resistance to CAMPs consist of LPS modification through the addition of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose or phosphoethanolamine, which decreases the negative charge of the lipid A. The operons encoding enzymes involved in these modifications are *arnBCADTEF* and *pmrCAB*, respectively [Olaitan et al., 2014]. Activation of the LPS-modifying genes is often mediated through PmrA/PmrB and

¹Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France

²Department of Bacteriology-Hygiene, AP-HP Paris-Saclay, Hôpital Antoine Bécclère, Clamart Cedex, France

³Department of Pediatrics Intensive Care and Neonatal Medicine, AP-HP Université Paris -Saclay, Bicêtre Hospital, Paris, France

⁴Department of Neonatal Intensive Care, AP-HP Université Paris -Saclay, Hôpital Antoine Bécclère, Clamart, France

⁵FHU Sepsis, AP-HP/Université Paris-Saclay/Inserm, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁶These authors contributed equally

⁷Lead contact

*Correspondence: luis.augusto@i2bc.paris-saclay.fr (L.A.A.), pierre.tissieres@i2bc.paris-saclay.fr (P.T.)

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102916>



PhoP/PhoQ, two-component regulatory systems that are interconnected depending on the species. For instance, in *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, or *Klebsiella pneumoniae*, the phosphorylated form of PhoP can stimulate the expression of PmrD that in turn activates PmrA promoting the transcription of the *arnBCADTEF* and *pmrCAB* operons. Regarding the *E. cloacae* complex and its resistance to CAMPs, it has been shown recently that the *arn* operon is involved, but in contrast to *E. coli*, *Salmonella*, or *Klebsiella*, only PhoP/PhoQ (and not PmrA/PmrB) seems to play a role [Gibbons et al., 2000].

An *E. cloacae* complex outbreak occurred in the NICU of Antoine Bécélère Hospital (Clamart, France). The “fulminating” course of nosocomial infection due to the *E. cloacae* complex in critically ill patients urges to investigate the role of endotoxins in the pathophysiology of those infections. Suggested by the fulminating and devastating course of septic shock, we hypothesized that LPSs structures of the patient’s isolated *E. cloacae* complex strains, particularly their lipid A moiety, might display some specific structural signatures associated with this severe pathophysiologic response.

RESULTS

Enterobacter cloacae complex fulminant neonatal septic shock

From January 2016 to June 2017, 18 patients admitted in the NICU of the Antoine Bécélère Hospital (AP-HP Paris-Saclay University, Clamart, France) had *E. cloacae* complex septic shock. Patient characteristics are displayed in Table S1. All patients were extremely premature infants (median 27.0 weeks of gestational age). Of the 18 infants, 12 infants displayed a fulminant course with death occurring within a median of 61 h (IQR 22–1062) after septic shock diagnosis. Death occurred on a median of 7 days (IQR 4–10) after birth. Nineteen *E. cloacae* complex strains were isolated from blood cultures. For one patient, we isolated two *E. cloacae* complex strains with different antibiotic-resistant pattern (H7i and H7o). Among the 19 *E. cloacae* complex isolates, we identified *E. hormaechei* (n = 11), *E. bugandensis* (n = 7), and *E. cloacae* (n = 1) (Table S2). We identified 9 enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)–polymerase chain reaction (PCR) profiles (Figure S1). In *E. hormaechei* species, 5 profiles were identified with a majority of the profile A (7 of 11, 63.7%). In *E. bugandensis* species, 4 profiles were identified with a majority of the profile E (4 of 7, 57.1%).

Among all *E. cloacae* complex strains, we detected an overproduction of AmpC cephalosporinase contributes to the resistance to third-generation cephalosporins in 8 of 19 strains (42.1%). Phenotypic antibiotic resistance patterns were not evenly distributed among *E. cloacae* complex species. The species *E. hormaechei* showed a higher resistance to third-generation cephalosporins (6 of 11, 54.5%) compared to other species (2 of 8, 25.0%) (Table S2).

Composition of the molecular species present in the lipid A regions

LPSs were extracted from the cultured strains and the structures of their lipid A regions were analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF). Like lipid A of other Gram-negative bacteria, the lipid A moieties isolated from the twelve selected strains of the *E. cloacae* complex contained multiple molecular variants represented by multiple peaks in their mass spectra. Among the twelve lipid A, one of the more heterogeneous was that isolated from strain H7i (*E. bugandensis* E profile with low level of a chromosomal AmpC beta-lactamase), with more than 13 significant peaks (13 molecular species) in its lipid A spectrum (Figure 1). The spectrum contained a series of peaks (1360–1388, 1570–1598, 1797–1825, 1928–1956, 2035–2063) with an interpeak distance of 28 mu, suggesting that fatty acids of length differing by two carbons were present in molecular variants of this lipid A. The composition of the molecular species corresponding to the different peaks is indicated in Table 1. The base peak was at $m/z = 1825$ and was likely due to a bisphosphorylated glucosamine disaccharide backbone substituted with two myristic and four hydroxymyristic fatty acids (identified as 3OH-C14 by gas chromatography coupled with mass spectrometry [GC-MS]). This meant that in the homologous peak of the corresponding doublet, at $m/z = 1797$, one of the two myristic (C14:0) acids was replaced with a lauric (C12:0) fatty acid. The following doublets (1928–1956 and 2035–2063) could be easily explained by the addition of palmitate (C16:0) and 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N), respectively, to the m/z 1797 and 1825 molecular species.

In addition to the two dominant peaks of the spectrum (at m/z 1797.4 and 1825.4), small flanking peaks at +16 Da (m/z 1813.4 and 1841.4, marked ● in Figure 1) indicating the presence of an alternative hydroxymyristate residue which was used at low frequency in place of C14:0 by a variant acyltransferase. The analysis by GC-MS (Figure 2) indicated the presence in this LPS of trace amounts of α -hydroxymyristic acid

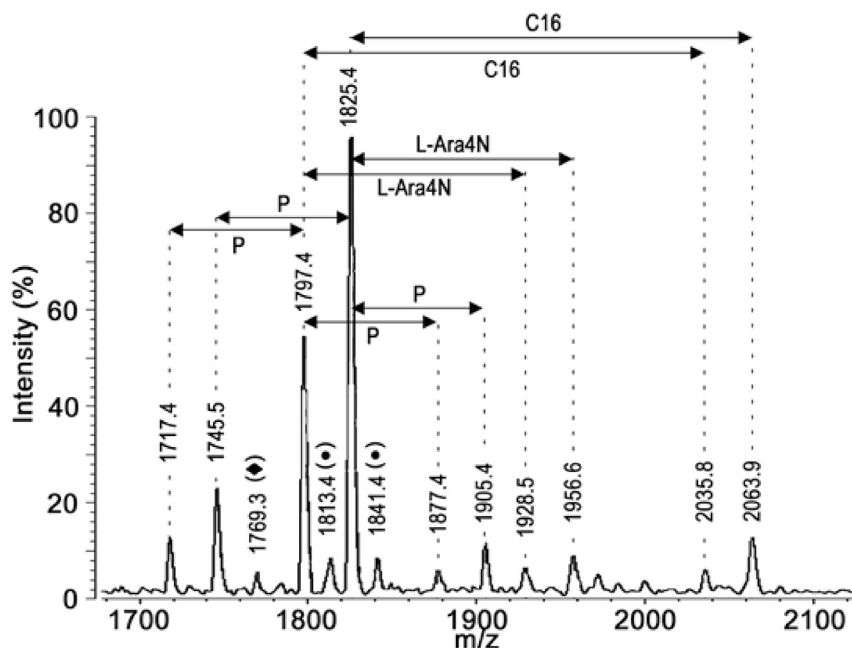


Figure 1. Negative-ion MALDI/TOF mass spectrometry of lipid A from the *E. cloacae* complex H7i (*E. bugandensis* ERIC-PCR Profile low level of chromosomal AmpC beta-lactamase)

P, L-Ara4N and C16 represent m/z shifts corresponding to phosphate, 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and palmitate substituents, respectively. Marked peaks represent species where C14:0 is replaced by C12:0 (◆) or 2-hydroxymyristate (●).

(2OH-C14), thus suggesting that a species of lipid A contained this fatty acid and accounted for the small flanking peaks observed. This can be produced by an ortholog of the dioxygenase LpxO identified in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [Gibbons et al., 2000]. *In silico* analyses of several *E. cloacae* complex genomes revealed that this pathogen carries one homolog of known *lpxO* in others Gram-negative bacteria. Blast analysis of *E. cloacae* strain ATCC 13047 showed that LpxO (GenBank: NC_014121) is 84%, 63%, 57%, 56%, and 57% identical to *S. enterica* serovar Typhimurium, *K. pneumoniae*, *Burkholderia pseudomallei*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* LpxO, respectively (Figure 3). Among *E. cloacae* complex species, *E. cloacae* LpxO shared 90% and only 67% sequence identity with *E. bugandensis* (GenBank: NZ_POUP01000001) and *E. hormaechei* LpxO (GenBank: NZ_NJCO01000003), respectively. LpxO is known to generate 2-hydroxymyristate by hydroxylation of the myristate transferred to lipid A by the acyltransferase MsB/LpxM17. Another small peak (m/z 1769.3) in this spectrum (marked ◆ in Figure 1) can be explained by the presence of a minor species containing two secondary C12:0 instead of the C12 + C14 (m/z 1797.4) or C14 + C14 (m/z 1825.4) present in the major species. Position of the aminoarabinose and phosphate residues of the lipids A. Monophosphorylated species of lipid A can be produced by acid hydrolysis (0.1 M HCl for 10 min at 100°C). Labile linkages such as pyrophosphates and the acetal linkage of the proximal glucosamine (phosphate linked to C1) are hydrolyzed under these conditions. After such a treatment of *E. cloacae* complex lipid A, the peaks corresponding to the bisphosphorylated and hexa-acylated species containing aminoarabinose (m/z 1928.5 and 1956.5) were completely absent from the MALDI-TOF spectrum (Figure 4). Therefore, the L-Ara4N group was not located on P4' in the untreated bisphosphorylated species because the L-Ara4N → phosphate and the phosphate → 4'-GlcN linkages are both resistant to this moderate acid hydrolysis. The loss of phosphoryl-aminoarabinose by mild acid hydrolysis proved that the L-Ara4N substituent was on phosphate at position 1 of the bisphosphorylated species.

Regarding phosphate groups, the presence of triphosphorylated molecules in the untreated lipid A (m/z 1877.4 and 1905.4) indicates that a pyrophosphate must be present in these two molecular species. However, we can note that molecules containing pyrophosphate (m/z 1877.4 and 1905.4) do not contain L-Ara4N, and molecules containing L-Ara4N (m/z 1928.5 and 1956.5) do not contain a pyrophosphate. This suggests that during the biosynthesis of the *E. cloacae* complex lipid A, either a third phosphate group or an L-Ara4N group is added on phosphate at position 1. It is noteworthy that the moderate hydrolytic procedure used

Table 1. Composition of molecular species detectable by MALDI-TOF in Lipid A of *E. cloacae* complex

Constituents	Peaks (calculated m/z)																	
	1388.7	1599.1	1717.4	1745.5	1769.3	1783.4	1797.4	1811.4	1813.4	1825.4	1841.4	1877.4	1905.4	1928.5	1956.6	2035.8	2063.9	2143.8
Total fatty acids	4	5	6													7		
C12			1		2	1	1		1			1		1		1		
C13						1		1										
C14	1	2	1	2			1	1		2	1	1	2	1	2	1	2	2
C16																1	1	1
3OH-C14	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2OH-C14									1		1							
Phosphate	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	3
L-Ara4N														1	1			

The figures shown represent the number of each residue present in the molecular species characterized by a particular mass peak.

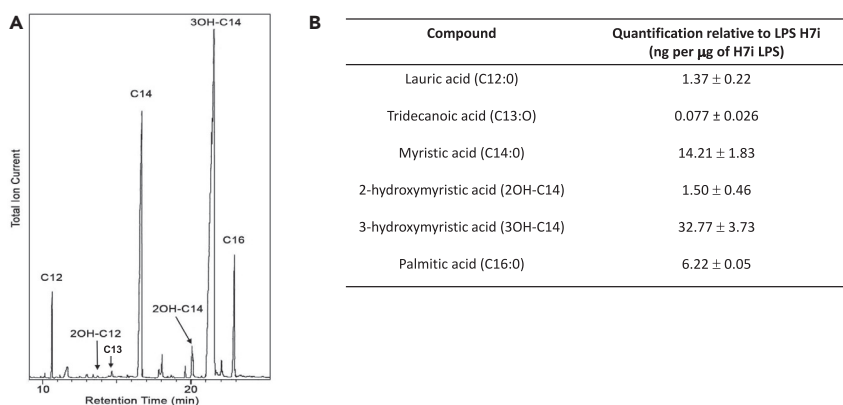


Figure 2. GC/MS analysis of *E. cloacae* complex H7i (*E. bugandensis* ERIC-PCR Profile low level of chromosomal AmpC beta-lactamase) lipid A.

(A) Gas chromatogram of fatty acid methyl esters from the H7i LPS of *E. cloacae* complex. C12, C14, 2OH-C14, 3OH-C14 and C16 represent lauric, myristic, 2-hydroxymyristic, 3-hydroxymyristic and hexadecanoic (palmitic) acid respectively. Trace amounts of 2-hydroxylauric acid (2OH-C12) were also detected by the mass spectrometer coupled to the gas chromatograph.

(B) Gas chromatogram quantification. Quantification was performed with an internal control based on arachidic (ecosanoic) acid (C20). Values in triplicate are expressed as (mean ± SD).

here did not induce important cleavage of fatty acids since the hepta-acylated and monophosphorylated species (m/z 1955.8 and 1983.9) were still present after this hydrolysis.

Analysis of the acylation patterns of the lipids A

The sequential liberation of ester-linked fatty acids by mild alkaline treatment, as used in previous studies [Olaitan et al., 2014; Silipo et al., 2002], usually provides valuable information on the positions of the different fatty acids on the lipid A backbone. According to these studies, the more resistant are the secondary fatty acids on C2' and C2 (particularly C2'), and the more labile are those on C3 (either primary or secondary), substitutions on C3' showing intermediate behaviors. In addition, secondary fatty acids are more resistant to alkaline treatments than primary fatty acids. In order to analyze the acylation patterns of the fatty acids in *E. cloacae* complex LPS, we treated the H7i lipid A with 28% NH₄OH at 50°C for 30 min or 3 h (Figure 5 and Figure 6). When the treatment was performed for only 30 min, new hexa-, penta-, and tetra-acylated species were produced. Important information on this lipid A structure and composition can already be gained from the group of four peaks of m/z between 1340 and 1390. The peak at m/z 1344.7 (two phosphates, two hydroxymyristates, one C12:0, and one C14:0) indicate that only C12:0 and C14:0 are the secondary substituents at 2 and 2' of the two remaining, amide-linked, hydroxymyristate. The lauric residue C12:0 must be on C2' because this position is the most resistant to alkaline hydrolysis and C12:0 remains present in several other de-O-acylated fragments (peaks at m/z 1797.4, 1571 and 1360.7), even after 3 h of hydrolysis (peak at m/z 1134.3). One myristic residue must also be present on the same 2' position because it is also found after a 3-h hydrolysis (triacylated species at m/z 1162.4 with only one C14:0). Because the 2' position is substituted by either C12:0 or C14:0, it follows that in the species at m/z 1344.7 mentioned above, the C14:0 residue is at position 2. The peak at 1372.7 represents the homologous species with secondary C14:0 on 2 and 2'. Therefore, two major molecular species of this lipid A contain a C14:0 on position 2. On the other hand, the peak at m/z 1360.7 (two phosphates, three hydroxymyristates and one C12:0) results from the easy loss of only one hydroxymyristate at position 3 (peak at m/z 1571.0) followed by the cleavage of a C14:0. Because secondary substituents at position 2 are firmly linked, the cleaved myristate was not initially at position 2 but on the only remaining position, 3'. Therefore, the peak at m/z 1360.7 containing C12:0, and its homolog at m/z 1388.7 containing C14:0, derive from two other major molecular species, different from those mentioned in the preceding paragraph, which contain a C14:0 on position 3' and an unsubstituted primary hydroxymyristate on position 2. This means that the group of four peaks of m/z between 1340 and 1390 represent four major and structurally different molecular species present in this lipid A. In two of those (general structure A), a secondary C14:0 is at position 2, whereas in the two others (general structure B), it is at position 3' (Figure 7).

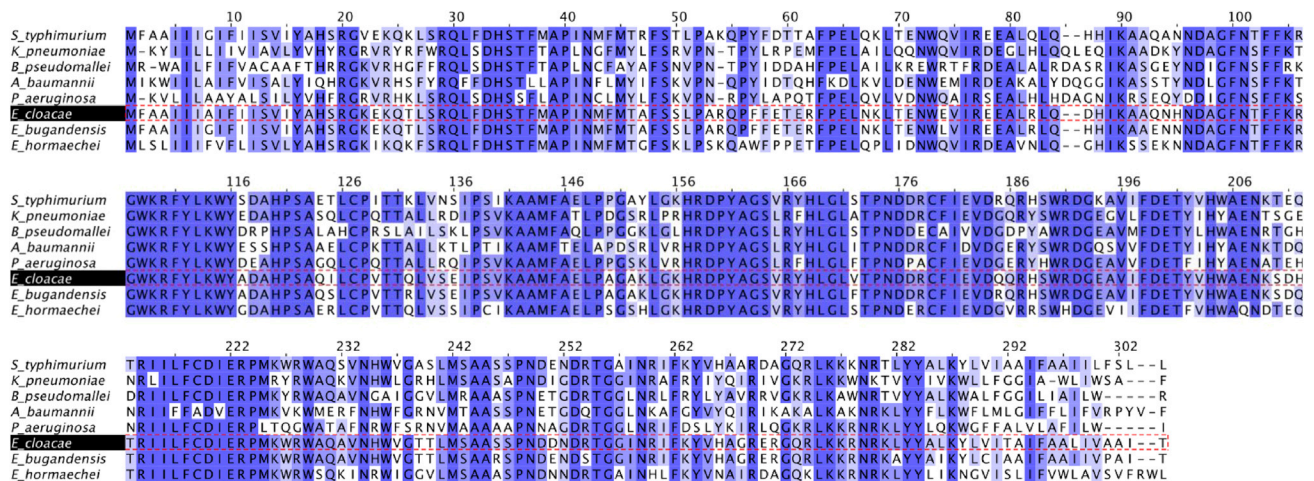


Figure 3. *E. cloacae* complex LpxO homologs in Gram negative bacteria

In silico analysis revealed that *E. cloacae* complex carries one homolog of known *lpxO* in others Gram-negative bacteria. LpxO homology between *E. cloacae* (GenBank: NC_014121), *S. enterica* serovar *typhimurium* (GenBank: NZ_CP043907), *K. pneumoniae* (GenBank: NZ_FO834906), *B. pseudomallei* (GenBank: NC_017832), *A. baumannii* (GenBank: NZ_CP059041), *P. aeruginosa* (GenBank: NZ_CP017149), *E. bugandensis* (GenBank: NZ_POUP01000001), and *E. hormaechei* (GenBank: NZ_NJCO01000003).

Regarding the addition of an acyl-oxo-acyl C14 at the 2 position, the observed peak at *m/z* 1344.7 (Figure 5) found after mild alkaline treatment (30 min NH₄OH) of *E. cloacae* complex lipid A can only result from structure A (shown in Figure 7) after the loss of the labile substituents on C3 and C3' (see scheme in Figure 6). As mentioned above, *m/z* 1344.7 correspond to a molecule with a C14:0 residue linked to the C14OH at position 2 (it is not located at position 2' and would have been lost during this treatment if located elsewhere). Therefore, between the two main structures of *E. cloacae* lipid A, one is palmitoylated (Figure 7B) and the other is myristoylated (Figure 7A) on the C14OH at C2. In the latter case, the addition of a C14 acyl-oxy-acyl at the C2 position is rare but not novel. A similar feature has been described in *Vibrio cholerae* O 1 lipid A, due to the activity of MsbB [Matson et al., 2010; Tanamoto et al., 2001].

Regarding the palmitic acid present in the hepta-acylated species of lipid A (peaks at *m/z* 2035.8 and 2063.9), after treatment with NH₄OH for 3 h, we observe small peaks at 1372.7 and 1400.8 representing bisphosphorylated and diacylated molecules containing one C12/C14 and one palmitate (C16:0). The fact that C16:0 remains after this harsh treatment indicate that this palmitic group is on position 2. This can only occur in the general structure B because position 2 is already occupied by C14:0 in structure A. Concerning the latter, two positions are available to accommodate C16: 3 and 3'. After 30 min of NH₄OH treatment, small peaks at *m/z* 1809.4 and 1837.5 are visible (not shown) and are attributable to hexa-acylated species containing a secondary C16:0 at position 3' (because the hydroxymyristic acid at position 3 is the absent). In conclusion, when present as a minor substituent in lipid A, C16:0 is on 3' in structure A and on 2 in structure B.

After the cleavage of ester-linked fatty acids with NH₄OH for 30 min (Figure 6), a series of five small peaks attributable to bisphosphorylated molecules with one L-Ara4N (*m/z* 1730.2, 1702.2, 1519.8, 1491.8, and 1293.5) and to trisphosphorylated molecules without L-Ara4N (*m/z* 1679.1, 1651.0, 1468.6, 1242.3, and 1214.3) were visible in the spectrum (marked with * and #, respectively, in Figure 4). In contrast, species with three phosphates and one L-Ara4N were not detected. This is in line with the absence of such molecules in the untreated lipid A (Figure 1) and strongly suggests that the phosphate at position 1 can be substituted either by an L-Ara4N group, or by a phosphate group, but not by a phosphoryl aminoarabinose.

After this step of our analysis, the complete structures of the main molecular species present in *E. cloacae* complex lipid A can now be proposed (Figure 7). Four major and structurally different molecular species are present: In two of these (general structure A), a secondary C14:0 is at position 2, whereas in the two others (general structure B), it is at position 3'. In addition, when present as a minor substituent, a palmitic group (C16:0) is on position 3' in structure A and on position 2 in structure B.

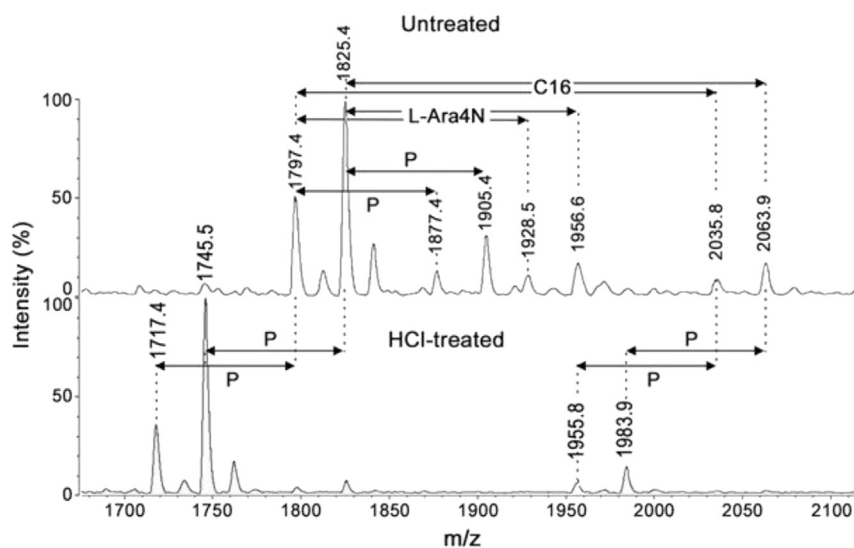


Figure 4. Negative-ion MALDI/TOF mass spectrometry of *E. cloacae* complex H7i (*E. bugandensis* ERIC-PCR Profile low level of chromosomal AmpC beta-lactamase) lipid A, untreated or hydrolyzed with HCl for 10 min at 100°C

P, L-Ara4N and C16 represent m/z shifts corresponding to phosphate, 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and palmitate substituents, respectively.

Similarities and differences in lipid A spectra from *E. cloacae* complex selected strains

Comparison of the lipid A spectrum of the twelve *E. cloacae* complex selected strains in this first step of our study indicated that some peaks were not always present, and additional small peaks were sometimes detectable (Table 2). A tetra-acylated (three hydroxymyristic and one myristic fatty acids) and bisphosphorylated glucosamine disaccharide (peak at $m/z = 1388.7$) is present in five strains (C17, C12, H8, H7o, and H10) but absent from the seven others. It should be noted that in *E. coli*, a tetra-acylated and bisphosphorylated GlcN-disaccharide (precursor IVA) plays an important role in the biosynthesis of the core region (attachment of two Kdo residues to precursor IVA). However, the tetra-acylated precursor IVA of *E. coli* contains four 3OH-C14, whereas the tetra-acylated molecular species observed in these five strains of *E. cloacae* complex contains three 3OH-C14 and one C14:0. The formation of this tetra-acylated species is most likely due to the loss, by enzymatic cleavage, of a myristoxy-myristoyl residue from the hexa-acylated form of lipid A at $m/z 1825.4$. Such a cleavage requires the general structure B displayed in Figure 7, which carries a secondary C14:0 on 3'. No correlation was found between this enzymatic cleavage detected in only five strains (C12, C17, H7o, H8, and H10) and the ERIC-PCR profiles of these strains (profiles H, E, E,C, and F, respectively) and the identification *E. cloacae* complex species.

The presence of other small peaks represents a second type of structural variation between the twelve strains. The small peaks at $m/z 1813.4$ and 1841.4 mentioned above in the spectrum of strain H7i (presence of an α -hydroxy myristic acid), were actually present in four strains: H1, H7o, H7i, and H10 (Table 2). They are due to a 2-hydroxymyristic acid (2OH-C14) which takes the place of the secondary C14:0 in positions 2 (Figure 7A) or 3' (Figure 7B). The same C14:0 can also be replaced by C13:0 (peak at $m/z 1811.4$ in strains C12, H2 and H8) or by C12:0 (peak at $m/z 1769.3$ in strains C17, C18, C12, H8, H7o, and H7i) (Table 2 and Figure 6).

Analysis of the fatty acid composition of LPS by GC-MS confirmed the results obtained by MALDI-TOF, including the presence of small amounts of tridecanoic and 2-hydroxymyristic groups in some LPSs (Figure 2). Trace amounts of a 2-hydroxylauric group (2OH-C12), undetectable by MALDI-TOF, were also detected by GC-MS in the LPSs of strains C12, H1, H9, H7o, H7i, and H10. Other variations among the twelve isolates are produced by the absence of significant MALDI peaks characteristic of the most complete molecular species. This is the case for the absence of pyrophosphate (trisphosphorylated species at $m/z 1877.4$ and 1905.4) in strains C17 and H11 and also the absence of L-Ara4N (peaks at $m/z 1928.5$ and 1956.6) in strains C17, C16, and C12 (Table 2).

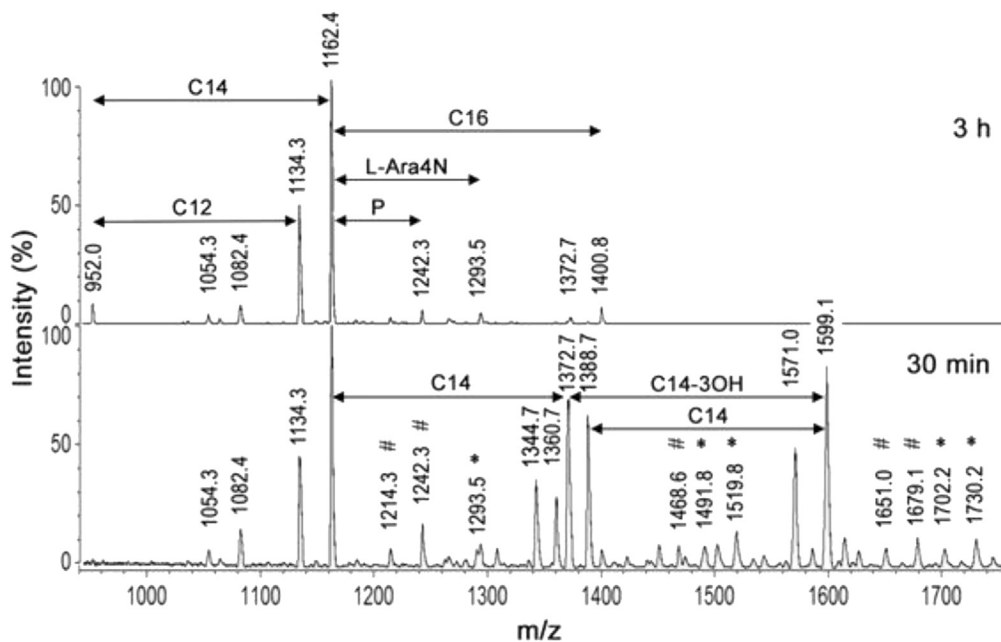


Figure 5. Negative-ion MALDI/TOF mass spectrometry of *E. cloacae* complex H7i (*E. bugandensis* ERIC-PCR Profile low level of chromosomal AmpC beta-lactamase) lipid A treated with ammonium hydroxide (28%, 50°C) for 30 min or 3 h

Marked peaks represent molecular species containing two phosphates and one L-Ara4N (*) or three phosphates without L-Ara4N (#). P, L-Ara4N, C12, C14 and C16 represent m/z shifts corresponding to phosphate, 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, laurate, myristate and palmitate substituents, respectively.

We observed no correlation between the lipid A structures of the different strains, as characterized by their mass spectrum, and their other available features such as their ERIC-PCR profile (A to H), the source from which they were isolated (cavum or blood), or the expression of the cephalosporinase (inducible or over-produced). For example, strains H7o and H7i (isolated from the same infant) have the same ERIC-PCR profile and very similar lipid A mass spectra but differ for the expression of cephalosporinase. Conversely, strains H11 and H7o both have overproduced cephalosporinase but have different lipid A spectra and ERIC-PCR profiles (profiles A and E, respectively).

Immunological effects of LPSs isolated from the *E. cloacae* complex strains

Early biological disturbances in infected newborns (neutropenia, increased C-reactive protein, and procalcitonin), as well as the subsequent observation of a septic shock syndrome, led us to evaluate the production of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) induced by LPSs from the infecting strains. The cytokines were measured *in vitro* after stimulation of monocytic THP-1 cells by purified LPSs extracted from the twelve strains of the *E. cloacae* complex. At high concentrations (>20 ng/mL), the twelve LPSs activated the cells and induced TNF- α and IL-6. To differentiate the activities of these LPSs, we analyzed their inflammatory capacity at low stimulation dose: 1 ng/mL (Figure 8). The results show that the relationship between the structure of lipids A and the proinflammatory power of LPS cannot be explained by the presence of a particular molecular species of lipid A or a particular constituent but involves the contribution of all the different molecular species that compose each lipid A. Only three LPSs, extracted from strains C18, C12, and H11, were able to induce significant production of TNF- α and IL-6 (Figure 8), although at a lower level than *E. coli* J5 LPS stimulation. Since each LPSs extract consists of several molecular species, we can consider that the overall inflammatory response (e.g. IL-6 production) is the sum of the contributions of each molecular species. In Figure 8, the high proinflammatory activity of LPSs C18 and H11 can be explained by the presence of the species with m/z 1928.5 and 1956.6 (Table 2) with a high contribution factor of 71.5 (Table 3), which both contain an L-Ara4N residue (Table 1). However, the presence of L-Ara4N is neither necessary (see LPS C12) nor sufficient (see for instance LPSs H9 and H10) to trigger a strong proinflammatory response. For example, in the strong inflammatory response secondary to LPS C12 stimulation (Figure 8), the absence of L-Ara4N can be overcome by the presence of other species with high contribution factors such as those with m/z 1388.7 and 1717.4.

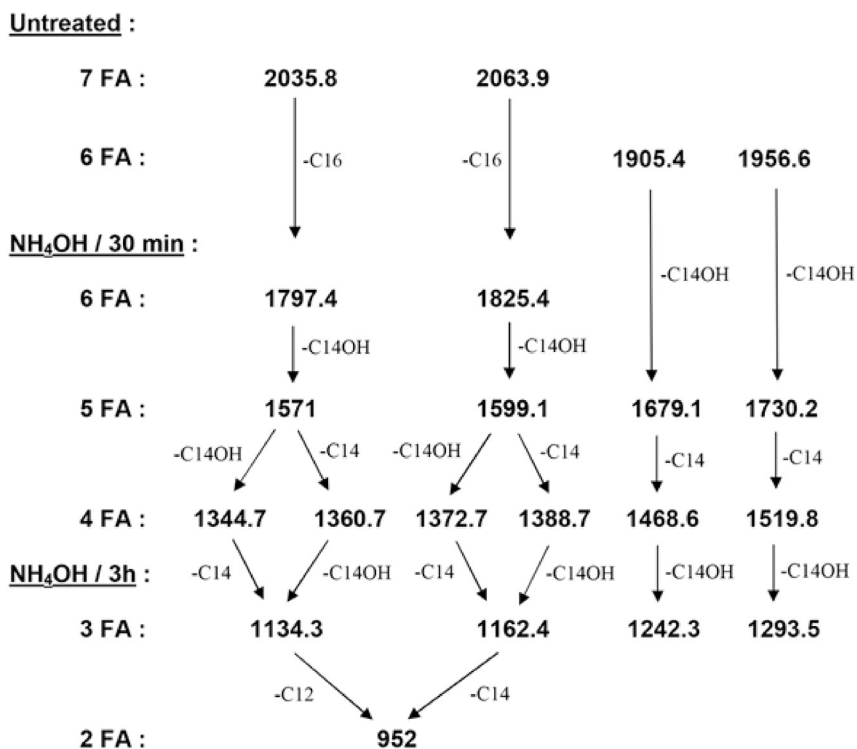


Figure 6. Pattern of cleavage of the molecular species present in the *E. cloacae* complex H7i (*E. bugandensis* ERIC-PCR Profile, with low level of chromosomal AmpC beta-lactamase) during alkaline treatment
Numbers are the *m/z* values observed in MALDI-TOF obtained after treatment with 28% NH₄OH at 50°C for 30 min or 3 hr (see Figure 5). The number of fatty acids (FA) in each species is indicated.

Presence of 2-hydroxymyristate is associated with *E. cloacae* complex neonatal sepsis mortality

Although all the strains selected carry the same major molecular species of lipid A, they differ in minor variants, such as the presence of an L-Ara4N or a pyrophosphate in position 1 and the presence of a 2-hydroxymyristate (2OH-C14) or a C13:0 replacing a myristate (Figure 6). It is therefore possible to classify the strains as a function of the presence in their lipid A of molecular species bearing or not some of these four constituents. By this method, the twelve strains can be clustered into six groups (Table S3). Remarkably, the lethal strains are not distributed randomly in the 6 groups identified but belong to only two groups. This result may suggest that the presence of 2-hydroxy myristate (2OH-C14) (100% [3 of 3] death) and, to a lesser extent, tridecanoate (C13) (1 of 3 death; 33%) markedly enhances the pathological power of the strain as compared to strains without these fatty acids (0% death).

To ensure that there was a correlation between strain lethality and a structural element of its LPS, *E. cloacae* strains isolated from 18 bacteremic infant (septic shock group) and 18 nonbacteremic infants (colonized group) were analyzed. Nonbacteremic infants were matched with bacteremic infants using the Clinical Risk Index for Babies II score in order to have two homogeneous populations for comparisons (Table S1). Strains from the septic shock group were isolated from the blood culture, while in the colonized infants, 9 strains were isolated from the cavum and 9 from the rectum (Table S4). Of the 36 infants, 13 infants died within the first month after birth; of which, 12 in the group of infected infants and 1 in the group of colonized infants. When death occurred, it occurred on a median of 8 days (IQR 4–11) after birth. The lipid A of 7 of the 18 blood culture isolates contained 2OH-C14 (Table S1) (*E. bugandensis* *n* = 5 and *E. hormaechei* *n* = 2). In LPS H9, 2-hydroxymyristate (2OH-C14) was undetectable in the MALDI spectrum (absence of peaks at *m/z* 1813.4 and 1841.4; Table 2) and almost absent by GC-MS analysis (0.5%) as compared to the mean amount of this constituent in other strains (4.3 ± 1.4%). Therefore, we considered that LPS H9 is devoided of 2OH-C14.

Patients with *E. cloacae* complex septic shock and 2OH-C14 on LPS Lipid A were compared with those without the marker. Patients with LPS bearing 2OH-C14 had higher Vasolotropic score (*p* = 0.03) and

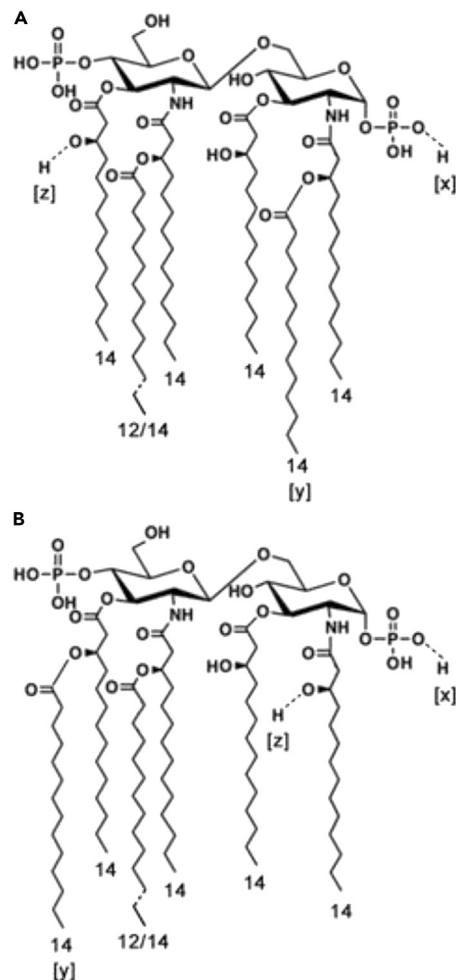


Figure 7. Structure of the major molecular species in the *E. cloacae* complex H7i (*E. bugandensis* ERIC-PCR Profile; with low level of chromosomal AmpC beta-lactamase)

Structures (A and B) are present in almost equal amounts. [x] minor substituents: L-Ara4N/PO3H2; [y] minor variants: C12:0/C13:0/2OH-C14; [z] minor substituent: C16:0.

were more likely to develop oliguria ($p = 0.02$) than those without 2OH-C14. Excluding deaths nonattributable to *E. cloacae* complex sepsis, the hazard ratio for death in children with *E. cloacae* complex septic shock group with 2OH-C14, as compared with the group without 2OH-C14, was 13.5 (95% CI, 1.61 to 113.1; $p = 0.016$). Survival curve of infants with septic shock with or without the presence of 2OH-C14 in *E. cloacae* complex neonatal sepsis (Figure 9). Six deceased infants without presence of 2OH-C14 (infants H6, H8, H23, H24, H27, H28) died of pulmonary hemorrhage, meningitis, necrotizing enterocolitis, or cerebral hemorrhage, conditions not related to the *E. cloacae* complex septic shock.

DISCUSSION

Here, we provide the first evidence that presence of 2-hydroxymyristic acid moiety on lipid A structure is directly associated with mortality in neonates with *E. cloacae* complex septic shock, linking endotoxins structures with sepsis outcome.

Bacteria employ several means to protect themselves from adverse environmental stimuli, including exposure to antibiotics. Most of these strategies target the cell surface and are related in part to LPS changes, including modification of their O antigen or of their lipid A moieties [Simpson and Trent, 2019]. One strategy used by bacteria to protect themselves includes deacylation, hydroxylation, and palmitoylation by

Table 2. Peaks present in MALDI-TOF spectra of lipid A isolated from various *E. cloacae* complex strains

	Source of isolation											
	Cavum				Blood							
Strain designation	C17	C18	C16	C12	H1	H2	H11	H9	H8	H7o	H7i	H10
Identification species ^a	NP	NP	NP	NP	E.h	E.h	E. h	E.b	E.h	E.b	E.b	E.b
ERIC-PCR profile	E	F	G	H	A	A	A	B	C	E	E	F
Overproduction of AmpC ^a	N	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	Y	N	N

<i>m/z</i> (calculated)	Peaks present in the spectra											
1388.7	+			+					+	+		+
1599.1												+
1717.4	+		+	+								+
1745.5	+	+	+	+		+			+	+	+	+
1769.3	+	+		+					+	+	+	
1783.4				+								
1797.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1811.4				+		+			+			
1813.4										+	+	+
1825.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1841.4					+					+	+	+
1877.4		+		+				+	+	+	+	+
1905.4		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
1928.5		+			+	+	+	+	+	+	+	+
1956.6		+			+	+	+	+		+	+	+
2035.8	+	+		+		+		+	+	+	+	+
2063.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2143.8		+							+			+

^aN: No; Y: Yes. NP, not performed; E.h, *Enterobacter hormaechei*; E.b, *Enterobacter bugandensis*.

PagP of their lipid A (the biologically active region). With regard to deacylation, the retention of a primary 3-hydroxytetradecanoic acid at the 3-O position in the lipid A of *E. cloacae* complex is presumably due to the lack of expression of the PagL deacylase, which has been associated in *P. aeruginosa* with enhanced resistance to β -lactam antibiotics [Ernst et al., 2006]. Concerning palmitoylation, in the *E. cloacae* complex, species described here a secondary C16:0 substituent can be fixed either on position 2 (Figure 7B) or on position 3' (Figure 7A). This reminds the result obtained with *Bordetella parapertussis* lipid A where a secondary C16:0 substituent is present at both positions 2' and 3' [Petrou et al., 2016]. However, in the *E. cloacae* complex, these two positions are not simultaneously substituted with C16:0 (absence of a molecular species containing two C16:0 residues).

Other alterations of the lipid A moiety can be achieved through the addition of phosphoethanolamine and 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N), which decreases the net negative charge of lipid A. Interestingly, one of these frequent cationic binding group (e.g., ethanolamine) has not been found in lipid A from the *E. cloacae* complex, thus pointing to a preferential role for L-Ara4N. Unlike in *E. coli* and *S. enterica* where L-Ara4N is mainly fixed at the P4' site by the relevant glycosyltransferase ArnT [Trent et al., 2001], we found that this phosphate substituent is linked to position 1 in the *E. cloacae* complex. This is due to the fact that the site of transfer of L-Ara4N depends on the structural features of the homolog of ArnT present in a given bacteria. For example, ArnT from *Cupriavidus metallidurans* yields only a single lipid A species modified at the 1-phosphate position, whereas ArnT from *S. enterica* serovar Typhimurium adds L-Ara4N to both the 1 and 4' phosphates of lipid A [Petrou et al., 2016]. In particular, in lipid A precursors that accumulate in *S. typhimurium* mutants defective in Kdo biosynthesis, L-Ara4N is linked exclusively to the 1-phosphate

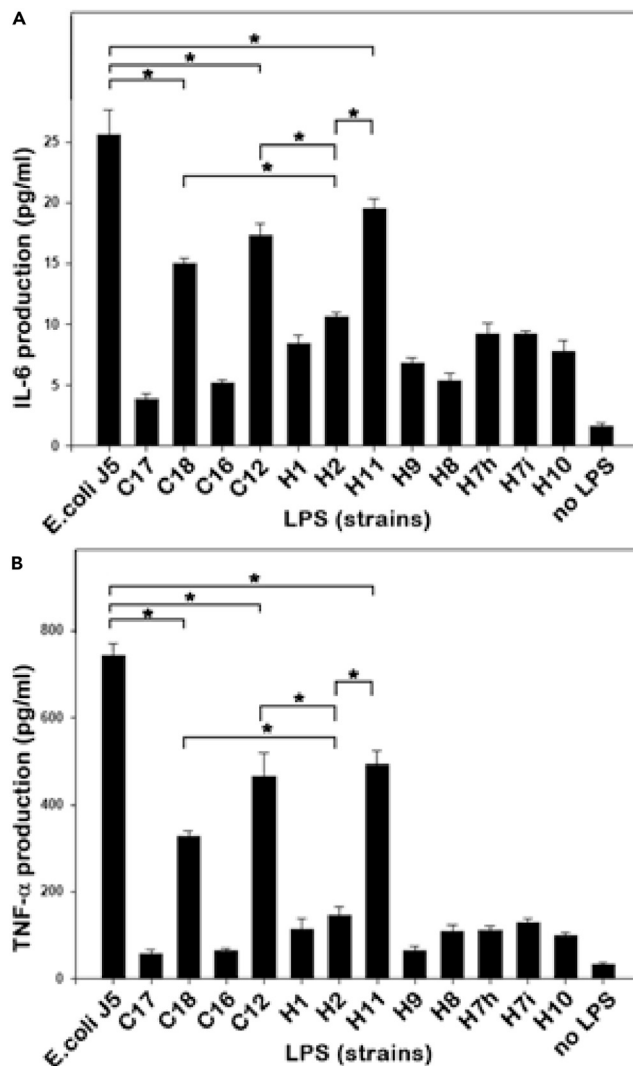


Figure 8. Cytokines secreted by THP-1 cells stimulated by LPSs from various *E. cloacae* complex strains

10^6 THP-1 cells were stimulated for 24 hr with 1 ng/mL of purified LPS from different *E. cloacae* complex strains or from *E. coli* J5.

(A) IL-6 production.

(B) TNF- α production. Results are expressed as the mean and standard deviation of 9 values (Three independent experiments in triplicate). Significance was determined using the GraphPad Prism8 software, by two-tailed Student's t-test. *: $p < 0.0001$.

[Zhou et al., 2000]. In another bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family, *Yersinia pestis*, the substituent L-Ara4N is also in both the 1' and 4' positions [Knirel et al., 2005]. Substitution of position 1 by L-Ara4N has also been found outside Enterobacteriaceae: Ernst et al. reported that L-Ara4N can also be attached to the 1-phosphate in a penta-acylated form of *P. aeruginosa* lipid A isolated from cystic fibrosis patients [Ernst et al., 2007]. The lipid A of *Burkholderia cenocepacia* contains also an L-Ara4N substituent on position 1 [De Soya et al., 2008].

It has been noted by Zhou et al. [Zhou et al., 2001] that in a *Salmonella* mutant lacking L-Ara4N, a lipid A species containing a 1-pyrophosphate moiety was detectable. On the other hand, *E. coli* induced to incorporate L-Ara4N by culture in vanadate was no longer able to produce a 1-pyrophosphate variant of lipid A. To explain these puzzling observations, the authors suggested that incorporation of an L-Ara4N group is incompatible with the biosynthesis of the lipid A 1-pyrophosphate, possibly because of competition for a common donor substrate. Our results show that this is not the case in *E. cloacae* complex since many strains

Table 3. Contribution of the different molecular species of lipid A to the overall pro-inflammatory activity of the LPSs of *E. cloacae* complex strains

Molecular species (m/z)	Contribution factor to IL-6 production
1388.7	+78.4
1599.1	0
1717.4	+78.4
1745.5	+16.8
1769.3	- 3.6
1783.4	0
1797.4	- 41.2
1811.4	- 16.5
1813.4	- 44.6
1825.4	- 41.2
1841.4	- 44.6
1877.4	- 3.5
1905.4	+33.4
1928.5	+71.5
1956.6	+71.5
2035.8	- 42.7
2063.9	- 41.2
2143.8	- 5.0

of this microorganism can produce the two types of lipid A: with a 1-pyrophosphate or a 1-aminoarabinose moiety.

One of the main objectives of our study was to identify relationships between the structures of the major biologically active component of the bacteria – lipid A – and the proinflammatory effect of the bacterial portage. The difficulty was that each *E. cloacae* complex strain bears multiple forms of LPSs that differ even in their lipid A regions. However, a mathematical analysis of the correspondence between the presence of the different molecular species and the IL-6 response of THP-1 cells allowed us to determine a coefficient of contribution of each species to the overall inflammatory response (Table 3). Four major contributors emerged (molecular species at m/z 1717.4, 1388.7, 1928.5, and 1956.6), with contribution factors higher than 70. The species at m/z 1717.4 results from the elimination of a phosphate group from the species at m/z 1797.4 by the action of a lipid A phosphatase. Cleavage by a 4'-phosphatase is unlikely because this type of phosphatase would also act on the species at m/z 1928.5 and lead to a peak at 1748.5, which is not observed. Therefore, the species at m/z 1717.4 is likely due to a 1-phosphatase as already found in *Francisella* and *Rhizobium* [Wang et al., 2006; Karbarz et al., 2003]. The second important contributor to inflammation is the species at m/z 1388.7. The production of this tetra-acylated species is likely due to the loss, by enzymatic cleavage, of a myristoxy-myristoyl residue from the hexa-acylated form of lipid A at m/z 1825.4. This cleavage is typically due to a homolog of LpxR, a Ca²⁺-dependent outer membrane lipase which cleaves the complete 3'-acyloxyacyl moiety of lipid A [Reynolds et al., 2006]. The fact that the peak at m/z 1388.7 is present in only five of the twelve strains studied indicates that the activity of this homolog of LpxR in the *E. cloacae* complex must be regulated. The mechanism of this regulation within the outer membrane is unknown but would certainly deserve particular attention because it can be expected that removal of the acyloxyacyl chain would substantially influence the recognition of LPSs by its TLR4:MD2 receptor complex.

It is generally accepted that for complete activation of the TLR4:MD-2 complex, a lipid A structure with six acyl chains and two phosphate groups is critical [Park et al., 2009]. Here, we see that the "incomplete" *E. cloacae* complex molecular species, at m/z 1388.7 and 1717.4, which do not meet those conditions, are nevertheless the best contributors to proinflammatory activity. Such theoretic discordance is also illustrated in *Neisseria meningitidis* expressing PagL deacylase that provides tetra-acylated LPS species but is biologically more active than the LPS from wild-strain *Neisseria meningitidis* [Zariri et al., 2016]. This

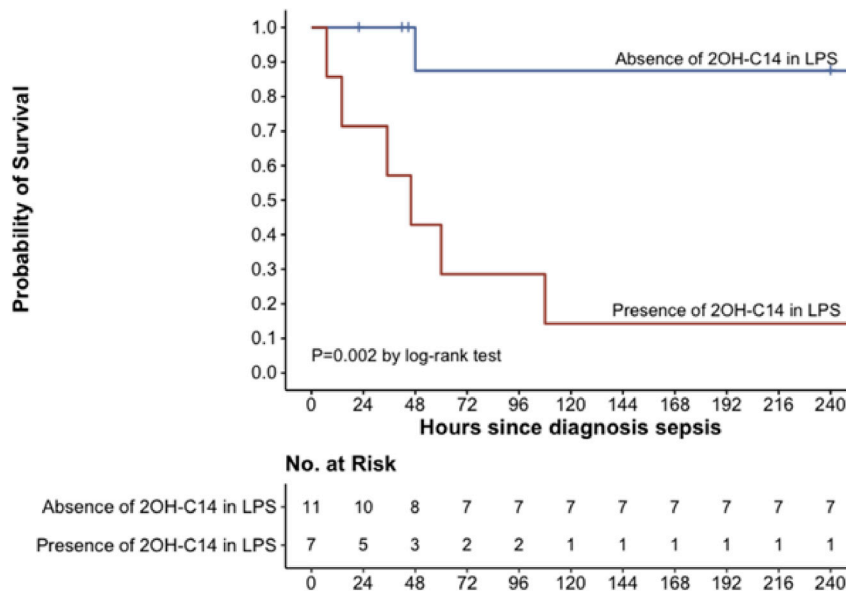


Figure 9. Kaplan–Meier survival curves in bloodstream infections due to *E. cloacae* complex, as a function of the presence or absence of 2OH-C14 on LPS Lipid A

Red line: presence of 2OH-C14 on LPS Lipid A; Blue line: absence of 2OH-C14 on LPS Lipid A. Log rank test was performed using the R Statistical Software. p value < 0.05 was considered as significant.

paradoxical observation may result from the fact that the LPS:TLR4:MD2 complex triggers signaling via both the MyD88 and TRIF pathways as well as LPS recognition may be modulated by others proteins and cofactors. It is therefore possible that in conditions as encountered during sepsis where several molecular species of lipid A are present, the joint existence of the two TLR4:MD2 signaling pathways may allow incomplete forms of lipid A to contribute to inflammation through synergistic or antagonistic effects. The only two species containing L-Ara4N (at *m/z* 1928.5 and 1956.6) are also important contributors to inflammation. However, they are present in eight out of twelve LPSs (Table 2) and therefore cannot explain the differences in their inflammatory activity alone.

Pathogenicity of *E. cloacae* complex sepsis is multifactorial, with the involvement of a number of putative virulence factors. Barnes et al. [Barnes et al., 1997] reported that *E. cloacae* complex strains produce enterotoxins, α -hemolysin, and pore-forming cytotoxins after adhesion to epithelial cells. In addition, Krzyminska et al. [Krzyminska et al., 2009, 2010] found that genes of the type III secretion system that delivers bacterial toxins directly into the host cells are present in 27% of clinical isolates of *E. cloacae* complex, indicating that these bacteria may destroy phagocytes and epithelial cells and then disseminate with the host interstitial tissue. It has also been demonstrated that *E. cloacae* complex strains may induce apoptosis of human epithelial intestinal cells [Raetz, 2001]. This may represent another strategy of the *E. cloacae* complex, leading to tissue destruction and bacterial spreading resulting in systemic infection. Endotoxins remain a major, and well recognized, pathogenic effector of septic shock. In our patients, the fulminant and lethal course of the disease was suggestive of acute endotoxemia. Whether patients with asymptomatic *E. cloacae* complex carriage had different endotoxins structures than patients with septic shock was obvious. Identification of small amounts of α -hydroxymyristic acid (2OH-C14) replacing the secondary C14:0 chain in position 2 (Figure 7A) or in position 3' (Figure 7B) in patients with septic shock and not in patients with asymptomatic carriage urges to re-evaluate its role in Enterobacteriaceae pathogenesis and 2OH-C14 biosynthesis. In many bacteria (*Salmonella*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*) the *lpxO* gene encodes a dioxygenase that transforms into 2OH-C14 a secondary myristate exclusively the 3' position [Raetz, 2001; Lobet et al., 2015; Bartholomew et al., 2019; Lo Sciuto et al., 2019]. In other bacteria such as several *Bordetella* species (*Bordetella avium*, *Bordetella trematum*, *Bordetella hinzii*, and *Bordetella petrii*) a homolog of *lpxO* acts on the secondary substituted chains in positions 2 and 2' (and not in 3' as in *Salmonella*) [Novikov et al., 2014].

Our results showing that 2OH-C14 is a secondary substituent at position 2 in some molecular species (Figure 7A) and 3' in others (Figure 7B) suggest that homologs of these two variants of LpxO are both present in the *E. cloacae* complex. It should be noted that 2OH-C14 may be absent, even in the presence of LpxO, if an enzyme homologous to LpxL2 is absent. Indeed, LpxO only modifies a secondary myristate group previously transferred by LpxL2. Only one study reported the virulence of *E. bugandensis* in the NICU (strain EB-247) [Pati et al., 2018]. *In silico* analysis of EB-247 genome shows the absence of *lpxO* homolog (GenBank: NZ_LT992502). After isolating lipid A moieties from strain EB-247, no peak corresponding to the 2-hydroxymyristate residue (m/z 1813.4 and 1841.4) were identified from the MALDI-TOF spectrum (Figure S2) and LPSs analysis by GC-MS did not retrieve α -hydroxymyristic acid (data not shown).

Our analyses of lipid A structures by MALDI-TOF, followed by GC-MS analyses of their fatty acid content, showed for the first time an indisputable correlation between the presence of 2-hydroxymyristic acid on lipid A and mortality due to *E. cloacae* complex septic shock (Figure 8). In contrast, lethality was neither correlated with any other structural features nor species identification within the *E. cloacae* complex and phenotypic markers such as ERIC-PCR profiles or overproduction of AmpC cephalosporinase. The role of 2-hydroxymyristate as a virulence factor is also supported by Merritt et al. with *B. pseudomallei* [Merritt et al., 2006]. The effect of 2-hydroxymyristate could be to increase hydrogen bonds between adjacent lipid A chains, which would increase the membrane's resistance to the penetration of antimicrobial cationic peptides used as defense mechanisms. Raetz's group [Gibbons et al., 2000] proposed another interesting hypothesis that could explain the role of 2OH-C14 as a virulence factor: during infection, 2-hydroxymyristic acids released by LPS through leukocyte acyloxyacyl hydrolase would be converted to 2-hydroxymyristoyl coenzyme A, a well-known potent inhibitor of N-myristoyl transferase that is required for cell signaling. This would gradually destroy, by apoptosis, the immune cellular effectors.

Identification of 2-hydroxymyristic acid as a virulence factor and prognosis markers in *E. cloacae* complex sepsis opens the possibility of using it as a marker of clinical severity, marker of antibiotics therapy initiation, as well as *E. cloacae* complex pathogenicity stratification.

Limitations of study

Our findings need to be confirmed in larger studies and expanded to other gram-negative bacteria such *K. pneumonia* and other *Enterobacter* encountered in patients with septic shock.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESSOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Patients
- METHOD DETAILS
 - Identification, antimicrobial susceptibility testing, molecular typing of *E. cloacae* complex
 - LPS and lipid A extraction and analysis
 - Fatty acid composition of LPSs analyzed by gas chromatography/mass spectrometry
 - Endotoxins cytokines assay
 - Lipid A structures pro-inflammatory potency
 - Screening of *lpxO* by real-time PCR
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
 - Statistical analysis

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102916>.

ACKNOWLEDGMENTS

We appreciate the aid of the neonatal intensive care unit nurses and physicians of the Antoine Bécclère Hospital. We acknowledge Francois Guerin, PhD and Vincent Cattoir, PhD, Center Hospitalier de Rennes, France, for providing *E. bugandensis* EB-247 strain. This research was supported by a research grant from the Clara Belliveau Association to PT.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PT set the original hypothesis and write the manuscript. LA performed and analyzed data from most of the studies. NN participated in *E. cloacae* complex isolation and identification and in genetic studies. AB performed LPS purification and MALDI analyses. SB performed the clinical study and statistical analyses. EHA and SG performed *E. cloacae* complex identification and antimicrobial susceptibility testing. VF organized the microbiological and hygiene follow-up of all patients. NS performed endotoxins immune function testing, DDL organized the clinical management of all patients and participated in the study design. RC helped with design and analysis of mass spectrometry data and writing the manuscript. FDP and PT conceived, designed, and supervised all studies. All authors contributed to the critical review of the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

All authors declare no competing interests. International patent request PCTEP2020082771 submitted on November 19, 2020 titled: "Procédé de pronostic de la virulence et de la pathogénicité de souches de bactéries gram négatifs" (national patent registration number FR3103561)

Received: February 11, 2021

Revised: May 11, 2021

Accepted: July 27, 2021

Published: August 20, 2021

REFERENCES

- Barnes, A.I., Ortiz, C., Paraje, M.G., Balanzino, L.E., and Albesa, I. (1997). Purification and characterization of a cytotoxin from *Enterobacter cloacae*. *Can. J. Microbiol.* **43**, 729–733.
- Bartholomew, T.L., Kidd, T.J., Sá Pessoa, J., Conde Álvarez, R., and Bengoechea, J.A. (2019). 2-Hydroxylation of *Acinetobacter baumannii* lipid A contributes to virulence. *Infect Immun.* **87**, e00066–19.
- Chafchaoui-Moussaoui, I., Novikov, A., Bhrada, F., Perry, M.B., Filali-Maltouf, A., and Caroff, M. (2011). A new rapid and micro-scale hydrolysis, using triethylamine citrate, for lipopolysaccharide characterization by mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**, 2043–2048.
- Dalben, M., Varkulja, G., Basso, M., Krebs, V.L., Gibelli, M.A., van der Heijden, I., Rossi, F., Duboc, G., Levin, A.S., and Costa, S.F. (2008). Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. *J. Hosp. Infect.* **70**, 7–14.
- Davin-Regli, A., Lavigne, J.P., and Pagès, J.M. (2019). *Enterobacter* spp./update of Taxonomy, Clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, e00022–19.
- De Soyza, A., Silipo, A., Lanzetta, R., Govan, J.R., and Molinaro, A. (2008). Chemical and biological features of *Burkholderia cepacia* complex lipopolysaccharides. *Innate Immun.* **14**, 127–144.
- Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., Yao, M., et al. (2009). Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ. Res.* **109**, 511–517.
- Ernst, R.K., Adams, K.N., Moskowicz, S.M., Kraig, G.M., Kawasaki, K., Stead, C.M., Trent, M.S., and Miller, S.I. (2006). The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *J. Bacteriol.* **188**, 191–201.
- Ernst, R.K., Moskowicz, S.M., Emerson, J.C., Kraig, G.M., Adams, K.N., Harvey, M.D., Ramsey, B., Speert, D.P., Burns, J.L., and Miller, S.I. (2007). Unique lipid A modifications in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the airways of patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **196**, 1088–1092.
- Gibbons, H.S., Lin, S., Cotter, R.J., and Raetz, C.R. (2000). Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymyristate moiety in *Salmonella typhimurium* lipid A: function of LpxO, a new Fe²⁺/α-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* **275**, 32940–32949.
- Harbarth, S., Sudre, P., Dharan, S., Pittet, M., and Pittet, D. (1999). Outbreak of *Enterobacter cloacae* related to understaffing, overcrowding, and poor hygiene practices. *Infect. Control Hosp. Practices* **20**, 598–603.
- Herson, D.S., McGonigle, B., Payer, M.A., and Baker, K.H. (1987). Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1178–1180.
- Hoffmann, H., and Roggenkamp, A. (2003). Population genetics of the nomenclature species *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5306–5318.
- Jang, E.B., and Nishijima, K.A. (1990). Identification and attractancy of bacteria associated with *Dacus dorsalis* (Diptera, Tephritidae). *Environ. Entomol.* **19**, 1726–1731.
- Karbarz, M.J., Kalb, S.R., Cotter, R.J., and Raetz, C.R. (2003). Expression cloning and biochemical characterization of a *Rhizobium leguminosarum* lipid A 1-phosphatase. *J. Biol. Chem.* **278**, 39269–39279.
- Krzyminska, S., Mokracka, J., Koczura, R., and Kaznowski, A. (2009). Cytotoxic activity of *Enterobacter cloacae* human isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **56**, 248–252.
- Krzyminska, S., Koczura, R., Mokracka, J., Puton, T., and Kaznowski, A. (2010). Isolates of the *Enterobacter cloacae* complex induce apoptosis of human intestinal epithelial cells. *Microb. Pathog.* **49**, 83–89.
- Keller, R., Pedroso, M.Z., Ritchmann, R., and Silva, R.M. (1998). Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect. Immun.* **66**, 645–649.
- Knirel, Y.A., Lindner, B., Vinogradov, E.V., Kocharova, N.A., Senchenkova, S.N., Shaikhutdinova, R.Z., Dentovskaya, S.V., Fursova, N.K., Bakhteeva, I.V., Titareva, G.M., et al. (2005). Temperature-dependent variations and

intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. *Biochemistry* 44, 1731–1743.

Llobet, E., Martínez-Moliner, V., Moranta, D., Dahlström, K.M., Regueiro, V., Tomás, A., Cano, V., Pérez-Gutiérrez, C., Frank, C.G., Fernández-Carrasco, H., et al. (2015). Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112, E6369–E6378.

Lo Sciuto, A., Cervoni, M., Stefanelli, R., Spinnato, M.C., Di Giambardino, A., Mancone, C., and Imperi, F. (2019). Genetic basis and Physiological effects of lipid A hydroxylation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Pathogens* 8, 291.

Marchini, D., Rosetto, M., Dallai, R., and Marri, L. (2002). Bacteria associated with the oesophageal bulb of the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera : tephritidae). *Curr. Microbiol.* 44, 120–124.

Matson, J.S., Yoo, H.J., Hakansson, K., and Dirita, V.J. (2010). Polymyxin B resistance in El Tor *Vibrio cholerae* requires lipid acylation catalyzed by MsbB. *J. Bacteriol.* 92, 2044–2052.

Mayhall, C.G., Lamb, V.A., Gayle, W.E., Jr., and Haynes, B.W., Jr. (1979). Enterobacter cloacae septicemia in a burn center: epidemiology and control of an outbreak. *J. Infect. Dis.* 139, 166–171.

Merritt, A., Inglis, T.J.J., Chidlow, G., and Harnett, G. (2006). PCR-based identification of *Burkholderia pseudomallei*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 48, 239–244.

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593–656.

Novikov, A., Shah, N.R., Al Bitar-Nehme, S., Basheer, S.M., Trento, I., Tirsoaga, A., Moksa, M., Hirst, M., Perry, M.B., Hamidi, A.E., et al. (2014). Complete *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii* and *Bordetella trematum* lipid A structures and genomic sequence analyses of the loci involved in their modifications. *Innate Immun.* 20, 659–672.

Olaitan, A.O., Morand, S., and Rolain, J.M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired

and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 5, 643.

Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.S., Lee, H., and Lee, J.O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458, 1191–1195.

Pati, N.B., Dojjad, S.P., Schultze, T., Mannala, G.K., Yao, Y., Jaiswal, S., Ryan, D., Suar, M., Gwozdziński, K., Bunk, B., et al. (2018). Enterobacter bugandensis: a novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. *Sci. Rep.* 8, 5392.

Peschel, A., and Sahl, H.G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 529–536.

Petrou, V.I., Herrera, C.M., Schultz, K.M., Clarke, O.B., Vendome, J., Tomasek, D., Banerjee, S., Rajashankar, K.R., Belcher Dufrisne, M., Kloss, B., et al. (2016). Structures of aminoarabinose transferase ArnT suggest a molecular basis for lipid A glycosylation. *Science* 351, 608–612.

Raetz, C.R.H. (2001). Regulated covalent modifications of lipid A. *J. Endotoxin Res.* 7, 73–78.

Reynolds, C.M., Ribeiro, A.A., McGrath, S.C., Cotter, R.J., Raetz, C., and Trent, M.S. (2006). An outer membrane enzyme encoded by *Salmonella typhimurium* lpxR that removes the 3'-acyloxyacyl moiety of lipid A. *J. Biol. Chem.* 281, 21974–21987.

Silipo, A., Lanzetta, R., Amoresano, A., Parrilli, M., and Molinaro, A. (2002). Ammonium hydroxide hydrolysis: a valuable support in the MALDI-TOF mass spectrometry analysis of Lipid A fatty acid distribution. *J. Lipid Res.* 43, 2188–2195.

Simpson, B.W., and Trent, M.S. (2019). Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 403–416.

Tanamoto, K.I., Iida, T., Haishima, Y., and Azumi, S. (2001). Endotoxic properties of lipid A from *Comamonas testosteroni*. *Microbiology* 147, 1087–1094.

Trent, M.S., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J., and Raetz, C.R. (2001). An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J. Biol. Chem.* 276, 43122–43131.

Wang, X., McGrath, S.C., Cotter, R.J., and Raetz, C.R. (2006). Expression cloning and periplasmic orientation of the *Francisella novicida* lipid A 4'-phosphatase LpxF. *J. Biol. Chem.* 281, 9321–9330.

Watson, J.T., Jones, R.C., Siston, A.M., Fernandez, J.R., Martin, K., Beck, E., Sokalski, S., Jensen, B.J., Arduino, M.J., Srinivasan, A., and Gerber, S.I. (2005). Outbreak of catheter-associated *Klebsiella oxytoca* and Enterobacter cloacae bloodstream infections in an oncology chemotherapy center. *Arch. Intern. Med.* 165, 2639–2643.

Westphal, O., and Jann, K. (1965). Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.* 5, 83–91.

Zariri, A., Pupo, E., van Riet, E., van Putten, J.P.M., and van der Ley, P. (2016). Modulating endotoxin activity by combinatorial bioengineering of meningococcal lipopolysaccharide. *Sci. Rep.* 6, 2045–2322.

Zhou, Z., Ribeiro, A.A., and Raetz, C.R.H. (2000). High-resolution NMR spectroscopy of lipid A molecules containing 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and phosphoethanolamine substituents. Different attachment sites on lipid A molecules from NH4VO3-treated *Escherichia coli* versus *kdsA* mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 275, 13542–13551.

Zhou, Z., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J., Miller, S.I., and Raetz, C.R. (2001). Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J. Biol. Chem.* 276, 43111–43121.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Deposited data		
Repository data from this study	Anonymous patient data upon request	NA
Software and algorithms		
R Studio (R core Team, 2018; R Foundation for statistical Computing)	https://www.r-project.org/	NA

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and request for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Pierre Tissières (pierre.tissieres@i2bc.paris-saclay.fr).

Materials availability

This study did not generated new unique reagents.

Data and code availability

Data reported in this paper will be shared by the lead contact upon request. This paper does not report original code. Any additional information and requests for ressources and reagents should be directed and will be fullfield by the lead contact.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Patients

Retrospective analysis of all newborn hospitalized in the NICU of the Bécélère Hospital with *E. cloacae* complex septic shock. Septic shock was defined as a sepsis associated with more than two organ failure requiring vasoinotropic support. The study was approved by ethical committee of the French Society of Intensive Care (CE SRLF 19–40). Legal representatives were informed and agreed on the use of the clinical data. Gender of patients was equally balanced (male $n = 15$; female $n = 21$). All patients were neonates with a median gestational age of 27 weeks (See [Table S1](#)). Influence of gender, age and developmental stage may have influence host response to *E. cloacae* infection and were not studied.

METHOD DETAILS

Identification, antimicrobial susceptibility testing, molecular typing of *E. cloacae* complex

E. cloacae complex isolates from blood cultures or colonization sites (cavum) in hospitalized infants were obtained from the microbiology laboratory of Antoine Beclere hospital. Bacteria were inoculated on Columbia agar with 5% sheep blood ((bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and were incubated overnight at 37°C. Identification of the *E. cloacae* complex was performed with mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) (Bruker, Leipzig, Germany) according to the manufacturer's instructions. In addition, we distinguished the different species among the *E. cloacae* complex as previously described [[Hoffmann and Roggenkamp, 2003](#)]. Antimicrobial susceptibility testing was performed using agar disk diffusion method on Mueller-Hinton (MH, Bio-Rad, Hercules, CA) according to the Eucast guidelines (<http://www.eucast.org/>). Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) was performed according to Duan [[Duan et al., 2009](#)]. ERIC banding patterns obtained from the agarose gel electrophoresis were used to define different profiles.

LPS and lipid A extraction and analysis

We selected twelve of *E. cloacae* complex strains from blood cultures ($n = 8$) and from colonization sites ($n = 4$) which differed in several of their characteristics, including ERIC-PCR profiles, antibiotic resistance

profiles or identification species to lipid A extraction and analysis (Table S2). All MALDI-TOF and GC-MS experiment were representative of two to five independent experiment in triplicate.

Bacteria were grown overnight at 37°C in LB broth (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, MI), and LPSs were isolated by the phenol/water method of Westphal and Jann [Westphal and Jann, 1965]. Briefly, the wet pellet of bacteria was stirred in 45% aqueous phenol at 65°C for 30 min, insoluble material was removed from the cooled water phase by centrifugation and the clear extract was dialyzed under running tap water until free of phenol, then dialyzed against distilled water [Chafchaoui-Moussaoui et al., 2011]. Extracts were subjected to enzyme treatments (DNAse, RNAse, and proteinase K) to remove DNA, RNA, and proteins, and further purified with acidified chloroform-methanol-water to remove contaminating phospholipids and lipoproteins. LPSs were then washed by suspension in cold methanol, centrifuged (7000 × g) and dried under a stream of air. Lipid A was prepared by the triethylamine-citrate method [Chafchaoui-Moussaoui et al., 2011]. Briefly, the LPS sample was suspended at a concentration of 10 µg/µL in a 0.01 M triethylamine-citrate solution (1:1 molar ratio, pH 3.6) and heated for 1 hr at 100°C. The sample was then lyophilized and suspended in methanol. After centrifugation (7000 × g for 10 min at 4°C), lipid A was extracted with a mixture of chloroform: methanol: water (3: 1.5: 0.25; by vol.) at a concentration of 10 µg/µL. The molecular species present in this preparation were analyzed using a AXIMA performance (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Institute of Integrative Biology of the Cell, CNRS, CEA, Paris Saclay University, Gif-sur-Yvette, France). A suspension of lipid A (1 µg/µL) in chloroform: methanol: water (3:1.5:0.25, v:v:v) was desalted with a few grains of Dowex 50W-X8 (H+), 1 µL was deposited on the target mixed with 1 µL of a gentisic acid (2,5-dihydroxybenzoic acid) matrix (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, MI) suspended at 10 µg/µL in the same solvent or in 0.1 M aqueous citric acid, and dried. Analyte ions were desorbed from the matrix with pulses from a 337 nm nitrogen laser. Spectra were obtained in the negative-ion mode at 20 kV, with the linear detector. Mass calibration was performed with the peptide mass standards kit of AB SCIEX, or with a purified and structurally characterized LPS sample from *B. pertussis* and *E. coli* J5 prepared in our laboratory.

Fatty acid composition of LPSs analyzed by gas chromatography/mass spectrometry

The LPS samples (200 µg) were incubated at 85°C for 15 to 18 hr in 600 µL of a mixture of anhydrous methanol/acetyl chloride (10/1.5 by vol.) containing 4 µg of arachidic (eicosanoic) acid (C20) used as an internal standard. After this transmethylation reaction, methanol was evaporated under vacuum at room temperature, the resulting fatty acid methyl esters were extracted in ethyl acetate (600 µL), and the solvent was evaporated at room temperature under a stream of nitrogen. The material was dissolved in 50 µL of ethyl acetate and the solution (1–5 µL) was analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) in a Shimadzu (GCMS-QP2010SE) apparatus. A capillary column from Phenomenex (Zebron ZB-5MS, 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) was used with a temperature gradient from 50°C to 120°C (20°C/min) followed by a gradient from 120°C to 250°C (3°C/min) and finally a constant temperature (250°C for 2 min). Fatty acids were identified by their mass spectra and their retention times compared to fatty acid standards (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, MI).

Endotoxins cytokines assay

THP-1 cell (ATCC, Old Town Manassas, VA) were cultured at 37°C in humid air with 5% CO₂, in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated (56°C, 30 min) fetal bovine serum (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, MI). Viable THP-1 cells (10⁶ cells in 2 mL of culture medium) were added to each well of tissue culture-treated, flat-bottomed, non-pyrogenic, polystyrene 6-well plates and stimulated with 1 ng/mL LPS, no LPS added was the control. The LPS extracted from *E. coli* J5 (ATCC, Old Town Manassas, VA) and purified as indicated above, was used as a reference. *In vitro* stimulations were performed in triplicate for 24 hr and supernatants were stored at –20°C for ELISA analysis. In the cell-free supernatants, transferred into microplates (96-well Maxisorp Nunc), TNF-α and IL-6 levels were determined by ELISA kits (Ready Set Go, e-Bioscience, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). In each well, the OD at 450 nm was measured with a microplate reader (Multiskan EX, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

Lipid A structures pro-inflammatory potency

To calculate specific contributions of each lipid A molecular species, mathematic model was constructed. LPSs from twelve strains and eighteen molecular species (MALDI peaks), provide twelve equations and eighteen unknowns. But we can limit the number of unknowns by making three reasonable approximations:

i) The species 1599.1 and 1783.4 have a contribution coefficient of 0 (little influence) because present in only one strain. ii) The species 1813.4 and 1841.4 have the same coefficient (only 2 strains differ by them) and iii) The species 1928.5 and 1956.5 have also the same coefficient, for the same reason. This leaves a system of twelve equations with only twelve unknowns, where each equation indicates the number of times (0,1,2, or 3) that a molecular species contributes to the inflammatory activity of a given LPS. These presences can be represented by a square matrix. To calculate each structure contribution, it is then sufficient to solve the matrix equation: (Matrix of presence) x (Vector of contributions) = IL-6 concentration (pg/mL). Many computer applications designed to solve linear systems can handle this matrix equation. The result is that this linear system admits only one solution.

Screening of *lpxO* by real-time PCR

Isolates were screened for the presence of *lpxO* with a real-time PCR with primers (*lpxO*-F 5'-GGCTCGGTTTCGTTACCATCT-3'; *lpxO*-R 5'-AATAAAACGGATCAAACGCG-3'). Bacterial DNA was isolated with easyMag (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Realtime *lpxO* PCR was performed using the following PCR mix conditions: 12.5 μ L of Master mix GoTaq qPcr Promega (Promega, Madison, WI), 9 μ L sterile water and 0.2 μ M of each primer in a total volume of 25 μ L (including 2.5 μ L of template). PCR protocol was performed under the following conditions: pre-PCR of 10 min at 95°C to fully denature the template DNA and activate the polymerase followed by 40 cycles of 15 s at 94°C for denaturation and 30 s at 60°C for annealing. Amplification and detection were carried out in an Applied Biosystems Prism 7500 System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis

Kaplan-Meier survival curves were drawn and Log rank test was performed using the R Statistical Software. p value < 0.05 was considered as significant.

Construction du mutant LpxO

Souches et conditions de croissance

Le marqueur microbiologique était principalement associé à *E. bugandensis* et la souche ECH4 a été sélectionnée comme candidat pour la délétion et la complémentation du gène *lpxO*. La souche ECH4 a été récupérée de l'épidémie de l'hôpital Antoine Béclère (Publication 2).

Toutes les souches et tous les plasmides sont répertoriés dans le **Tableau 12**. Les souches ont été cultivées sur gélose (LB, lysogeny broth) à 37°C et 150 rpm à partir de stocks congelés à -20°C dans du glycérol. Les concentrations d'antibiotiques utilisées à chaque étape étaient les suivantes : Kanamycine (Km), 25 µg /mL, chloramphénicol (Cm), 10µg /mL, triméthoprim (Tp), 100µg /mL et tétracycline (Tet) 12, 5µg/mL.

Construction du mutant *E. bugandensis* (souche ECH4)

Les amorces pour la construction du mutant (Tableau 12) ont été conçues en utilisant la séquence du génome entier de *E. bugandensis* ECH4 (numéro d'accèsion GenBank GCA_021650195.1). Les paires d'amorces *lpxO*-3-UP-Fw, *lpxO*-3-UP-Rv, *lpxO* -3-Dw-Fw et *lpxO*-3-Dw-Rv ont été utilisées dans deux PCR distinctes pour amplifier les fragments flanquant le gène *lpxO* en utilisant le kit GoTaq Green Master Mix (Promega) (**Figure 34** (a)). Chaque amplicon contient des sites de restriction internes MluI ajoutés intentionnellement pour effectuer l'étape suivante de fusion des régions flanquantes. Les fragments UP et Dw (down) de *lpxO* ont été récupérés à partir du gel d'électrophorèse et ensuite purifiés pour la polymérisation (fusion de UP et Dw) en utilisant la ligase T4. Ensuite, le produit a été amplifié par PCR pour générer un seul

amplicon en utilisant les amorces *lpxO-3-UP-Fw* et *lpxO-3-Dw-Rv*. Ensuite, l'amplicon a été digéré avec les enzymes *SmaI* et *XbaI*. D'autre part, le plasmide commercial pGPI-Scel-2 a été extraie, purifié et digéré avec *SmaI* et *XbaI*, les deux produits ont été assemblés (**Figure 34** (b)) pour obtenir le plasmide pGPI-Scel-2 Δ lpxO. Ce plasmide a ensuite été transformé dans des cellules compétentes *E. coli* GT115.

Tableau 12 Souches et plasmides utilisés dans cette étude.

Souche/plasmide	Génotype	Source/référence
<i>E. bugandensis</i> ECH4	Wild type	Chez nous
GT115	F – mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80 lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 rpsL (strA) endA1 Δ dcm uidA (Δ mlul):: pir-116 Δ sbcC-sbcD	InvivoGen
Amorces		
lpxO-UP-3Fw: 5'-AAAAAA CCCGGG ATGAAACCGGCGATTCTGGTG-3'		
lpxO-UP-3Rv: 5'-AAAAAA ACGCGT CATTGTTCCGGCGATAACGTAA-3'		
lpxO-Dw-3Fw: 5'-AAAAAA ACGCGT AGGGAAGAAAACGCCGTCATAAA-3'		
lpxO-DW-3Rv: 5'- AAAGGCGC TCTAGA TTGCGATTTTTTCATTACAGTTCTATG-3'		
pGPI-Fw: 5'-TAACGGTTGTGGACAACAAGCCAGGG-3'		
pGPI-RV : 5'-GCCCTACACAAATTGGGAGATATATC-3'		
Plasmides		
pGPI-Scel-2	Vecteur suicide, origine de répllication R6Kgamma, Mob - , porte un site endonucléasique I-Scel, Tp r	AddGene
pDAI-Scel-SacB	Exprime le gène de l'endonucléase I- Scel, sacB, Tet r	Addgene
pRK2013	Ori colE1, dérivé de RK2, KanR, mob+, tra+	Figurski and Helinski (1979)

Le plasmide pGPI-Scel-2ΔlpxO a été mobilisé dans *E. bugandensis* ECH4 à l'aide du plasmide pRK2013 par conjugaison triparentale. Les clones co-intégrateurs ont été sélectionnés en utilisant de la gélose LB supplémentée avec Tp à 37°C. Un deuxième croisement triparental a été effectué pour conjuguer le plasmide pDAI-Scel-SacB pendant toute la nuit. Les exconjugants ont été sélectionnés sur de la gélose LB contenant du Tet à 37°C. Les colonies des clones candidats ont été examinées pour leur sensibilité à la Tp sur une gélose supplémentée en Tp. De plus, les colonies ont été évaluées par PCR à chaque étape. *sacB* permet de faire sortir le premier plasmide en passant de résistant à Tp à résistant à Tet. Les colonies confirmées avec la délétion *lpxO* ont été criblées pour la résistance au Tet et le second plasmide a été expulsé en utilisant la gélose LB avec 6% de saccharose sans NaCl pendant 24h à 30°C. Les colonies résultantes ont été nommées *E. bugandensis* mutant lpxO (**Figure 35**).

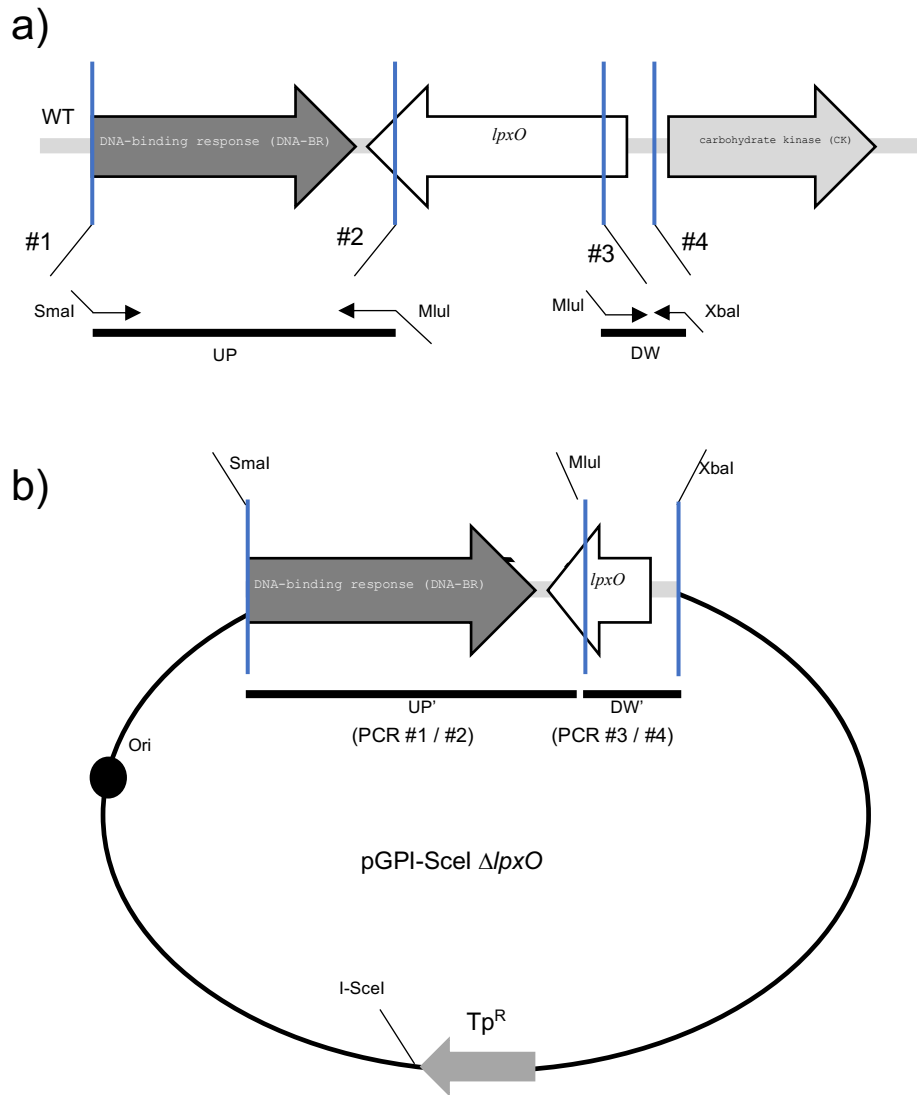


Figure 34 Schéma montrant a) la stratégie d'amplification des régions UP et Down flanquant *lpxO* et b) le clonage du fragment contenant la délétion dans le vecteur pGPI-Scel.

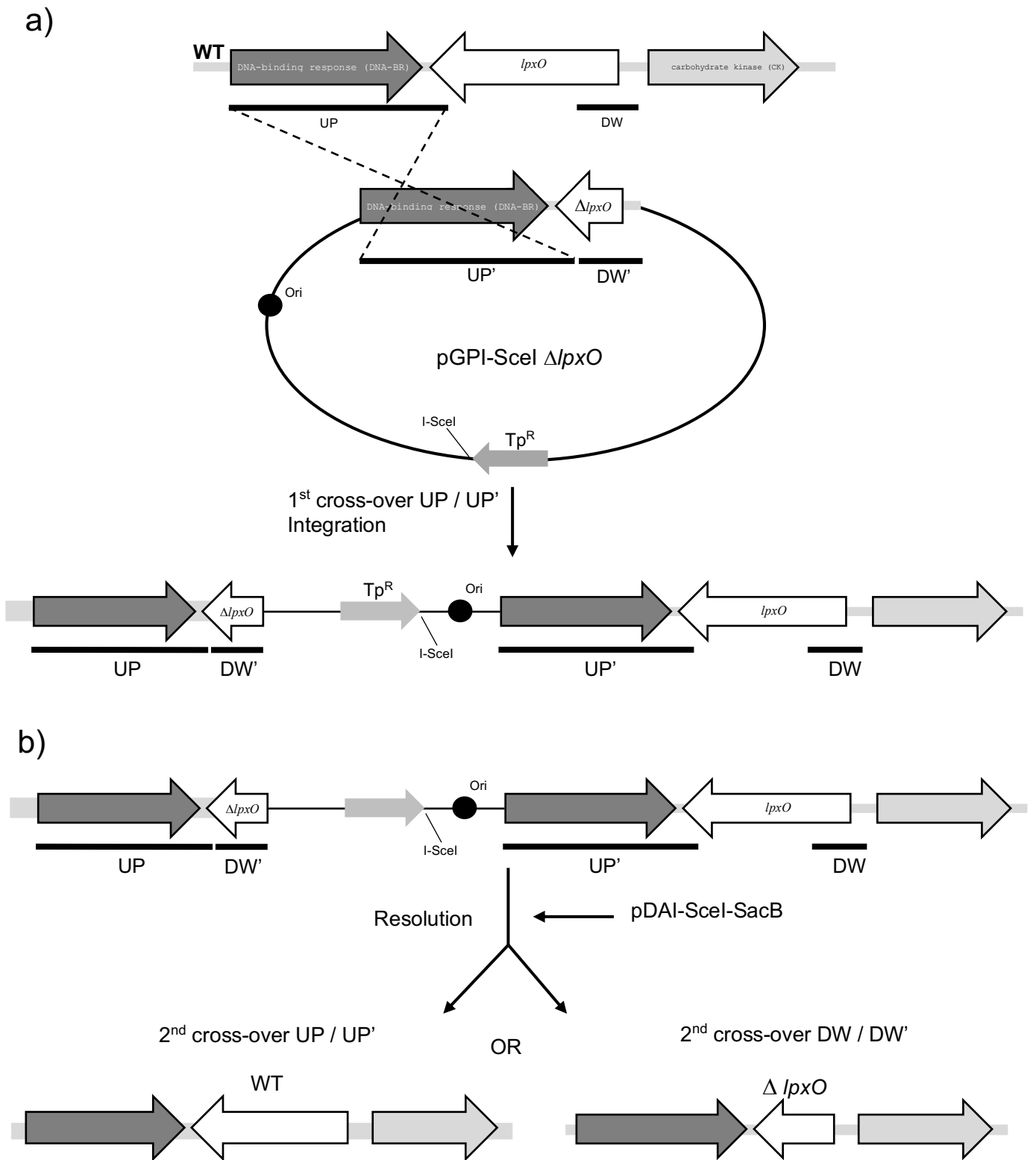


Figure 35 Schéma montrant a) l'hybridation homologue permettant la délétion de *lpxO* sur le chromosome et b) le cross-over UP ou Down médié par *sacB*.

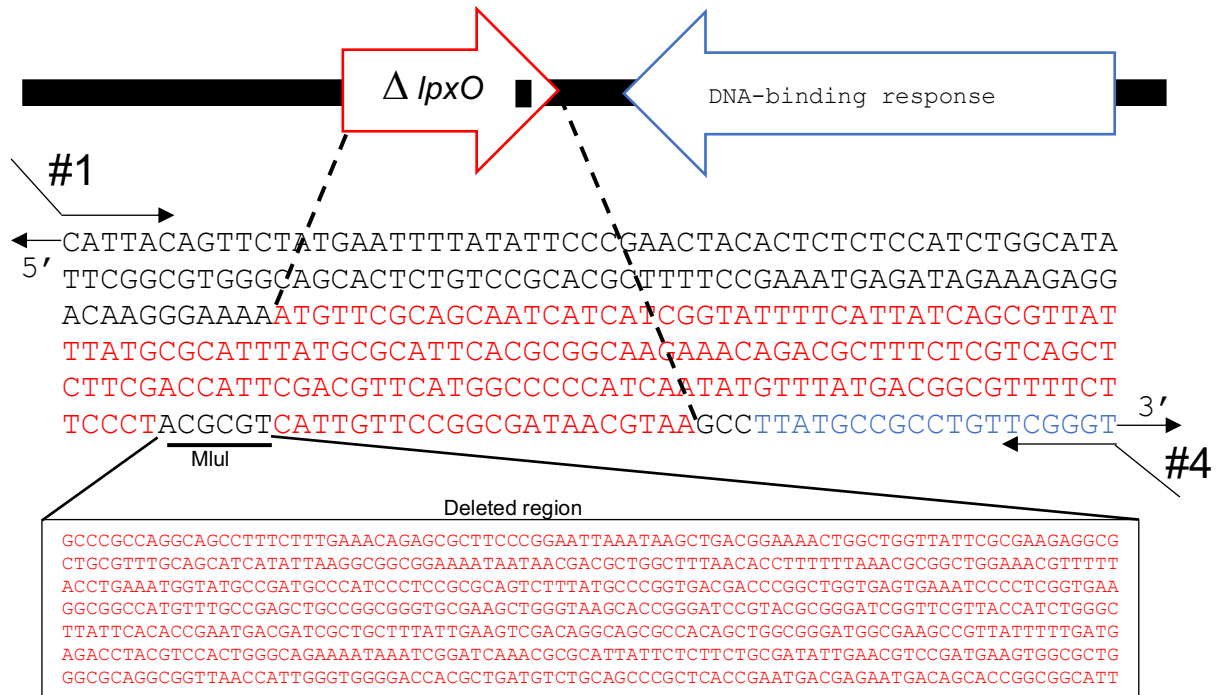


Figure 36 Confirmation du mutant *lpxO* par séquençage Sanger.

Perspectives

Les études génomiques ont confirmé que nous avons obtenu le mutant exempt de toute autre mutation indésirable qui pourrait affecter l'analyse. Ce mutant sera utilisé pour étudier l'impact de *lpxO* sur *E. bugandensis* dans des modèles animaux. Dans un premier temps, les souches ECH4 Δ *lpxO*, la souche ECH4 de type sauvage et la complémentation ECH4 Δ *lpxO* seront utilisées pour réaliser des expériences de virulence dans le modèle *G. mellonella*. L'étude d'une souche délétée permettra d'observer l'impact de ce gène sur la virulence et son rôle éventuel dans le sepsis néonatal. Par la suite, la souche Δ *lpxO* sera également utilisée dans des expériences sur des modèles cellulaires pour évaluer son impact sur la réponse immunitaire.

DISCUSSION

Discussion générale

Les infections nosocomiales constituent un problème majeur en réanimation néonatale, affectant plus de 20% des nouveau-nés de faible poids à la naissance (< 1 500 g). Le choc septique est la forme la plus grave d'infections chez le nouveau-né et constitue la principale cause de décès dans ce groupe d'âge. Les facteurs liés à l'hôte et plus précisément l'immaturation des mécanismes de réponse aux infections contribuent à la gravité des symptômes dans cette population (Weiss *et al.*, 2020 ; Ershad *et al.*, 2019).

Les entérobactéries appartenant au genre *Enterobacter* ont été maintes fois signalées comme un des agents majeurs de ces infections associées aux soins et des épidémies ont été rapportées (Davin-Regli *et al.*, 2019). Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'identifier les marqueurs microbiologiques de sévérité chez *Enterobacter* afin d'aider à prévenir les bactériémies, en particulier chez les prématurés, par la caractérisation phénotypique et génotypique après WGS d'isolats cliniques.

Le premier marqueur que nous avons identifié est l'**espèce**. En effet, lors de l'étude approfondie de l'épidémie de bactériémies à *Enterobacter* à l'Hôpital Antoine Béclère, l'identification précise par la technique de PCR/séquençage *dnaJ* (article 1) des différents isolats et clones a montré que *E. xiangfangensis* et *E. bugandensis* étaient les deux espèces les plus fréquentes. Cependant, ces 2 espèces présentent un profil de résistance aux antibiotiques et de virulence différente. Je me suis plus particulièrement intéressé à *E. bugandensis*.

E. bugandensis est une bactérie récemment décrite et associée à des foyers nosocomiaux (Doijad *et al.*, 2016). Elle a été caractérisée en 2018 par l'équipe de Pati *et al.*, qui a montré dans des essais d'infections chez la souris qu'elle était aussi effective que *Salmonella* Typhimurium pour induire une infection systémique et la libération de

cytokines pro-inflammatoires. Ils ont démontré que *E. bugandensis* avait un potentiel septicémique et émis l'hypothèse qu'elle était l'espèce la plus virulente du genre (Pati *et al.*, 2018). Lors de l'épidémie à l'Hôpital Antoine Béchère, parmi les 20 nouveau-nés atteints d'une bactériémie, 14 sont décédés dont 13 (93%) présentaient une bactériémie à *E. bugandensis*. Cela suggère que ce pathogène est une espèce associée à la gravité et à la mortalité dans le sepsis néonatal. L'association d'*E. bugandensis* avec des taux de mortalité élevés a aussi été mise en évidence dans d'autres études (Girlich *et al.*, 2021 ; Pati *et al.*, 2018).

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques des souches a montré un phénotype particulier de résistance aux antibiotiques. Contrairement à l'étude de Mshana *et al.*, ces souches ne présentaient pas de mécanisme de résistance acquise et la faible résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) observée était associée à une hyperproduction d'AmpC (Mshana *et al.*, 2011).

Dans le genre *Enterobacter*, le phénotype de résistance aux antibiotiques est associé à l'espèce. Contrairement à l'épidémie en Tanzanie, où les souches de *E. bugandensis*, portaient une BLSE de type CTX-M-15 associée à une séquence d'insertion ISEcp1/tnpA, aucune BLSE n'a été identifiée chez cette espèce dans notre étude (Mshana *et al.*, 2011). Par contre, *E. xiangfangensis* présente un taux de résistance plus élevé aux C3G que *E. bugandensis* ce qui suggère une plus grande plasticité génétique chez cette espèce (Wu *et al.*, 2021 ; Makhlouf *et al.*, 2021). On peut noter que nous avons observé un taux de mortalité plus élevé (70%) que dans le foyer de Tanzanie (35%).

Ces marqueurs de résistance chez *Enterobacter* suggèrent que la propagation des mécanismes de résistance à médiation plasmidique est plus fréquente chez *E. xiangfangensis* comme cela avait été précédemment documenté (Wu *et al.*, 2021) et qu'un meilleur contrôle épidémiologique devrait donc être envisagé, afin de freiner la

propagation de BLSE. Chez *E. bugandensis* la sensibilité au céfépime reste stable alors que chez *E. xiangfangensis* elle pourrait être compromise par la présence de BLSE. Enfin, les deux espèces restent sensibles aux carbapénèmes en France contrairement à d'autres pays ou régions d'Europe (Stoesser *et al.*, 2015 ; Matsumura *et al.*, 2017 ; Wendel *et al.*, 2022), ce qui en fait un bon choix pour le traitement probabiliste. Ce travail montre que la gravité du sepsis néonatal à *E. bugandensis* chez les nouveau-nés n'est pas associée au profil de résistance.

L'absence d'un profil de multirésistance et le taux de mortalité élevé, nous a conduit à rechercher d'autres marqueurs microbiologiques susceptibles d'expliquer la dynamique épidémiologique et la gravité du sepsis néonatal au cours de l'épidémie.

L'un des facteurs possibles de l'augmentation du risque de mortalité au cours du processus septique par *E. bugandensis* pourrait être la présence du gène *lpxO* (article 3). Ce gène qui a été identifié dans toutes les souches des nourrissons décédés dans notre étude, a été associé comme facteur de virulence dans d'autres bactéries Gram-négatif telles que *Salmonella*, *Klebsiella* et *Acinetobacter* (Gibbons *et al.*, 2008 ; Llobet *et al.*, 2015 ; Bartholomew *et al.*, 2019). La modification dépendante de LpxO réduit l'activation des réponses inflammatoires et sert de médiateur à la résistance aux peptides antimicrobiens. Les souches dépourvues de LpxO sont atténuées *in vivo*, ce qui souligne l'importance de cette modification dans la biologie de l'infection par des pathogènes tels que *Klebsiella* (Llobet *et al.*, 2015). Nos résultats sont en accord avec l'étude de Pati *et al.*, où il a été mis en évidence que *E. bugandensis* a un potentiel de virulence élevé chez *Galleria mellonella*, la capacité d'induire une réponse immunitaire ainsi que de posséder divers mécanismes de réponse au stress par l'hôte (Pati *et al.*, 2018). Cependant, certaines études ont rapporté un taux de mortalité élevé associé à *E. bugandensis* en l'absence du gène *lpxO* (Mshana *et al.*, 2011). Ce fait suggère que la mortalité des nouveau-nés associée à *E. bugandensis* est multifactorielle, mais que LpxO pourrait être un facteur clé de la mortalité chez les nouveau-nés.

La modification structurelle du lipide A par LpxO pourrait également être associée aux niveaux élevés de MIC₅₀ à la colistine chez *E. bugandensis* (128 mg/L) par rapport à *E. xiangfangensis* (16 mg/L) où LpxO est absent. Des études ont mis en évidence que LpxO est un des médiateurs de la résistance à la colistine chez *Klebsiella* et *Acinetobacter* dans les souches où le gène est présent (Llobet *et al.*, 2015 ; Bartholomew *et al.*, 2019).

Le potentiel élevé de colonisation et de persistance des foyers associés à *Enterobacter* a été récemment signalés (Ferry *et al.*, 2020). L'étude de Ferry *et al* rapporte l'existence de deux épidémies à *Enterobacter* d'une période deux ans chacune en RNN. L'analyse des 6 génomes rapportés par ces auteurs montre une prévalence de *E. xiangfangensis* (2/6), *E. hoffmannii* (2/6), (1/6) *E. bugandensis* et (1/6) *E. cloacae*. De plus, le taux d'infection était indépendant du taux de colonisation du patient comme dans notre étude. La persistance de l'épidémie et la forte colonisation des nouveau-nés dans notre étude et celle de Ferry *et al.* suggèrent que les souches d'*Enterobacter* et en particulier appartenant aux espèces *E. bugandensis* et *E. xiangfangensis* ont un fort potentiel de colonisation. Ce fait suggère que ces deux pathogènes devraient être identifiés précisément lors des protocoles de surveillance épidémiologique et qu'une attention particulière devrait être portée, notamment lors des périodes de forte colonisation par *E. bugandensis* en RNN. En outre, de nouvelles stratégies d'identification rapide d'*E. bugandensis* portant le marqueur de virulence LpxO devraient être explorées.

La persistance et le potentiel de colonisation d'*E. bugandensis* sont associés à la résistance aux antiseptiques et aux désinfectants utilisés en RNN. Dans notre étude comme dans d'autres le bio-nettoyage intensif n'a eu qu'un effet modéré sur l'incidence de la colonisation mettant en évidence la persistance de ces agents pathogènes même après le bio-nettoyage (Ferry *et al.*, 2020 ; Wendel *et al.*, 2022). Dans notre étude, l'identification de clones (ST50, ST1402) à la fois dans les incubateurs et dans les hémocultures suggère que le bio-nettoyage ne suffit pas à éradiquer ces

micro-organismes des surfaces. D'autres études ont aussi identifié les incubateurs comme réservoir bactérien lors d'épidémie en RNN (Chavignon *et al.*, 2021 ; Girlich *et al.*, 2021). La mise en œuvre de nouvelles stratégies de désinfection des incubateurs comme la vapeur chaude, pour la prévention du sepsis néonatal est à envisager. (article 2)

Les résultats de notre étude monocentrique nous ont incité à mener une étude multicentrique afin d'avoir un échantillon plus représentatif de nos observations. Notre collection historique de souches d'*Enterobacter* spp. provenant de 15 RNN (cohorte SENSE) a montré le même schéma de prévalence des espèces, c'est-à-dire que *E. bugandensis* est la deuxième espèce la plus fréquente après *E. xiangfangensis*. Nos résultats permettent de conclure qu'une identification précise au niveau de l'espèce est importante pour connaître le potentiel de pathogénicité de chacune d'entre elles.

Récemment, le WGS offre la possibilité d'explorer le génome pour la prédiction de marqueurs microbiologiques associés à l'épidémiologie, au résistome et au virulome. Dans ce contexte, au cours de ce travail, nous avons utilisé le WGS de la cohorte SENSE pour effectuer une analyse du virulome d'*E. bugandensis*.

L'étude de Pati *et al.* a conclu que *E. bugandensis* possède des facteurs de virulence associés à la réponse au stress *in vivo* (Pati *et al.*, 2018). Nous avons identifié aussi une grande variété de loci génétiques associés aux gènes de virulence. Les loci associés à l'adhérence, à la formation de biofilms, aux pompes d'efflux ainsi qu'à la résistance aux antiseptiques, identifiés chez *E. bugandensis* pourraient expliquer sa persistance à long terme dans la RNN. Le potentiel de colonisation d'*E. bugandensis* par le biais d'adhésines telles que MisL, une adhésine présente chez *Salmonella* et essentielle à la colonisation de la paroi intestinale, et d'autres mécanismes tels que les pilis et les fimbriae, également associés à la colonisation chez des pathogènes comme *E. coli*, tous

identifiés chez *E. bugandensis* favorisent son potentiel d'infection, de persistance et de colonisation chez les nouveau-nés (article en préparation).

De plus, la présence de cinq loci codant des chélateurs du fer et du groupe hème tels que Ent, *iroA*, *aerobactine*, *pioverdine*, *ChuA*, *ChuS* et *ChuU* favorise son accès à ce nutriment permettant son développement dans l'hôte, la régulation de ces loci en hausse pendent l'adaptation au sérum humain, démontrant son pouvoir pathogène (Pati *et al.*, 2018). Nos résultats suggèrent que *E. bugandensis* est une bactérie porteuse de plusieurs mécanismes potentiels de virulence, ce qui explique que même en l'absence d'un profil de résistance aux antibiotiques, elle peut coloniser, persister et envahir la paroi intestinale des nouveau-nés en provoquant une bactériémie. Par conséquent, le portage d'*E. bugandensis* chez les nouveau-nés constitue une alerte de la possibilité d'une épidémie avec des taux de mortalité élevés chez les nouveau-nés.

La caractérisation du T6SS chez *E. bugandensis* montre une structure similaire à celle de *P. aeruginosa* (Chen *et al.*, 2015) contrairement aux autres espèces d'*Enterobacter* où le T6SS est caractéristique des entérobactéries (Mustafa *et al.*, 2020 ; Soria-Bustos *et al.*, 2020). Le système T6SS a été associé à la virulence d'autres agents pathogènes car il permet la libération d'effecteurs cellulaires dans les cellules procaryotes et eucaryotes. En outre, ces systèmes de sécrétion sont importants pour la compétition bactérienne (Soria-Bustos *et al.*, 2020). Le T6SS d'*E. bugandensis* pourrait être plus efficace que celui des autres espèces et cela pourrait expliquer, ainsi que d'autres facteurs biologiques de l'hôte, la prévalence de cette espèce chez les nouveau-nés.

Nous avons pu identifier dans ce travail des marqueurs liés aux différentes espèces d'*Enterobacter*. Ces travaux ont mis en évidence l'importance de la taxonomie et de l'identification précise, car chaque espèce a un potentiel de colonisation et de virulence différent qui détermine le pronostic de la bactériémie néonatale. Contrairement à d'autres travaux, où l'exploration épidémiologique se limite à l'identification d'*E.*

cloacae ou d'CEC, notre travail suggère que *E. bugandensis* devrait être considéré comme un agent pathogène important dans la RNN et que l'attention devrait être portée aux infections dont il est responsable. D'autre part, le rôle de LpxO dans la virulence, la résistance et la pathogénicité d'*E. bugandensis* devrait être confirmé par des expériences de fonctionnalité comme cela a été fait chez d'autres pathogènes pour mieux comprendre son rôle dans la virulence et connaître sa pertinence et son impact sur la gravité de l'infection bactérienne néonatale.

Ces résultats, ainsi que d'autres études, suggèrent que *E. cloacae* n'est pas l'espèce la plus souvent isolée en milieu hospitalier et que son importance dans les maladies infectieuses devrait être réévaluée, car historiquement, de nombreuses infections à *Enterobacter* ont été rapportées comme *E. cloacae*. De même, la taxonomie dans les bases de données telles que GenBank devrait être réévaluée et corrigée à l'aide de méthodes telles que l'ANI ou la dDDH afin de mieux comprendre la dynamique épidémiologique dans le monde, particulièrement l'impact d'*E. bugandensis* en RNN. Bien que la première description de cet agent pathogène ait eu lieu en Tanzanie en 2011 mais caractérisé en 2016, puis en Allemagne en 2018 et en 2021 en France, il est probable que cet agent pathogène était présent depuis plus longtemps et qu'il soit responsable de foyers nosocomiaux dans les RNNs. Cependant, en raison de sa mauvaise identification, il n'a pas été signalé comme *E. bugandensis* mais comme *Enterobacter sp.* ou encore *E. cloacae* (Wu et al., 2020)

Enfin, les caractéristiques identifiées tels que (a) la prévalence et le potentiel de virulence élevés d'*E. bugandensis*, (b) la prévalence élevée d'*E. xiangfangensis* et son faible potentiel de virulence, (c) le potentiel de colonisation et de persistance sur les surfaces comme les incubateurs des deux pathogènes, (d) le profil de sensibilité aux antibiotiques d'*E. bugandensis* et le profil de résistance d'*E. xiangfangensis*, mettent en évidence la dynamique épidémiologique d'*Enterobacter* dans la RNN et alertent sur la

gravité des bactériémies néonatales causées par ces pathogènes, en particulier *E. bugandensis*, que nous avons associé à un pronostic fatal chez les nouveau-nés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusions

Premièrement, notre travail souligne l'importance de l'identification au niveau de l'espèce du genre *Enterobacter*, en particulier *E. bugandensis*. Après avoir démontré son potentiel hautement pathogène, il est important d'employer de nouvelles approches telles que celle proposée ici (article 1). En raison du taux de mortalité élevé associé à *E. bugandensis*, principalement dû à la présence du marqueur LpxO, une surveillance épidémiologique de la colonisation par *E. bugandensis* chez les nouveau-nés devrait être mise en place pour éviter les infections de mauvais pronostic.

Deuxièmement, notre travail a mis en évidence que les épidémies d'*Enterobacter* acquises à l'hôpital sont de nature multi-espèces et multi-clonales. Ces résultats confirment l'hypothèse d'une propagation hospitalière par contamination croisée lors d'une épidémie et le fait que tant que la source primaire de l'épidémie n'est pas identifiée, l'évolution de l'épidémie se maintient dans le temps. Le potentiel de colonisation et de persistance d'*Enterobacter* et particulièrement d'*E. bugandensis*, souligne l'importance de la recherche de ces pathogènes dans les protocoles de surveillance épidémiologique. D'autre part, le potentiel élevé de résistance aux antiseptiques et désinfectants utilisés dans la RNN suggère que de nouvelles méthodologies pour éradiquer ces pathogènes du matériel médical tels que les incubateurs, qui fonctionnent comme un réservoir, devraient être explorées. Le potentiel de résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques, ainsi que la capacité de formation de biofilms, compromettent l'environnement hospitalier qui joue un rôle important dans la transmission des infections.

Troisièmement, l'analyse génomique de notre collection historique de sepsis néonatal à *Enterobacter* a montré que ce genre est composé d'une diversité d'espèces ayant un potentiel pathogène différent selon l'espèce. Nos résultats suggèrent l'hypothèse d'un tropisme d'*E. bugandensis* pour les nouveau-nés. Cependant, d'autres études visant à

expliquer cette hypothèse seront nécessaires pour mieux comprendre son épidémiologie et sa pertinence chez les nouveau-nés. *E. bugandensis* possède un arsenal de facteurs de virulence qui favorise son succès dans les infections humaines et compromet la vie des nouveau-nés. Enfin, la présence du marqueur de sévérité *LpxO* chez *E. bugandensis* pourrait être associée à la sévérité et à la mortalité. Ce résultat renforce l'importance d'une identification précise au niveau de l'espèce, en particulier d'*E. bugandensis* lors d'une épidémie nosocomiale au sein de la RNN.

Perspectives

Nos résultats suggèrent qu'il est nécessaire de développer ou d'améliorer une nouvelle base de données de spectrométrie de masse utilisant le MALDI-TOF pour permettre une identification plus rapide et plus précise des espèces d'*Enterobacter* dans la pratique clinique, en particulier des *E. bugandensis* *lpxO*-positif. Une identification rapide, précise et opportune pourrait sauver la vie de nombreux nouveau-nés atteints d'une infection à *E. bugandensis*. Dans ce contexte, notre équipe a commencé à travailler avec l'équipe de Godmer *et al.*, pour améliorer l'identification des espèces au sein du genre *Enterobacter* par MALDI-TOF MS, ce qui est crucial pour un diagnostic précis et rapide. (Godmer *et al.*, 2021)

Par ailleurs, *Enterobacter* possède de nombreux mécanismes de résistance naturels aux antibiotiques et antiseptiques par rapport à d'autres bactéries, cependant, nous n'avons réalisé ici que l'identification phénotypique et dans certains cas, génotypique, de certains de ces mécanismes. Des études centrées sur la caractérisation de ces mécanismes sont nécessaires pour mieux comprendre comment *Enterobacter* échappe à l'antibiothérapie, mais aussi comment il évite l'action des antiseptiques et des désinfectants. Une compréhension précise de ces mécanismes sera nécessaire dans un avenir proche pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou améliorer les antimicrobiens actuels. En outre, la compréhension des mécanismes de persistance sur

les surfaces inertes, tels que le développement de biofilms, sera également cruciale dans un avenir proche pour la prévention, le contrôle et l'éradication des épidémies hospitalières d'*Enterobacter*. Ces mécanismes peu compris ouvrent la porte à de nouveaux projets au sein de l'équipe pour mieux comprendre la persistance d'*Enterobacter* dans l'environnement hospitalier et prévenir les infections chez les nouveau-nés.

Le séquençage du génome complet de la collection de 88 souches du projet SENSE a permis l'exploitation de certains résultats, principalement ceux associés à la virulence. Cependant, l'étude des plasmides portant des gènes de résistance comme le CTX-M-15 doit être complétée pour comprendre le transfert horizontal de la résistance aux antibiotiques. L'analyse des génomes est en cours pour une meilleure compréhension de la génomique de ces souches associées aux infections néonatales.

L'étude de la virulence associée au gène *lpxO* étudiée dans des modèles animaux comme *G. mellonella* en présence et en absence du gène doit être complétée. Un des objectifs de mon travail était la construction de mutants de LpxO. En raison des contraintes de temps dues à la pandémie de la COVID-19, seul le mutant LpxO a été construit. La complémentation avec le gène *lpxO* de la souche délétée reste une perspective à court terme. Cependant, Simon Barreault, actuel étudiant en doctorat dans notre équipe, sera responsable de finaliser ces constructions génétiques et de réaliser des tests de virulence pour confirmer le rôle de LpxO.

Enfin, bon nombre de nos résultats sur le virulome d'*Enterobacter* sont des approches bioinformatiques. Cette dernière est sans aucun doute une approche rapide et fiable utilisant la génomique comparative pour rechercher des facteurs de virulence qui ont été caractérisés chez d'autres micro-organismes, mais des études fonctionnelles seront nécessaires pour confirmer leur rôle dans la virulence, ainsi que pour rechercher de nouvelles thérapies anti-infectieuses. Les résultats de ce travail répondent à de

nombreuses questions, mais ils ouvrent également de nouvelles questions auxquelles notre équipe ou la communauté scientifique devront sans doute répondre dans les années à venir pour mieux comprendre l'épidémiologie, la résistance et la virulence de l'un des pathogènes cliniques les plus importants : *Enterobacter*.

RÉFÉRENCES

- Abbott, S. L., & Janda, J. M. (1997). *Enterobacter cancerogenus* ("*Enterobacter taylorae*") infections associated with severe trauma or crush injuries. *American journal of clinical pathology*, 107(3), 359–361. <https://doi.org/10.1093/ajcp/107.3.35>
- Abd El-Aziz, N. K., Gharib, A. A., Mohamed, E., & Hussein, A. H. (2021). Real-time PCR versus MALDI-TOF MS and culture-based techniques for diagnosis of bloodstream and pyogenic infections in humans and animals. *Journal of applied microbiology*, 130(5), 1630–1644. <https://doi.org/10.1111/jam.14862>
- Abeyrathne, P. D., Daniels, C., Poon, K. K., Matewish, M. J., & Lam, J. S. (2005). Functional characterization of WaaL, a ligase associated with linking O-antigen polysaccharide to the core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Journal of bacteriology*, 187(9), 3002–3012. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3002-3012.2005>
- Ahn, V. E., Lo, E. I., Engel, C. K., Chen, L., Hwang, P. M., Kay, L. E., Bishop, R. E., & Privé, G. G. (2004). A hydrocarbon ruler measures palmitate in the enzymatic acylation of endotoxin. *The EMBO journal*, 23(15), 2931–2941. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600320>
- Aibinu, I., Pfeifer, Y., Peters, F., Ogunsola, F., Adenipekun, E., Odugbemi, T., & Koenig, W. (2012). Emergence of *bla*(CTX-M-15), *qnrB1* and *aac*(6')-Ib-cr resistance genes in *Pantoea agglomerans* and *Enterobacter cloacae* from Nigeria (sub-Saharan Africa). *Journal of medical microbiology*, 61(Pt 1), 165–167. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.035238-0>
- Akita, H., Matsushika, A., & Kimura, Z. I. (2019). *Enterobacter oligotrophica* sp. nov., a novel oligotroph isolated from leaf soil. *MicrobiologyOpen*, 8(9), e00843. <https://doi.org/10.1002/mbo3.843>
- Al-Agamy, M. H., El-Mahdy, T. S., Radwan, H. H., & Poirel, L. (2019). Cooccurrence of NDM-1, ESBL, RmtC, AAC(6')-Ib, and QnrB in Clonally Related *Klebsiella pneumoniae* Isolates Together with Coexistence of CMY-4 and AAC(6')-Ib in *Enterobacter cloacae* Isolates from Saudi Arabia. *BioMed research international*, 2019, 6736897. <https://doi.org/10.1155/2019/6736897>
- Albornoz, E., Tijet, N., De Belder, D., Gomez, S., Martino, F., Corso, A., Melano, R. G., & Petroni, A. (2017). *qnrE1*, a Member of a New Family of Plasmid-Located Quinolone Resistance

- Genes, Originated from the Chromosome of *Enterobacter* Species. Antimicrobial agents and chemotherapy, 61(5), e02555-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02555-16>
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H. K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., Faltyn, M., ... McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, 48(D1), D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Almeida, L. A., & Araujo, R. (2013). Highlights on molecular identification of closely related species. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 13, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.011>
- Álvarez-Marín, R., Lepe, J. A., Gasch-Blasi, O., Rodríguez-Martínez, J. M., Calvo-Montes, J., Lara-Contreras, R., Martín-Gandul, C., Tubau-Quintano, F., Cano-García, M. E., Rodríguez-López, F., Rodríguez-Baño, J., Pujol-Rojo, M., Torre-Cisneros, J., Martínez-Martínez, L., Pascual-Hernández, Á., Jiménez-Mejías, M. E., & Spanish Network for Research in Infectious Diseases/*Enterobacter* spp. Bacteremia Project Group (2021). Clinical characteristics and outcome of bacteraemia caused by *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella aerogenes*: more similarities than differences. *Journal of global antimicrobial resistance*, 25, 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.04.008>
- Amin, H., Zafar, A., Ejaz, H., & Jameel, N. U. (2013). Phenotypic characterization of ESBL producing *Enterobacter cloacae* among children. *Pakistan journal of medical sciences*, 29(1), 144–147. <https://doi.org/10.12669/pjms.291.2385>
- Amin, M., Mehdipour, G., & Navidifar, T. (2019). High distribution of 16S rRNA methylase genes *rmtB* and *armA* among *Enterobacter cloacae* strains isolated from an Ahvaz teaching hospital, Iran. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 66(3), 337–348. <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.009>
- Andrade, L. N., Siqueira, T., Martinez, R., & Darini, A. (2018). Multidrug-Resistant CTX-M-(15, 9, 2)- and KPC-2-Producing *Enterobacter hormaechei* and *Enterobacter asburiae* Isolates

- Possessed a Set of Acquired Heavy Metal Tolerance Genes Including a Chromosomal sil Operon (for Acquired Silver Resistance). *Frontiers in microbiology*, 9, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00539>
- Arpin, C., Coze, C., Rogues, A. M., Gachie, J. P., Bebear, C., & Quentin, C. (1996). Epidemiological study of an outbreak due to multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a medical intensive care unit. *Journal of clinical microbiology*, 34(9), 2163–2169. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.9.2163-2169.1996>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsmas, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Babinski, K. J., Kanjilal, S. J., & Raetz, C. R. (2002). Accumulation of the lipid A precursor UDP-2,3-diacetylglucosamine in an *Escherichia coli* mutant lacking the lpxH gene. *The Journal of biological chemistry*, 277(29), 25947–25956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204068200>
- Babinski, K. J., Ribeiro, A. A., & Raetz, C. R. (2002). The *Escherichia coli* gene encoding the UDP-2,3-diacetylglucosamine pyrophosphatase of lipid A biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 277(29), 25937–25946. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204067200>
- Barnes, A. I., Paraje, M. G., del C Battán, P., & Albesa, I. (2001). Molecular properties and metabolic effect on blood cells produced by a new toxin of *Enterobacter cloacae*. *Cell biology and toxicology*, 17(6), 409–418. <https://doi.org/10.1023/a:1013704801570>
- Barnes, B. J., Wiederhold, N. P., Micek, S. T., Polish, L. B., & Ritchie, D. J. (2003). *Enterobacter cloacae* ventriculitis successfully treated with cefepime and gentamicin: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy*, 23(4), 537–542. <https://doi.org/10.1592/phco.23.4.537.32126>
- Baron, S., Bardet, L., Dubourg, G., Fichaux, M., & Rolain, J. M. (2017). *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance gene detection in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate in France.

Journal of global antimicrobial resistance, 10, 35–36.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.004>

- Bartholomew, T. L., Kidd, T. J., Sá Pessoa, J., Conde Álvarez, R., & Bengoechea, J. A. (2019). 2-Hydroxylation of *Acinetobacter baumannii* Lipid A Contributes to Virulence. *Infection and immunity*, 87(4), e00066-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00066-19>
- Basu S. (2015). Neonatal sepsis: the gut connection. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 34(2), 215–222. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2232-6>
- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Benklaouz, M. B., Rahal, K., & Ben-Mahdi, M. H. (2018). Characterization of quinolone-resistant *Enterobacteriaceae* strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of *qnrS* in an *Enterobacter cloacae*. *Veterinary world*, 11(4), 469–473. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.469-473>
- Bendjama, E., Loucif, L., Chelaghma, W., Attal, C., Bellakh, F. Z., Benaldjia, R., Kahlat, I., Meddour, A., & Rolain, J. M. (2020). First detection of an OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* isolate from currency coins in Algeria. *Journal of global antimicrobial resistance*, 23, 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.09.003>
- Bertani, B. y Ruiz, N. (2018). Función y Biogénesis de los Lipopolisacáridos. *EcoSal Plus*, 8 (1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018>
- Besser, J., Carleton, H. A., Gerner-Smidt, P., Lindsey, R. L., & Trees, E. (2018). Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(4), 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.013>
- Beyrouthy, R., Baretts, M., Marion, E., Dananché, C., Dauwalder, O., Robin, F., Gauthier, L., Jousset, A., Dortet, L., Guérin, F., Bénet, T., Cassier, P., Vanhems, P., & Bonnet, R. (2018). Novel *Enterobacter* Lineage as Leading Cause of Nosocomial Outbreak Involving Carbapenemase-Producing Strains. *Emerging infectious diseases*, 24(8), 1505–1515. <https://doi.org/10.3201/eid2408.180151>

- Biendo, M., Manoliu, C., Laurans, G., Castelain, S., Canarelli, B., Thomas, D., Hamdad, F., Rousseau, F., & Eb, F. (2008). Molecular typing and characterization of extended-spectrum TEM, SHV and CTX-M β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Research in microbiology*, 159(9-10), 590–594. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.09.003>
- Bishop R. E. (2008). Structural biology of membrane-intrinsic beta-barrel enzymes: sentinels of the bacterial outer membrane. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(9), 1881–1896. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.021>
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., Malhotra-Kumar, S., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Bos, M. P., Robert, V., & Tommassen, J. (2007). Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annual review of microbiology*, 61, 191–214. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093245>
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(1), 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>
- Bourouis, A., Dubois, V., Coulange, L., André, C., Bejhadj, C., Ben Moussa, M., Quentin, C., & Belhadj, O. (2011). First report of CTX-M-9 in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* in a Tunisian hospital. *Pathologie-biologie*, 59(4), 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.03.008>
- Bouvet, O.M., Lenormand, P., & Grimont, P.A. (1989). Taxonomic Diversity of the D-Glucose Oxidation Pathway in the *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39, 61-67.

- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., & De Vos, P. (2013). Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Systematic and applied microbiology*, 36(5), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.005>
- Brandenburg, K., & Wiese, A. (2004). Endotoxins: relationships between structure, function, and activity. *Current topics in medicinal chemistry*, 4(11), 1127–1146. <https://doi.org/10.2174/1568026043388213>
- Breazeale, S. D., Ribeiro, A. A., & Raetz, C. R. (2003). Origin of lipid A species modified with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose in polymyxin-resistant mutants of *Escherichia coli*. An aminotransferase (ArnB) that generates UDP-4-deoxyl-L-arabinose. *The Journal of biological chemistry*, 278(27), 24731–24739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304043200>
- Brisse, S., Milatovic, D., Fluit, A. C., Verhoef, J., Martin, N., Scheuring, S., Köhrer, K., & Schmitz, F. J. (1999). Comparative in vitro activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterobacter aerogenes* clinical isolates with alterations in GyrA and ParC proteins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(8), 2051–2055. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.8.2051>
- Brozek, K. A., & Raetz, C. R. (1990). Biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli*. Acyl carrier protein-dependent incorporation of laurate and myristate. *The Journal of biological chemistry*, 265(26), 15410–15417.

- Brozek, K. A., Hosaka, K., Robertson, A. D., & Raetz, C. R. (1989). Biosynthesis of lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. Cytoplasmic enzymes that attach 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid to lipid A. *The Journal of biological chemistry*, 264(12), 6956–6966.
- Camacho-Gonzalez, A., Spearman, P. W., & Stoll, B. J. (2013). Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatric clinics of North America*, 60(2), 367–389. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.12.003>
- Candel, F. J., Borges Sá, M., Belda, S., Bou, G., Del Pozo, J. L., Estrada, O., Ferrer, R., González Del Castillo, J., Julián-Jiménez, A., Martín-Loeches, I., Maseda, E., Matesanz, M., Ramírez, P., Ramos, J. T., Rello, J., Suberviola, B., Suárez de la Rica, A., & Vidal, P. (2018). Current aspects in sepsis approach. Turning things around. *Revista espanola de quimioterapia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 31(4), 298–315.
- Carvalho-Assef, A. P., Pereira, P. S., Albano, R. M., Berião, G. C., Tavares, C. P., Chagas, T. P., Marques, E. A., Timm, L. N., Da Silva, R. C., Falci, D. R., & Asensi, M. D. (2014). Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(4), 2475–2476. <https://doi.org/10.1128/AAC.02804-13>
- Carver, T., Thomson, N., Bleasby, A., Berriman, M., & Parkhill, J. (2009). DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(1), 119–120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn578>
- Chauhan, S., Noor, J., Yegneswaran, B., & Kodali, H. (2016). *Enterobacter* Meningitis and Challenges in Treatment. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(12), OD10–OD11. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/20759.9081>
- Chavignon, M., Reboux, M., Tasse, J., Tristan, A., Claris, O., Laurent, F., & Butin, M. (2021). Persistent microbial contamination of incubators despite disinfection. *Pediatric research*, 90(6), 1215–1220. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01407-8>
- Chen, H. L., Lu, J. H., Wang, H. H., Chen, S. J., Chen, C. J., Wu, K. G., & Tang, R. B. (2014). Clinical analysis of *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients: a 10-year study. *Journal of*

- microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi, 47(5), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.03.016>
- Chen, H., Wang, C., Wang, X., Guo, Z., Xu, Z., Zhao, Y., Cai, J., & Liu, J. (2019). A polysaccharide from *Enterobacter cloacae* induces apoptosis of human osteosarcoma cells through the activation of p53 and mitochondrial intrinsic pathway. *International journal of biological macromolecules*, 122, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.111>
- Chen, L., Chen, Z. L., Liu, J. H., Zeng, Z. L., Ma, J. Y., & Jiang, H. X. (2007). Emergence of *RmtB* methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(5), 880–885. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm065>
- Cherrak, Y., Flaugnatti, N., Durand, E., Journet, L., & Cascales, E. (2019). Structure and Activity of the Type VI Secretion System. *Microbiology spectrum*, 7(4), 10.1128/microbiolspec.PSIB-0031-2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0031-2019>
- Chetri, S., Singha, M., Bhowmik, D., Nath, K., Chanda, D. D., Chakravarty, A., & Bhattacharjee, A. (2019). Transcriptional response of OmpC and OmpF in *Escherichia coli* against differential gradient of carbapenem stress. *BMC research notes*, 12(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4177-4>
- Cho, G. S., Stein, M., Fiedler, G., Igbinosa, E. O., Koll, L. P., Brinks, E., Rathje, J., Neve, H., & Franz, C. (2021). Polyphasic study of antibiotic-resistant enterobacteria isolated from fresh produce in Germany and description of *Enterobacter vonholyi* sp. nov. isolated from marjoram and *Enterobacter dykesii* sp. nov. isolated from mung bean sprout. *Systematic and applied microbiology*, 44(1), 126174. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126174>
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X. W., De Meyer, S., & Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(1), 461–466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>

- Ciufo, S., Kannan, S., Sharma, S., Badretdin, A., Clark, K., Turner, S., Brover, S., Schoch, C. L., Kimchi, A., & DiCuccio, M. (2018). Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(7), 2386–2392. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002809>
- Crowell, D. N., Anderson, M. S., & Raetz, C. R. (1986). Molecular cloning of the genes for lipid A disaccharide synthase and UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 168(1), 152–159. <https://doi.org/10.1128/jb.168.1.152-159.1986>
- da Silva, C. L., Miranda, L. E., Moreira, B. M., Rebello, D., Carson, L. A., Kellum, M. E., de Almeida, M. C., Sampaio, J. L., & O'Hara, C. M. (2002). *Enterobacter hormaechei* bloodstream infection at three neonatal intensive care units in Brazil. *The Pediatric infectious disease journal*, 21(2), 175–177. <https://doi.org/10.1097/00006454-200202000-00022>
- Dai, H., Lu, B., Li, Z., Huang, Z., Cai, H., Yu, K., & Wang, D. (2020). Multilocus sequence analysis for the taxonomic updating and identification of the genus *Proteus* and reclassification of *Proteus* genospecies 5 O'Hara et al. 2000, *Proteus cibarius* Hyun et al. 2016 as later heterotypic synonyms of *Proteus terrae* Behrendt et al. 2015. *BMC microbiology*, 20(1), 152. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01844-1>
- Dalben, M., Varkulja, G., Basso, M., Krebs, V. L., Gibelli, M. A., van der Heijden, I., Rossi, F., Duboc, G., Levin, A. S., & Costa, S. F. (2008). Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. *The Journal of hospital infection*, 70(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.05.003>
- Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), e00002-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>
- De Angelis, G., Fiori, B., Menchinelli, G., D'Inzeo, T., Liotti, F. M., Morandotti, G. A., Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Spanu, T. (2018). Incidence and antimicrobial resistance trends in bloodstream infections caused by ESKAPE and *Escherichia coli* at a large teaching hospital in Rome, a 9-year analysis (2007-2015). *European journal of clinical*

- microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 37(9), 1627–1636. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3292-9>
- de Carvalho, M., Moura, Q., Fernandes, M. R., Sellera, F. P., Pagotto, A. H., Stuginski, D. R., Castro, R. A., Sant'Anna, S. S., Grego, K. F., & Lincopan, N. (2018). Genomic features of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* ST279 producing CTX-M-15 and AAC(6')-Ib-cr isolated from fatal infectious stomatitis in a crossed pit viper (*Bothrops alternatus*). *Journal of global antimicrobial resistance*, 15, 290–291. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.11.009>
- de Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Poupart, M. C., Dumas, M. P., & Sirot, J. (1991). Concomitant dissemination of three extended-spectrum β -lactamases among different *Enterobacteriaceae* isolated in a French hospital. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 27(4), 441–457. <https://doi.org/10.1093/jac/27.4.441>
- De Florio, L., Riva, E., Giona, A., Dedej, E., Fogolari, M., Cella, E., Spoto, S., Lai, A., Zehender, G., Ciccozzi, M., & Angeletti, S. (2018). MALDI-TOF MS Identification and Clustering Applied to *Enterobacter* Species in Nosocomial Setting. *Frontiers in microbiology*, 9, 1885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01885>
- De Souza Santos, M., & Orth, K. (2019). The Role of the Type III Secretion System in the Intracellular Lifestyle of Enteric Pathogens. *Microbiology spectrum*, 7(3), 10.1128/microbiolspec.BAI-0008-2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0008-2019>
- Deguchi, T., Yasuda, M., Nakano, M., Ozeki, S., Kanematsu, E., Nishino, Y., Ishihara, S., & Kawada, Y. (1997). Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in quinolone-resistant clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 40(4), 543–549. <https://doi.org/10.1093/jac/40.4.543>
- Demir, T., Baran, G., Buyukguclu, T., Sezgin, F. M., & Kaymaz, H. (2014). Pneumonia due to *Enterobacter cancerogenus* infection. *Folia microbiologica*, 59(6), 527–530. <https://doi.org/10.1007/s12223-014-0330-6>
- Dimitrova, D. I., Markovska, R. D., Stoeva, T. J., Stankova, P. B., Georgieva, L. B., Mihova, K. I., Kaneva, R. P., & Mitov, I. G. (2019). First Report of DHA-1 Producing *Enterobacter*

- cloacae* Complex Isolate in Bulgaria. *Folia medica*, 61(3), 458–461.
<https://doi.org/10.3897/folmed.61.e39349>
- Doijad, S., Imirzalioglu, C., Yao, Y., Pati, N. B., Falgenhauer, L., Hain, T., Foessel, B. U., Abt, B., Overmann, J., Mirambo, M. M., Mshana, S. E., & Chakraborty, T. (2016). *Enterobacter bugandensis* sp. nov., isolated from neonatal blood. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(2), 968–974. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000821>
- Dong, Y., & Speer, C. P. (2015). Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, 100(3), F257–F263.
<https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306213>
- Dorsey, C. W., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Weening, E. H., & Bäumlér, A. J. (2005). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Molecular microbiology*, 57(1), 196–211.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04666.x>
- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 160–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>
- Du, H., Chen, L., Chavda, K. D., Pandey, R., Zhang, H., Xie, X., Tang, Y. W., & Kreiswirth, B. N. (2016). Genomic Characterization of *Enterobacter cloacae* Isolates from China That Coproduce KPC-3 and NDM-1 Carbapenemases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(4), 2519–2523. <https://doi.org/10.1128/AAC.03053-15>
- Edgar R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edwards, M. S., & Baker, C. J. (2004). *Krugman's infectious diseases of children. Sepsis in the Newborn*. Philadelphia, Mosby, 545-561.
- Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux. en établissements de santé, mai-juin 2017. Saint-Maurice : Santé publique France, 2019. 270 p. Disponible à partir de l'URL : www.santepubliquefrance.fr

- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., & Poxton, I. R. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and infection*, 4(8), 837–851. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01604-0](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01604-0)
- Ershad, M., Mostafa, A., Dela Cruz, M., & Vearrier, D. (2019). Neonatal Sepsis. *Current emergency and hospital medicine reports*, 7(3), 83–90. <https://doi.org/10.1007/s40138-019-00188-z>
- Fadli, M., Chevalier, J., Hassani, L., Mezrioui, N. E., & Pagès, J. M. (2014). Natural extracts stimulate membrane-associated mechanisms of resistance in Gram-negative bacteria. *Letters in applied microbiology*, 58(5), 472–477. <https://doi.org/10.1111/lam.12216>
- Fanaroff, A. A., & Fanaroff, J. M. (2020). Advances in Neonatal Infections. *American journal of perinatology*, 37(S 02), S5–S9. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1715584>
- Farrar, W. E., & Krause, J. M. (1970). Relationship Between beta-Lactamase Activity and Resistance of *Enterobacter* to Cephalothin. *Infection and immunity*, 2(5), 610–616. <https://doi.org/10.1128/iai.2.5.610-616.1970>
- Fernández, A. B., Pérez, M., & Portero, J. (2012). Recurrent *Enterobacter cloacae* septicemia, hepatic abscess, and biliary leakage after intra-operative radiofrequency ablation of a single liver metastasis plus sigmoidectomy. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 14(10), 709. <https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2012.00527.x>
- Fernández, P. A., Velásquez, F., Garcias-Papayani, H., Amaya, F. A., Ortega, J., Gómez, S., Santiviago, C. A., & Álvarez, S. A. (2018). Fnr and ArcA Regulate Lipid A Hydroxylation in *Salmonella* Enteritidis by Controlling IpxO Expression in Response to Oxygen Availability. *Frontiers in microbiology*, 9, 1220. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01220>
- Ferreira, D., Seca, A., C G A, D., & Silva, A. (2016). Targeting human pathogenic bacteria by siderophores: A proteomics review. *Journal of proteomics*, 145, 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.006>
- Ferry, A., Plaisant, F., Ginevra, C., Dumont, Y., Grando, J., Claris, O., Vandenesch, F., & Butin, M. (2020). *Enterobacter cloacae* colonisation and infection in a neonatal intensive care unit:

retrospective investigation of preventive measures implemented after a multiclonal outbreak. BMC infectious diseases, 20(1), 682. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05406-8>

Flores-Carrero, A., Labrador, I., Paniz-Mondolfi, A., Peaper, D. R., Towle, D., & Araque, M. (2016). Nosocomial outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter ludwigii* co-harboring CTX-M-8, SHV-12 and TEM-15 in a neonatal intensive care unit in Venezuela. Journal of global antimicrobial resistance, 7, 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.08.006>

Fouquet, M., Morange, V., & Bruyère, F. (2012). Évolution sur cinq ans des infections à germes produisant une β -lactamase à spectre étendu [Five years follow-up of infections with extended-spectrum β -lactamase producing *enterobacteriaceae*]. Progres en urologie : journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie, 22(1), 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2011.07.003>

Galanos, C., Freudenberg, M. A., Lüderitz, O., Rietschel, E. T., & Westphal, O. (1979). Chemical, physicochemical and biological properties of bacterial lipopolysaccharides. *Progress in clinical and biological research*, 29, 321–332.

Garrett, T. A., Kadmas, J. L., & Raetz, C. R. (1997). Identification of the gene encoding the *Escherichia coli* lipid A 4'-kinase. Facile phosphorylation of endotoxin analogs with recombinant LpxK. The Journal of biological chemistry, 272(35), 21855–21864. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.35.21855>

Garrett, T. A., Que, N. L., & Raetz, C. R. (1998). Accumulation of a lipid A precursor lacking the 4'-phosphate following inactivation of the *Escherichia coli* lpxK gene. The Journal of biological chemistry, 273(20), 12457–12465. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.20.12457>

Gasparini, A. J., Wang, B., Sun, X., Kennedy, E. A., Hernandez-Leyva, A., Ndao, I. M., Tarr, P. I., Warner, B. B., & Dantas, G. (2019). Persistent metagenomic signatures of early-life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome. Nature microbiology, 4(12), 2285–2297. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0550-2>

Gaston M. A. (1988). *Enterobacter*: an emerging nosocomial pathogen. The Journal of hospital infection, 11(3), 197–208. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(88\)90098-9](https://doi.org/10.1016/0195-6701(88)90098-9)

- Georgopoulos, A., Schein, R., Buxbaum, A., Tzotzos, S., Hirschl, A., & Graninger, W. (1998). Mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 4(2), 75–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1998.tb00359.x>
- Gibbons, H. S., Lin, S., Cotter, R. J., & Raetz, C. R. (2000). Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymyristate moiety in *Salmonella typhimurium* lipid A. Function of LpxO, A new Fe²⁺/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue. *The Journal of biological chemistry*, 275(42), 32940–32949. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005779200>
- Gibbons, H. S., Reynolds, C. M., Guan, Z., & Raetz, C. R. (2008). An inner membrane dioxygenase that generates the 2-hydroxymyristate moiety of Salmonella lipid A. *Biochemistry*, 47(9), 2814–2825. <https://doi.org/10.1021/bi702457c>
- Gillespie, J. J., Wattam, A. R., Cammer, S. A., Gabbard, J. L., Shukla, M. P., Dalay, O., Driscoll, T., Hix, D., Mane, S. P., Mao, C., Nordberg, E. K., Scott, M., Schulman, J. R., Snyder, E. E., Sullivan, D. E., Wang, C., Warren, A., Williams, K. P., Xue, T., Yoo, H. S., ... Sobral, B. W. (2011). PATRIC: the comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species. *Infection and immunity*, 79(11), 4286–4298. <https://doi.org/10.1128/IAI.00207-11>
- Girlich, D., Ouzani, S., Emeraud, C., Gauthier, L., Bonnin, R. A., Le Sache, N., ... Dortet, L. (2021). Uncovering the novel *Enterobacter cloacae* complex species responsible for septic shock deaths in newborns: a cohort study. *The Lancet Microbe*, 2(10), e536–e544. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00098-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00098-7)
- Girlich, D., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Clonal distribution of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 81(4), 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.01.003>
- Glaser, M. A., Hughes, L. M., Jnah, A., & Newberry, D. (2021). Neonatal Sepsis: A Review of Pathophysiology and Current Management Strategies. *Advances in neonatal care* :

- official journal of the National Association of Neonatal Nurses, 21(1), 49–60.
<https://doi.org/10.1097/ANC.0000000000000769>
- Godmer, A., Benzerara, Y., Normand, A. C., Veziris, N., Gallah, S., Eckert, C., Morand, P., Piarroux, R., & Aubry, A. (2021). Revisiting Species Identification within the *Enterobacter cloacae* Complex by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Microbiology spectrum*, 9(1), e0066121.
<https://doi.org/10.1128/Spectrum.00661-21>
- Goldberg, D. W., Fernandes, M. R., Sellera, F. P., Costa, D., Loureiro Bracarense, A. P., & Lincopan, N. (2019). Genetic background of CTX-M-15-producing *Enterobacter hormaechei* ST114 and *Citrobacter freundii* ST265 co-infecting a free-living green turtle (*Chelonia mydas*). *Zoonoses and public health*, 66(5), 540–545.
<https://doi.org/10.1111/zph.12572>
- Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology reviews*, 33(2), 279–294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00135.x>
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 1), 81–91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
- Grimont F., Grimont P.A.D. (2006) The Genus *Enterobacter*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_9
- Groisman E. A. (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *Journal of bacteriology*, 183(6), 1835–1842. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.1835-1842.2001>
- Groisman, E. A., Duprey, A., & Choi, J. (2021). How the PhoP/PhoQ System Controls Virulence and Mg²⁺ Homeostasis: Lessons in Signal Transduction, Pathogenesis, Physiology, and Evolution. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 85(3), e0017620.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00176-20>

- Gu, C. T., Li, C. Y., Yang, L. J., & Huo, G. C. (2014). *Enterobacter xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional sourdough, and reclassification of *Enterobacter sacchari* Zhu et al. 2013 as *Kosakonia sacchari* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 8), 2650–2656. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.064709-0>
- Guérin, F., Isnard, C., Cattoir, V., & Giard, J. C. (2015). Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated β -Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(12), 7753–7761. <https://doi.org/10.1128/AAC.01729-15>
- Guérin, F., Isnard, C., Sinel, C., Morand, P., Dhalluin, A., Cattoir, V., & Giard, J. C. (2016). Cluster-dependent colistin hetero-resistance in *Enterobacter cloacae* complex. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 71(11), 3058–3061. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw260>
- Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., & Miller, S. I. (1998). PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Molecular microbiology*, 27(6), 1171–1182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00757.x>
- Guo, L., Lim, K. B., Gunn, J. S., Bainbridge, B., Darveau, R. P., Hackett, M., & Miller, S. I. (1997). Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science* (New York, N.Y.), 276(5310), 250–253. <https://doi.org/10.1126/science.276.5310.250>
- Hanson, N. D., & Sanders, C. C. (1999). Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Current pharmaceutical design*, 5(11), 881–894.
- Harris, P. N., & Ferguson, J. K. (2012). Antibiotic therapy for inducible AmpC β -lactamase-producing Gram-negative bacilli: what are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides?. *International journal of antimicrobial agents*, 40(4), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.06.004>
- Haute Autorité de Santé. Diagnostic et traitement curatif de l'infection bactérienne précoce du nouveau-né. [Internet]. Janvier 2022. <https://www.has-sante.fr/>
- He, Z., Wang, C., Liu, B., Feng, M., & Wang, Z. (2019). Successful Treatment of Serious Meningitis Caused by Extremely Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae*

- (MIC \geq 16mg/L) with i.v. Meropenem and i.v. Amikacin Plus Intraventricular Amikacin. Infection and drug resistance, 12, 3765–3770. <https://doi.org/10.2147/IDR.S224509>
- Helander, I. M., Lindner, B., Brade, H., Altmann, K., Lindberg, A. A., Rietschel, E. T., & Zähringer, U. (1988). Chemical structure of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* strain I-69 Rd-/b+. Description of a novel deep-rough chemotype. European journal of biochemistry, 177(3), 483–492. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14398.x>
- Hoffmann, H., & Roggenkamp, A. (2003). Population genetics of the nomenclature species *Enterobacter cloacae*. Applied and environmental microbiology, 69(9), 5306–5318. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003>
- Hoffmann, H., Schmoltdt, S., Trülzsch, K., Stumpf, A., Bengsch, S., Blankenstein, T., Heesemann, J., & Roggenkamp, A. (2005). Nosocomial urosepsis caused by *Enterobacter kobei* with aberrant phenotype. Diagnostic microbiology and infectious disease, 53(2), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.06.008>
- Hoffmann, H., Stindl, S., Ludwig, W., Stumpf, A., Mehlen, A., Heesemann, J., Monget, D., Schleifer, K. H., & Roggenkamp, A. (2005). Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. Systematic and applied microbiology, 28(3), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.010>
- Hoffmann, H., Stindl, S., Stumpf, A., Mehlen, A., Monget, D., Heesemann, J., Schleifer, K. H., & Roggenkamp, A. (2005). Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. Systematic and applied microbiology, 28(3), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.009>
- Holsen, M. R., Wardlow, L. C., Bazan, J. A., Fussner, L. A., Coe, K. E., & Elefritz, J. L. (2019). Clinical outcomes following treatment of *Enterobacter* species pneumonia with piperacillin/tazobactam compared to cefepime or ertapenem. International journal of antimicrobial agents, 54(6), 824–828. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.07.008>
- Homma, J. Y., Matsuura, M., Kanegasaki, S., Kawakubo, Y., Kojima, Y., Shibukawa, N., Kumazawa, Y., Yamamoto, A., Tanamoto, K., & Yasuda, T. (1985). Structural requirements of lipid A responsible for the functions: a study with chemically

- synthesized lipid A and its analogues. *Journal of biochemistry*, 98(2), 395–406.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135294>
- Hornsey, M., Ellington, M. J., Doumith, M., Scott, G., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2010). Emergence of AcrAB-mediated tigecycline resistance in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* during ciprofloxacin treatment. *International journal of antimicrobial agents*, 35(5), 478–481. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.01.011>
- Hsu V. (2014). Prevention of health care-associated infections. *American family physician*, 90(6), 377–382.
- Hwang, P. M., Bishop, R. E., & Kay, L. E. (2004). The integral membrane enzyme PagP alternates between two dynamically distinct states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9618–9623.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0402324101>
- Iroh Tam, P. Y., & Bendel, C. M. (2017). Diagnostics for neonatal sepsis: current approaches and future directions. *Pediatric research*, 82(4), 574–583.
<https://doi.org/10.1038/pr.2017.134>
- İstanbullu, K., Köksal, N., Çetinkaya, M., Özkan, H., Yakut, T., Karkucak, M., & Doğan, H. (2019). The potential utility of real-time PCR of the 16S-rRNA gene in the diagnosis of neonatal sepsis. *The Turkish journal of pediatrics*, 61(4), 493–499.
<https://doi.org/10.24953/turkjpmed.2019.04.004>
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., & Joosten, H. (2007). The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC evolutionary biology*, 7, 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-64>
- Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B. D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R., & Joosten, H. (2008). *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov.,

Cronobacter malonaticus sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 58(Pt 6), 1442–1447. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65577-0>

Izdebski, R., Baraniak, A., Zabicka, D., Sekowska, A., Gospodarek-Komkowska, E., Hryniewicz, W., & Gniadkowski, M. (2018). VIM/IMP carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Poland: epidemic *Enterobacter hormaechei* and *Klebsiella oxytoca* lineages. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 73(10), 2675–2681. <https://doi.org/10.1093/jac/dky257>

Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martínez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L., & Wang, M. (2008). *qnr* Gene nomenclature. Antimicrobial agents and chemotherapy, 52(7), 2297–2299. <https://doi.org/10.1128/AAC.00147-08>

Jarczak, D., Kluge, S., & Nierhaus, A. (2021). Sepsis-Pathophysiology and Therapeutic Concepts. Frontiers in medicine, 8, 628302. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.628302>

Jarlier V, INVS. 2014. Surveillance of multidrug resistant bacteria in French healthcare facilities BMR-Raisin network Données 2012 Saint- Maurice: Institut de veille sanitaire. <http://www.invs.sante.fr>.

Joiner, K. A., Grossman, N., Schmetz, M., & Leive, L. (1986). C3 binds preferentially to long-chain lipopolysaccharide during alternative pathway activation by *Salmonella montevideo*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 136(2), 710–715.

Joiner, K. A., Schmetz, M. A., Goldman, R. C., Leive, L., & Frank, M. M. (1984). Mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing: inserted C5b-9 correlates with killing for *Escherichia coli* O111B4 varying in O-antigen capsule and O-polysaccharide coverage of lipid A core oligosaccharide. *Infection and immunity*, 45(1), 113–117. <https://doi.org/10.1128/iai.45.1.113-117.1984>

- Kaas, R. S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2014). Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PloS one*, 9(8), e104984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>
- Kamio, Y., & Nikaido, H. (1976). Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry*, 15(12), 2561–2570. <https://doi.org/10.1021/bi00657a012>
- Kämpfer, P., McInroy, J. A., & Glaeser, S. P. (2015). *Enterobacter muelleri* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Zea mays*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(11), 4093–4099. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000547>
- Kaneko, K., Okamoto, R., Nakano, R., Kawakami, S., & Inoue, M. (2005). Gene mutations responsible for overexpression of AmpC beta-lactamase in some clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Journal of clinical microbiology*, 43(6), 2955–2958. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2955-2958.2005>
- Kawasaki, K., Ernst, R. K., & Miller, S. I. (2004). 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry*, 279(19), 20044–20048. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401275200>
- Keeney, D., Ruzin, A., & Bradford, P. A. (2007). RamA, a transcriptional regulator, and AcrAB, an RND-type efflux pump, are associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Enterobacter cloacae*. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 13(1), 1–6. <https://doi.org/10.1089/mdr.2006.9990>
- Khajuria, A., Praharaj, A. K., Grover, N., & Kumar, M. (2013). First report of an *Enterobacter ludwigii* isolate coharboring NDM-1 and OXA-48 carbapenemases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(10), 5189–5190. <https://doi.org/10.1128/AAC.00789-13>
- Khan, S., Paravastu, P., Jha, P. N., & Marathe, S. A. (2020). Elucidating the pathogenic potential of *Enterobacter cloacae* SBP-8 using *Caenorhabditis elegans* as a model host. *Microbial pathogenesis*, 148, 104449. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104449>

- Kim, F., Polin, R. A., & Hooven, T. A. (2020). Neonatal sepsis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 371, m3672. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3672>
- Kim, S. M., Lee, H. W., Choi, Y. W., Kim, S. H., Lee, J. C., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T., & Kim, J. (2012). Involvement of curli fimbriae in the biofilm formation of *Enterobacter cloacae*. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 50(1), 175–178. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-2044-2>
- Kim, S. Y., Park, Y. J., Yu, J. K., & Kim, Y. S. (2011). Aminoglycoside susceptibility profiles of *Enterobacter cloacae* isolates harboring the *aac(6')-Ib* gene. *The Korean journal of laboratory medicine*, 31(4), 279–281. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.4.279>
- Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Ogawa, T., Takahashi, I., Ikeda, T., Otsuka, K., Shimauchi, H., Kasai, N., & Mashimo, J. (1985). Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an *Escherichia coli* re-mutant. *Infection and immunity*, 49(1), 225–237. <https://doi.org/10.1128/iai.49.1.225-237.1985>
- Krzywińska, S., Koczura, R., Mokracka, J., Puton, T., & Kaznowski, A. (2010). Isolates of the *Enterobacter cloacae* complex induce apoptosis of human intestinal epithelial cells. *Microbial pathogenesis*, 49(3), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.04.003>
- Kuboyama RH, de Oliveira HB, Moretti-Branchini ML. 2003. Molecular epidemiology of systemic infection caused by *Enterobacter cloacae* in a high-risk neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24: 490–494. <https://doi.org/10.1086/502249>
- Kuga, A., Okamoto, R., & Inoue, M. (2000). *ampR* gene mutations that greatly increase class C beta-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(3), 561–567. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.561-567.2000>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- L'Héritau, F., Lacavé, L., Leboucher, B., Decousser, J. W., De Chillaz, C., Astagneau, P., Aujard, Y., & le comité de pilotage du Réseau NEOCAT (2022). Surveillance en réseau des bactériémies sur cathéter en néonatalogie : résultats 2019 du réseau NEOCAT

[NEOCAT, surveillance network of catheter-related bloodstream infections in neonates: 2019 data]. Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie. Consulté en janvier 2022 sur : <http://www.cpias-ile-de-france.fr/surveillance/reseau-neocat.php>

- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of clinical microbiology*, 50(4), 1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Lascols, C., Robert, J., Cattoir, V., Bébéar, C., Cavallo, J. D., Podglajen, I., Ploy, M. C., Bonnet, R., Soussy, C. J., & Cambau, E. (2007). Type II topoisomerase mutations in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and other enterobacterial species harbouring the *qnrA* gene. *International journal of antimicrobial agents*, 29(4), 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.11.008>
- Lawn, J. E., Cousens, S., Zupan, J., & Lancet Neonatal Survival Steering Team (2005). 4 million neonatal deaths: when? Where? Why?. *Lancet (London, England)*, 365(9462), 891–900. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71048-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71048-5)
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic acids research*, 47(W1), W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Li, C. Y., Zhou, Y. L., Ji, J., & Gu, C. T. (2016). Reclassification of *Enterobacter oryziphilus* and *Enterobacter oryzendophyticus* as *Kosakonia oryziphila* comb. nov. and *Kosakonia oryzendophytica* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(8), 2780–2783. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001054>
- Liaqat, I., Liaqat, M., Tahir, H. M., Haq, I., Ali, N. M., Arshad, M., & Arshad, N. (2019). Motility effects biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 32(3), 927–932.
- Linde, H. J., Notka, F., Irtenkauf, C., Decker, J., Wild, J., Niller, H. H., Heisig, P., & Lehn, N. (2002). Increase in MICs of ciprofloxacin in vivo in two closely related clinical isolates of

- Enterobacter cloacae*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 49(4), 625–630.
<https://doi.org/10.1093/jac/49.4.625>
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. Nucleic acids research, 47(D1), D687–D692.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., Rudan, I., Campbell, H., Cibulskis, R., Li, M., Mathers, C., Black, R. E., & Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. Lancet (London, England), 379(9832), 2151–2161. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60560-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60560-1)
- Liu, S., Huang, N., Zhou, C., Lin, Y., Zhang, Y., Wang, L., Zheng, X., Zhou, T., & Wang, Z. (2021). Molecular Mechanisms and Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Isolated from Chinese Patients During 2004–2018. Infection and drug resistance, 14, 3647–3658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S327595>
- Liu, Y. Y., Chiou, C. S., & Chen, C. C. (2016). PGADB-builder: A web service tool for creating pan-genome allele database for molecular fine typing. Scientific reports, 6, 36213. <https://doi.org/10.1038/srep36213>
- Livermore, D. M., Mushtaq, S., Barker, K., Hope, R., Warner, M., & Woodford, N. (2012). Characterization of β -lactamase and porin mutants of *Enterobacteriaceae* selected with ceftaroline + avibactam (NXL104). The Journal of antimicrobial chemotherapy, 67(6), 1354–1358. <https://doi.org/10.1093/jac/dks079>
- Llobet, E., Martínez-Moliner, V., Moranta, D., Dahlström, K. M., Regueiro, V., Tomás, A., Cano, V., Pérez-Gutiérrez, C., Frank, C. G., Fernández-Carrasco, H., Insua, J. L., Salminen, T. A., Garmendia, J., & Bengoechea, J. A. (2015). Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(46), E6369–E6378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508820112>
- Lüderitz, O., Tanamoto, K., Galanos, C., McKenzie, G. R., Brade, H., Zähringer, U., Rietschel, E. T., Kusumoto, S., & Shiba, T. (1984). Lipopolysaccharides: structural principles and

- biologic activities. *Reviews of infectious diseases*, 6(4), 428–431.
<https://doi.org/10.1093/clinids/6.4.428>
- Ma, Y., Yao, R., Li, Y., Wu, X., Li, S., & An, Q. (2020). Proposal for Unification of the Genus *Metakosakonia* and the Genus *Phytobacter* to a Single Genus *Phytobacter* and Reclassification of *Metakosakonia massiliensis* as *Phytobacter massiliensis* comb. nov. *Current microbiology*, 77(8), 1945–1954. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02004-4>
- Makhlouf, J., Merhi, G., Salloum, T., Abboud, E., & Tokajian, S. (2021). Molecular characterization of a carbapenem-resistant *Enterobacter hormaechei* ssp. *xiangfangensis* co-harboring blaNDM-1 and a chromosomally encoded phage-linked blaCTX-M-15 genes. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 93, 104924. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104924>
- Maldonado, R. F., Sá-Correia, I., & Valvano, M. A. (2016). Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS microbiology reviews*, 40(4), 480–493. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>
- Manter, D. K., Hunter, W. J., & Vivanco, J. M. (2011). *Enterobacter soli* sp. nov.: a lignin-degrading γ -proteobacteria isolated from soil. *Current microbiology*, 62(3), 1044–1049. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9809-9>
- Mardaneh, J., & Soltan Dallal, M. M. (2016). Isolation and Identification *Enterobacter asburiae* from Consumed Powdered Infant Formula Milk (PIF) in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU). *Acta medica Iranica*, 54(1), 39–43.
- Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos [beta-Lactam antibiotics]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 21(1), 42–55. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(03\)72873-0](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(03)72873-0)
- Markovska, R., Stoeva, T., Dimitrova, D., Boyanova, L., Stankova, P., Mihova, K., & Mitov, I. (2019). Quinolone resistance mechanisms among third-generation cephalosporin resistant isolates of *Enterobacter* spp. in a Bulgarian university hospital. *Infection and drug resistance*, 12, 1445–1455. <https://doi.org/10.2147/IDR.S204199>

- Martins, E. R., Bueno, M., Francisco, G. R., Casella, T., de Oliveira Garcia, D., Cerdeira, L. T., Gerber, A. L., de Almeida, L., Lincopan, N., de Vasconcelos, A., Nogueira, M., & Estofolete, C. F. (2020). Genome and plasmid context of two *rmtG*-carrying *Enterobacter hormaechei* isolated from urinary tract infections in Brazil. *Journal of global antimicrobial resistance*, 20, 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.020>
- Marturano, J. E., & Lowery, T. J. (2019). ESKAPE Pathogens in Bloodstream Infections Are Associated With Higher Cost and Mortality but Can Be Predicted Using Diagnoses Upon Admission. *Open forum infectious diseases*, 6(12), ofz503. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz503>
- Mashaly, G. E., & Mashaly, M. E. (2021). Colistin-heteroresistance in carbapenemase-producing *Enterobacter* species causing hospital-acquired infections among Egyptian patients. *Journal of global antimicrobial resistance*, 24, 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.11.019>
- Masi, M., Pagès, J. M., & Pradel, E. (2003). Overexpression and purification of the three components of the *Enterobacter aerogenes* AcrA-AcrB-TolC multidrug efflux pump. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 786(1-2), 197–205. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(02\)00746-8](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00746-8)
- Matsumura, Y., Peirano, G., Devinney, R., Bradford, P. A., Motyl, M. R., Adams, M. D., Chen, L., Kreiswirth, B., & Pitout, J. (2017). Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(8), 2249–2258. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx148>
- Matteoli, F. P., Passarelli-Araujo, H., Pedrosa-Silva, F., Olivares, F. L., & Venancio, T. M. (2020). Population structure and pangenome analysis of *Enterobacter bugandensis* uncover the presence of *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{NDM-5} and *bla*_{IMI-1}, along with sophisticated iron acquisition strategies. *Genomics*, 112(2), 1182–1191. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.07.003>
- Mayhall, C. G., Lamb, V. A., Gayle, W. E., Jr, & Haynes, B. W., Jr (1979). *Enterobacter cloacae* septicemia in a burn center: epidemiology and control of an outbreak. *The Journal of infectious diseases*, 139(2), 166–171. <https://doi.org/10.1093/infdis/139.2.166>

- McLean, K., Rosenthal, C. A., Sengupta, D., Owens, J., Cookson, B. T., Hoffman, N. G., & Salipante, S. J. (2019). Improved Species-Level Clinical Identification of *Enterobacteriaceae* through Broad-Range dnaJ PCR and Sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 57(11), e00986-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00986-19>
- McGovern, M., Giannoni, E., Kuester, H., Turner, M. A., van den Hoogen, A., Bliss, J. M., Koenig, J. M., Keij, F. M., Mazela, J., Finnegan, R., Degtyareva, M., Simons, S., de Boode, W. P., Strunk, T., Reiss, I., Wynn, J. L., Molloy, E. J., & Infection, Inflammation, Immunology and Immunisation (I4) section of the ESPR (2020). Challenges in developing a consensus definition of neonatal sepsis. *Pediatric research*, 88(1), 14–26. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-0785-x>
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics*, 14, 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Meini, S., Tascini, C., Cej, M., Sozio, E., & Rossolini, G. M. (2019). AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriales*: what a clinician should know. *Infection*, 47(3), 363–375. <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01291-9>
- Messaoudi, A., Saras, E., Grami, R., Bouallègue, O., Boujâafar, N., Madec, J. Y., Mansour, W., & Haenni, M. (2019). Emergence of OXA-204 carbapenemase in *Enterobacter cloacae*. *International journal of antimicrobial agents*, 54(6), 829–830. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.09.001>
- Meurant, A., Guérin, F., Le Hello, S., Saint-Lorant, G., & de La Blanchardière, A. (2021). Cefepime use: A need for antimicrobial stewardship. *Infectious diseases now*, 51(5), 445–450. <https://doi.org/10.1016/j.idnow.2020.10.001>
- Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future microbiology*, 7(7), 887–902. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>
- Mhaya, A., Bégu, D., Tounsi, S., & Arpin, C. (2020). MgrB Inactivation Is Responsible for Acquired Resistance to Colistin in *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii*.

Antimicrobial agents and chemotherapy, 64(6), e00128-20.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00128-20>

Mimoz, O., Jacolot, A., Padoin, C., Tod, M., Samii, K., & Petitjean, O. (1998). Cefepime and amikacin synergy in vitro and in vivo against a ceftazidime-resistant strain of *Enterobacter cloacae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 41(3), 367–372.
<https://doi.org/10.1093/jac/41.3.367>

Minarini, L. A., & Darini, A. L. (2012). Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43(4), 1309–1314.
<https://doi.org/10.1590/S1517-838220120004000010>

Mizrahi, A., Delerue, T., Morel, H., Le Monnier, A., Carbonnelle, E., Pilmis, B., Zahar, J. R., & on behalf the Saint-Joseph/Avicenna Study Group (2020). Infections caused by naturally AmpC-producing *Enterobacteriaceae*: Can we use third-generation cephalosporins? A narrative review. *International journal of antimicrobial agents*, 55(2), 105834.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.10.015>

Moffatt, J. H., Harper, M., & Boyce, J. D. (2019). Mechanisms of Polymyxin Resistance. *Advances in experimental medicine and biology*, 1145, 55–71. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_5

Molinaro, A., Holst, O., Di Lorenzo, F., Callaghan, M., Nurisso, A., D'Errico, G., Zamyatina, A., Peri, F., Berisio, R., Jerala, R., Jiménez-Barbero, J., Silipo, A., & Martín-Santamaría, S. (2015). Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 21(2), 500–519. <https://doi.org/10.1002/chem.201403923>

Morand, P. C., Billoet, A., Rottman, M., Sivadon-Tardy, V., Eyrolle, L., Jeanne, L., Tazi, A., Anract, P., Courpied, J. P., Poyart, C., & Dumaine, V. (2009). Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. *Journal of clinical microbiology*, 47(8), 2489–2495. <https://doi.org/10.1128/JCM.00290-09>

Moreira, C. G., Herrera, C. M., Needham, B. D., Parker, C. T., Libby, S. J., Fang, F. C., Trent, M. S., & Sperandio, V. (2013). Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in

bacterial/host associations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(4), 1470–1475.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1215416110>

Moy, S., & Sharma, R. (2017). Treatment Outcomes in Infections Caused by "SPICE" (*Serratia*, *Pseudomonas*, Indole-positive *Proteus*, *Citrobacter*, and *Enterobacter*) Organisms: Carbapenem versus Noncarbapenem Regimens. *Clinical therapeutics*, 39(1), 170–176.
<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.11.025>

Mshana SE, Gerwing L, Minde M, Hain T, Domann E, Lyamuya E, Chakraborty T, Imirzalioglu C. 2011. Outbreak of a novel *Enterobacter* sp. carrying *bla*_{CTX-M-15} in a neonatal unit of a tertiary care hospital in Tanzania. *Int J Antimicrob Agents* 38: 265–269.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.05.009>

Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology*, 10, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>

Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology*, 12(6), 1513–1530.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x>

Murthy, S., Godinho, M. A., Guddattu, V., Lewis, L., & Nair, N. S. (2019). Risk factors of neonatal sepsis in India: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 14(4), e0215683.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215683>

Mussap, M., Molinari, M. P., Senno, E., Gritti, P., Soro, B., Mannelli, S., & Fabris, C. (2007). New diagnostic tools for neonatal sepsis: the role of a real-time polymerase chain reaction for the early detection and identification of bacterial and fungal species in blood samples. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, 19 Suppl 2, 31–34.
<https://doi.org/10.1080/1120009x.2007.11782441>

Mustafa, A., Ibrahim, M., Rasheed, M. A., Kanwal, S., Hussain, A., Sami, A., Ahmed, R., & Bo, Z. (2020). Genome-wide Analysis of Four *Enterobacter cloacae* complex type strains: Insights into Virulence and Niche Adaptation. *Scientific reports*, 10(1), 8150.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65001-4>

- Navarro-Garcia, F., Ruiz-Perez, F., Cataldi, Á., & Larzábal, M. (2019). Type VI Secretion System in Pathogenic *Escherichia coli*: Structure, Role in Virulence, and Acquisition. *Frontiers in microbiology*, 10, 1965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01965>
- Neoh, H. M., Tan, X. E., Sapri, H. F., & Tan, T. L. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 74, 103935. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>
- Nikaido, H., & Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews*, 49(1), 1–32. <https://doi.org/10.1128/mr.49.1.1-32.1985>
- Ocviyanti, D., & Wahono, W. T. (2018). Risk Factors for Neonatal Sepsis in Pregnant Women with Premature Rupture of the Membrane. *Journal of pregnancy*, 2018, 4823404. <https://doi.org/10.1155/2018/4823404>
- Oeser, C., Pond, M., Butcher, P., Bedford Russell, A., Henneke, P., Laing, K., Planche, T., Heath, P. T., & Harris, K. (2020). PCR for the detection of pathogens in neonatal early onset sepsis. *PloS one*, 15(1), e0226817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226817>
- Oh, Y. J., & Hinterdorfer, P. (2019). Investigation of Bacterial Curli Production and Adhesion Using AFM. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1886, 221–231. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8894-5_12
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 5, 643. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- Oshiro, S., Tada, T., Watanabe, S., Tohya, M., Hishinuma, T., Uchida, H., Kuwahara-Arai, K., Mya, S., Zan, K. N., Kirikae, T., & Tin, H. H. (2020). Emergence and Spread of Carbapenem-Resistant and Aminoglycoside-Panresistant *Enterobacter cloacae* Complex Isolates Coproducing NDM-Type Metallo- β -Lactamase and 16S rRNA Methylase in Myanmar. *mSphere*, 5(2), e00054-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00054-20>
- Oteo, J., Cercenado, E., Vindel, A., Bautista, V., Fernández-Romero, S., Saéz, D., Padilla, B., Zamora, E., & Campos, J. (2013). Outbreak of multidrug-resistant CTX-M-15-producing

- Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. *Journal of medical microbiology*, 62(Pt 4), 571–575. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.053017-0>
- Oza, S., Lawn, J. E., Hogan, D. R., Mathers, C., & Cousens, S. N. (2015). Neonatal cause-of-death estimates for the early and late neonatal periods for 194 countries: 2000–2013. *Bulletin of the World Health Organization*, 93(1), 19–28. <https://doi.org/10.2471/BLT.14.139790>
- Ozdemir, A. A., & Cag, Y. (2019). Neonatal Vitamin D status and the risk of neonatal sepsis. *Pakistan journal of medical sciences*, 35(2), 420–425. <https://doi.org/10.12669/pjms.35.2.342>
- Paauw, A., Caspers, M., Leverstein-van Hall, M. A., Schuren, F., Montijn, R. C., Verhoef, J., & Fluit, A. C. (2009). Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 5), 1478–1488. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024828-0>
- Paterson D. L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American journal of medicine*, 119(6 Suppl 1), S20–S70. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.013>
- Pati, N. B., Doijad, S. P., Schultze, T., Mannala, G. K., Yao, Y., Jaiswal, S., Ryan, D., Suar, M., Gwozdziński, K., Bunk, B., Mraheil, M. A., Marahiel, M. A., Hegemann, J. D., Spröer, C., Goesmann, A., Falgenhauer, L., Hain, T., Imirzalioglu, C., Mshana, S. E., Overmann, J., ... Chakraborty, T. (2018). *Enterobacter bugandensis*: a novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. *Scientific reports*, 8(1), 5392. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23069-z>
- Pavan, M. E., Franco, R. J., Rodriguez, J. M., Gadaleta, P., Abbott, S. L., Janda, J. M., & Zorzó pulos, J. (2005). Phylogenetic relationships of the genus *Kluyvera*: transfer of *Enterobacter intermedius* Izard et al. 1980 to the genus *Kluyvera* as *Kluyvera intermedia* comb. nov. and reclassification of *Kluyvera cochleae* as a later synonym of *K. intermedia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(Pt 1), 437–442. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63071-0>
- Pavlovic, M., Konrad, R., Iwobi, A. N., Sing, A., Busch, U., & Huber, I. (2012). A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the

- Enterobacter cloacae* complex. FEMS microbiology letters, 328(1), 46–53.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02479.x>
- Peirano, G., Matsumura, Y., Adams, M. D., Bradford, P., Motyl, M., Chen, L., Kreiswirth, B. N., & Pitout, J. (2018). Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp., 2008-2014. Emerging infectious diseases, 24(6), 1010–1019.
<https://doi.org/10.3201/eid2406.171648>
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert review of anti-infective therapy, 11(3), 297–308.
<https://doi.org/10.1586/eri.13.12>
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., & Castro-Nallar, E. (2018). Microbial sequence typing in the genomic era. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 63, 346–359.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.022>
- Pérez, A., Poza, M., Fernández, A., Fernández, M., Mallo, S., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Cabral, M. P., & Bou, G. (2012). Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 56(4), 2084–2090. <https://doi.org/10.1128/AAC.05509-11>
- Petit, A., Gerbaud, G., Sirot, D., Courvalin, P., & Sirot, J. (1990). Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) β -lactamase. Antimicrobial agents and chemotherapy, 34(2), 219–224.
<https://doi.org/10.1128/AAC.34.2.219>
- Peymani, A., Farivar, T. N., Sanikhani, R., Javadi, A., & Najafipour, R. (2014). Emergence of TEM, SHV, and CTX-M-extended spectrum β -lactamases and class 1 integron among *Enterobacter cloacae* isolates collected from hospitals of Tehran and Qazvin, Iran. Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.), 20(5), 424–430.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0191>
- Pham, H. N., Ohkusu, K., Mishima, N., Noda, M., Monir Shah, M., Sun, X., Hayashi, M., & Ezaki, T. (2007). Phylogeny and species identification of the family *Enterobacteriaceae* based on *dnaJ* sequences. Diagnostic microbiology and infectious disease, 58(2), 153–161.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.019>

- Pinet, E., Franceschi, C., Collin, V., Davin-Regli, A., Zambardi, G., & Pagès, J. M. (2020). A simple phenotypic test for detecting the contribution of outer membrane permeability to carbapenem resistance. *Journal of medical microbiology*, 69(1), 63–71. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001129>
- Popescu, C. R., Cavanagh, M., Tembo, B., Chiume, M., Lufesi, N., Goldfarb, D. M., Kisson, N., & Lavoie, P. M. (2020). Neonatal sepsis in low-income countries: epidemiology, diagnosis and prevention. *Expert review of anti-infective therapy*, 18(5), 443–452. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1732818>
- Potron, A., Poirel, L., Rondinaud, E., & Nordmann, P. (2013). Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(31), 20549. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.31.20549>
- Procianoy, R. S., & Silveira, R. C. (2020). The challenges of neonatal sepsis management. *Jornal de pediatria*, 96 Suppl 1, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2019.10.004>
- Punia, H., Gathwala, G., Dhawalakhandi, D. B., & Aamir, M. (2017). Diagnosis of neonatal sepsis using 16S rRNA polymerase chain reaction. *Tropical doctor*, 47(4), 336–339. <https://doi.org/10.1177/0049475517701875>
- Puopolo, K. M., Lynfield, R., Cummings, J. J., COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, & COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES (2019). Management of Infants at Risk for Group B Streptococcal Disease. *Pediatrics*, 144(2), e20191881. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-1881>
- Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*, 71, 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S., & Bishop, R. E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual review of biochemistry*, 76, 295–329. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803>

- Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S., & Bishop, R. E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual review of biochemistry*, 76, 295–329. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803>
- Ramsamy, Y., Essack, S. Y., Sartorius, B., Patel, M., & Mlisana, K. P. (2018). Antibiotic resistance trends of ESKAPE pathogens in Kwazulu-Natal, South Africa: A five-year retrospective analysis. *African journal of laboratory medicine*, 7(2), 887. <https://doi.org/10.4102/ajlm.v7i2.887>
- Remya, P. A., Shanthi, M., & Sekar, U. (2019). Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae*. *Indian journal of medical microbiology*, 37(2), 210–218. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_19_157
- Ren, Y., Ren, Y., Zhou, Z., Guo, X., Li, Y., Feng, L., & Wang, L. (2010). Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* type strain ATCC 13047. *Journal of bacteriology*, 192(9), 2463–2464. <https://doi.org/10.1128/JB.00067-10>
- Reprod (Paris), vol. 39, no 7, p. 554-559, nov. 2010.
- Reynolds, C. M., Ribeiro, A. A., McGrath, S. C., Cotter, R. J., Raetz, C., & Trent, M. S. (2006). An outer membrane enzyme encoded by *Salmonella typhimurium* *lpxR* that removes the 3'-acyloxyacyl moiety of lipid A. *The Journal of biological chemistry*, 281(31), 21974–21987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603527200>
- Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19126–19131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., & Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* (Oxford, England), 32(6), 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
- Ristuccia, P. A., & Cunha, B. A. (1985). *Enterobacter*. *Infection control: IC*, 6(3), 124–128. <https://doi.org/10.1017/s0195941700062810>
- Robert, J., Pantel, A., Mérens, A., Lavigne, J. P., Nicolas-Chanoine, M. H., & ONERBA's Carbapenem Resistance Study Group (2014). Incidence rates of carbapenemase-

- producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 69(10), 2706–2712. <https://doi.org/10.1093/jac/dku208>
- Robin, F., Auzou, M., Bonnet, R., Lebreuilly, R., Isnard, C., Cattoir, V., & Guérin, F. (2018). In Vitro Activity of Ceftolozane-Tazobactam against *Enterobacter cloacae* Complex Clinical Isolates with Different β -Lactam Resistance Phenotypes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(9), e00675-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00675-18>
- Rodríguez-Baño, J., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Machuca, I., & Pascual, A. (2018). Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical microbiology reviews*, 31(2), e00079-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-17>
- Roncero, C., & Casadaban, M. J. (1992). Genetic analysis of the genes involved in synthesis of the lipopolysaccharide core in *Escherichia coli* K-12: three operons in the *rfa* locus. *Journal of bacteriology*, 174(10), 3250–3260. <https://doi.org/10.1128/jb.174.10.3250-3260.1992>
- Roppel, J., & Mayer, H. (1975). Identification of a 2, 3-diamino-2, 3-dideoxyhexose in the lipid A component of lipopolysaccharides of *Rhodopseudomonas viridis* and *Rhodopseudomonas palustris*. *Carbohydrate research*, 40(1), 31–40. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)82666-x](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)82666-x)
- Russell J. P. (1969). Antibiotic sensitivity of *Klebsiella-Enterobacter*. *American journal of clinical pathology*, 51(3), 384–389. <https://doi.org/10.1093/ajcp/51.3.384>
- Rutanga, J. P., Van Puyvelde, S., Heroes, A. S., Muvunyi, C. M., Jacobs, J., & Deborggraeve, S. (2018). 16S metagenomics for diagnosis of bloodstream infections: opportunities and pitfalls. *Expert review of molecular diagnostics*, 18(8), 749–759. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1498786>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

- Sampaio, J. L., Ribeiro, V. B., Campos, J. C., Rozales, F. P., Magagnin, C. M., Falci, D. R., da Silva, R. C., Dalarosa, M. G., Luz, D. I., Vieira, F. J., Antochewis, L. C., Barth, A. L., & Zavascki, A. P. (2014). Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(6), 3566–3567. <https://doi.org/10.1128/AAC.02510-13>
- Sanders, W. E., Jr, & Sanders, C. C. (1997). *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical microbiology reviews*, 10(2), 220–241. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.2.220>
- Schnaitman, C. A., & Klena, J. D. (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiological reviews*, 57(3), 655–682. <https://doi.org/10.1128/mr.57.3.655-682.1993>
- Schrag, S., & Schuchat, A. (2005). Prevention of neonatal sepsis. *Clinics in perinatology*, 32(3), 601–615. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2005.05.005>
- Schwarz, C. E., & Dempsey, E. M. (2020). Management of Neonatal Hypotension and Shock. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 25(5), 101121. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2020.101121>
- Shane, A. L., Sánchez, P. J., & Stoll, B. J. (2017). Neonatal sepsis. *Lancet (London, England)*, 390(10104), 1770–1780. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31002-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31002-4)
- Shen, Y., Xiao, W. Q., Gong, J. M., Pan, J., & Xu, Q. X. (2017). Detection of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (Encoded by blaNDM-1) in *Enterobacter aerogenes* in China. *Journal of clinical laboratory analysis*, 31(2), e22044. <https://doi.org/10.1002/jcla.22044>
- Shmara, A., Weinsetel, N., Dery, K. J., Chavideh, R., & Tolmasky, M. E. (2001). Systematic analysis of a conserved region of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(12), 3287–3292. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3287-3292.2001>
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>

- Simonsen, K. A., Anderson-Berry, A. L., Delair, S. F., & Davies, H. D. (2014). Early-onset neonatal sepsis. *Clinical microbiology reviews*, 27(1), 21–47. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-13>
- Simpson, B. W., & Trent, M. S. (2019). Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nature reviews. Microbiology*, 17(7), 403–416. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0201-x>
- Sladowski, D., Kinsner, A., Langezaal, I., Kay, S., & Coecke, S. (2001). Activation of the complement system as an indicator of pyrogenic reaction to lipopolysaccharide (LPS). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 15(4-5), 339–342. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(01\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(01)00031-5)
- Soncini, F. C., García Vescovi, E., Solomon, F., & Groisman, E. A. (1996). Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *Journal of bacteriology*, 178(17), 5092–5099. <https://doi.org/10.1128/jb.178.17.5092-5099.1996>
- Soria-Bustos, J., Ares, M. A., Gómez-Aldapa, C. A., González-Y-Merchand, J. A., Girón, J. A., & De la Cruz, M. A. (2020). Two Type VI Secretion Systems of *Enterobacter cloacae* Are Required for Bacterial Competition, Cell Adherence, and Intestinal Colonization. *Frontiers in microbiology*, 11, 560488. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.560488>
- Souna, D., Amir, A. S., Bekhoucha, S. N., Berrazeg, M., & Drissi, M. (2014). Molecular typing and characterization of TEM, SHV, CTX-M, and CMY-2 β -lactamases in *Enterobacter cloacae* strains isolated in patients and their hospital environment in the west of Algeria. *Medicine et maladies infectieuses*, 44(4), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.01.008>
- Spaetgens, R., DeBella, K., Ma, D., Robertson, S., Mucenski, M., & Davies, H. D. (2002). Perinatal antibiotic usage and changes in colonization and resistance rates of group B streptococcus and other pathogens. *Obstetrics and gynecology*, 100(3), 525–533. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(02\)02068-9](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(02)02068-9)

- Springer, E. L., & Roth, I. L. (1973). Ultrastructure of the capsule of *Klebsiella pneumoniae* and slime of *Enterobacter aerogenes* revealed by freeze etching. *Archiv fur Mikrobiologie*, 93(4), 277–286. <https://doi.org/10.1007/BF00427925>
- Steimle, A., Autenrieth, I. B., & Frick, J. S. (2016). Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 306(5), 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.03.001>
- Stewart, A. G., Paterson, D. L., Young, B., Lye, D. C., Davis, J. S., Schneider, K., Yilmaz, M., Dinleyici, R., Runnegar, N., Henderson, A., Archuleta, S., Kalimuddin, S., Forde, B. M., Chatfield, M. D., Bauer, M. J., Lipman, J., Harris-Brown, T., Harris, P., & MERINO Trial Investigators and the Australasian Society for Infectious Disease Clinical Research Network (ASID-CRN) (2021). Meropenem Versus Piperacillin-Tazobactam for Definitive Treatment of Bloodstream Infections Caused by AmpC β -Lactamase-Producing *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp, or *Serratia marcescens*: A Pilot Multicenter Randomized Controlled Trial (MERINO-2). *Open forum infectious diseases*, 8(8), ofab387. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab387>
- Stoesser, N., Sheppard, A. E., Shakya, M., Sthapit, B., Thorson, S., Giess, A., Kelly, D., Pollard, A. J., Peto, T. E., Walker, A. S., & Crook, D. W. (2015). Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 70(4), 1008–1015. <https://doi.org/10.1093/jac/dku521>
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Sánchez, P. J., Faix, R. G., Poindexter, B. B., Van Meurs, K. P., Bizzarro, M. J., Goldberg, R. N., Frantz, I. D., 3rd, Hale, E. C., Shankaran, S., Kennedy, K., Carlo, W. A., Watterberg, K. L., Bell, E. F., Walsh, M. C., Schibler, K., Lupton, A. R., Shane, A. L., Schrag, S. J., ... Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network (2011). Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*, 127(5), 817–826. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-2217>
- Sutton, G. G., Brinkac, L. M., Clarke, T. H., & Fouts, D. E. (2018). *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov.,

Enterobacter roggenkampii sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis of sequenced *Enterobacter* genomes. F1000Research, 7, 521. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14566.2>

Szél, B., Reiger, Z., Urbán, E., Lázár, A., Mader, K., Damjanova, I., Nagy, K., & Tálosi, G. (2017). Successful elimination of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial bacteria at a neonatal intensive care unit. World journal of pediatrics: WJP, 13(3), 210–216. <https://doi.org/10.1007/s12519-016-0069-z>

Talon, D., Menget, P., Thouverez, M., Thiriez, G., Gbaguidi Haore, H., Fromentin, C., Muller, A., & Bertrand, X. (2004). Emergence of *Enterobacter cloacae* as a common pathogen in neonatal units: pulsed-field gel electrophoresis analysis. The Journal of hospital infection, 57(2), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.01.023>

Tamma, P. D., Doi, Y., Bonomo, R. A., Johnson, J. K., Simner, P. J., & Antibacterial Resistance Leadership Group (2019). A Primer on AmpC β -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 69(8), 1446–1455. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz173>

Tamma, P. D., Girdwood, S. C., Gopaul, R., Tekle, T., Roberts, A. A., Harris, A. D., Cosgrove, S. E., & Carroll, K. C. (2013). The use of cefepime for treating AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 57(6), 781–788. <https://doi.org/10.1093/cid/cit395>

Tan, S. H., Ng, T. M., Chew, K. L., Yong, J., Wu, J. E., Yap, M. Y., Heng, S. T., Ng, W., Wan, S., Cheok, S., Tambyah, P. A., & Lye, D. C. (2020). Outcomes of treating AmpC-producing Enterobacterales bacteraemia with carbapenems vs. non-carbapenems. International journal of antimicrobial agents, 55(2), 105860. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.105860>

Tanamoto, K., Zähringer, U., McKenzie, G. R., Galanos, C., Rietschel, E. T., Lüderitz, O., Kusumoto, S., & Shiba, T. (1984). Biological activities of synthetic lipid A analogs: pyrogenicity, lethal toxicity, anticomplement activity, and induction of gelation of

- Limulus amoebocyte lysate. *Infection and immunity*, 44(2), 421–426. <https://doi.org/10.1128/iai.44.2.421-426.1984>
- Tato-Rodríguez, R., Oteo-Iglesias, J., Álvarez-García, P., Zamora-López, M. J., Martínez-López, J., Pallarés-González, Á., Pulián-Morais, M. V., Fernández-Romero, S., Vindel-Hernando, A., & García-Campello, M. (2016). Brote de *Enterobacter cloacae* complex multirresistente productor de CTX-M-9 en una unidad de cuidados intensivos [Outbreak of multidrug-resistant CTX-M-9-producing *Enterobacter cloacae* complex in an intensive care unit]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 34(4), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.05.009>
- Telke, A. A., Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2017). soxRS induces colistin hetero-resistance in *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter cloacae* by regulating the acrAB-tolC efflux pump. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(10), 2715–2721. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx215>
- Tetsuka, N., Hirabayashi, A., Matsumoto, A., Oka, K., Hara, Y., Morioka, H., Iguchi, M., Tomita, Y., Suzuki, M., Shibayama, K., & Yagi, T. (2019). Molecular epidemiological analysis and risk factors for acquisition of carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* complex in a Japanese university hospital. *Antimicrobial resistance and infection control*, 8, 126. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0578-3>
- Thomson, G. K., Snyder, J. W., McElheny, C. L., Thomson, K. S., & Doi, Y. (2016). Coproduction of KPC-18 and VIM-1 Carbapenemases by *Enterobacter cloacae*: Implications for Newer β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Journal of clinical microbiology*, 54(3), 791–794. <https://doi.org/10.1128/JCM.02739-15>
- Tidjani Alou, M., Cadoret, F., Brah, S., Diallo, A., Sokhna, C., Mehrej, V., Lagier, J. C., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2017). '*Khelaifiella massiliensis*', '*Niameybacter massiliensis*', '*Brachybacterium massiliense*', '*Enterobacter timonensis*', '*Massilibacillus massiliensis*', new bacterial species and genera isolated from the gut microbiota of healthy infants. *New microbes and new infections*, 19, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.02.002>
- Tindall B. J. (2014). The combination *Enterobacter agglomerans* is to be cited as *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 and the combination *Pantoea*

- agglomerans is to be cited as *Pantoea agglomerans* (Beijerinck 1888) Gavini *et al.* 1989. Opinion 90. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 10), 3582–3583. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.069161-0>
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(Pt 1), 249–266. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
- Tindall, B. J., Sutton, G., & Garrity, G. M. (2017). *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(2), 502–504. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001572>
- Tirone, C., Pezza, L., Paladini, A., Tana, M., Aurilia, C., Lio, A., D'Ippolito, S., Tersigni, C., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Di Simone, N., & Vento, G. (2019). Gut and Lung Microbiota in Preterm Infants: Immunological Modulation and Implication in Neonatal Outcomes. *Frontiers in immunology*, 10, 2910. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02910>
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, 431(18), 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Tresoldi, A. T., Padoveze, M. C., Trabasso, P., Veiga, J. F., Marba, S. T., von Nowakonski, A., & Branchini, M. L. (2000). *Enterobacter cloacae* sepsis outbreak in a newborn unit caused by contaminated total parenteral nutrition solution. *American journal of infection control*, 28(3), 258–261. <https://doi.org/10.1067/mic.2000.105286>
- Tükel, C., Akçelik, M., de Jong, M. F., Simsek, O., Tsolis, R. M., & Bäumlner, A. J. (2007). MarT activates expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica*

- serotype Typhimurium. *Journal of bacteriology*, 189(10), 3922–3926.
<https://doi.org/10.1128/JB.01746-06>
- Tzialla, C., Manzoni, P., Achille, C., Bollani, L., Stronati, M., & Borghesi, A. (2018). New Diagnostic Possibilities for Neonatal Sepsis. *American journal of perinatology*, 35(6), 575–577.
<https://doi.org/10.1055/s-0038-1639361>
- Uchida-Fujii, E., Niwa, H., Kinoshita, Y., Katayama, Y., & Nukada, T. (2020). Molecular phylogenetic and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identification of isolates from horses identified as *Enterobacter cloacae* by biochemical identification. *Journal of equine science*, 31(3), 49–55.
<https://doi.org/10.1294/jes.31.49>
- Umeda, K., Nakamura, H., Fukuda, A., Matsumoto, Y., Motooka, D., Nakamura, S., Yasui, Y., Yoshida, H., & Kawahara, R. (2021). Genomic characterization of clinical *Enterobacter roggenkampii* co-harboring *bla*_{IMP-1} and *bla*_{GES-5} encoding IncP6 and *mcr-9*-encoding IncHI2 plasmids isolated in Japan. *Journal of global antimicrobial resistance*, 24, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.11.028>
- Ur Rahman, S., Ali, T., Ali, I., Khan, N. A., Han, B., & Gao, J. (2018). The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *BioMed research international*, 2018, 9519718. <https://doi.org/10.1155/2018/9519718>
- van den Berg, R. W., Claahsen, H. L., Niessen, M., Muijtjens, H. L., Liem, K., & Voss, A. (2000). *Enterobacter cloacae* outbreak in the NICU related to disinfected thermometers. *The Journal of hospital infection*, 45(1), 29–34. <https://doi.org/10.1053/jhin.1999.0657>
- Vilches, T. N., Bonesso, M. F., Guerra, H. M., Fortaleza, C., Park, A. W., & Ferreira, C. P. (2019). The role of intra and inter-hospital patient transfer in the dissemination of healthcare-associated multidrug-resistant pathogens. *Epidemics*, 26, 104–115.
<https://doi.org/10.1016/j.epidem.2018.11.001>
- Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K., & EPIC II Group of Investigators (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 302(21), 2323–2329. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>

- Vincent, J. L., Sakr, Y., Singer, M., Martin-Loeches, I., Machado, F. R., Marshall, J. C., Finfer, S., Pelosi, P., Brazzi, L., Aditianingsih, D., Timsit, J. F., Du, B., Wittebole, X., Máca, J., Kannan, S., Gorordo-Delsol, L. A., De Waele, J. J., Mehta, Y., Bonten, M., Khanna, A. K., ... EPIC III Investigators (2020). Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA*, 323(15), 1478–1487. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2717>
- Vinogradov, E. V., Müller-Loennies, S., Petersen, B. O., Meshkov, S., Thomas-Oates, J. E., Holst, O., & Brade, H. (1997). Structural investigation of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter haemolyticus* strain NCTC 10305 (ATCC 17906, DNA group 4). *European journal of biochemistry*, 247(1), 82–90. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00082.x>
- Vrancianu, C. O., Gheorghe, I., Dobre, E. G., Barbu, I. C., Cristian, R. E., Popa, M., Lee, S. H., Limban, C., Vlad, I. M., & Chifiriuc, M. C. (2020). Emerging Strategies to Combat β -Lactamase Producing ESKAPE Pathogens. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8527. <https://doi.org/10.3390/ijms21228527>
- Wagner, L., Bloos, F., & Vylkova, S. (2020). Bloodstream infection due to *Enterobacter ludwigii*, correlating with massive aggregation on the surface of a central venous catheter. *Infection*, 48(6), 955–958. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01482-9>
- Wang, C. C., Chu, M. L., Ho, L. J., & Hwang, R. C. (1991). Analysis of plasmid pattern in paediatric intensive care unit outbreaks of nosocomial infection due to *Enterobacter cloacae*. *The Journal of hospital infection*, 19(1), 33–40. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(91\)90126-s](https://doi.org/10.1016/0195-6701(91)90126-s)
- Wang, C., Yin, M., Zhang, X., Guo, Q., & Wang, M. (2021). Identification of *qnrE3* and *qnrE4*, New Transferable Quinolone Resistance *qnrE* Family Genes Originating from *Enterobacter mori* and *Enterobacter asburiae*, respectively. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 65(8), e0045621. <https://doi.org/10.1128/AAC.00456-21>
- Wang, S. A., Tokars, J. I., Bianchine, P. J., Carson, L. A., Arduino, M. J., Smith, A. L., Hansen, N. C., Fitzgerald, E. A., Epstein, J. S., & Jarvis, W. R. (2000). *Enterobacter cloacae* bloodstream infections traced to contaminated human albumin. *Clinical infectious*

- diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 30(1), 35–40. <https://doi.org/10.1086/313585>
- Wang, X., & Quinn, P. J. (2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in lipid research*, 49(2), 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.06.002>
- Wang, Y. Q., Xiao, D., Li, J., Zhang, H. F., Fu, B. Q., Wang, X. L., Ai, X. M., Xiong, Y. W., Zhang, J. Z., & Ye, C. Y. (2018). Rapid Identification and Subtyping of *Enterobacter cloacae* Clinical Isolates Using Peptide Mass Fingerprinting. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 31(1), 48–56. <https://doi.org/10.3967/bes2018.005>
- Weiss, S. L., Peters, M. J., Alhazzani, W., Agus, M., Flori, H. R., Inwald, D. P., Nadel, S., Schlapbach, L. J., Tasker, R. C., Argent, A. C., Brierley, J., Carcillo, J., Carrol, E. D., Carroll, C. L., Cheifetz, I. M., Choong, K., Cies, J. J., Cruz, A. T., De Luca, D., Deep, A., ... Tissieres, P. (2020). Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children. *Intensive care medicine*, 46(Suppl 1), 10–67. <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05878-6>
- Wendel, A. F., Peter, D., Mattner, F., Weiss, M., Hoppenz, M., Wolf, S., Bader, B., Peter, S., & Liese, J. (2022). Surveillance of *Enterobacter cloacae* complex colonization and comparative analysis of different typing methods on a neonatal intensive care unit in Germany. *Antimicrobial resistance and infection control*, 11(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13756-022-01094-y>
- Westphal, O., Lüderitz, O., Rietschel, E. T., & Galanos, C. (1981). Bacterial lipopolysaccharide and its lipid A component: some historical and some current aspects. *Biochemical Society transactions*, 9(3), 191–195. <https://doi.org/10.1042/bst0090191>
- Whitfield, C., & Trent, M. S. (2014). Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annual review of biochemistry*, 83, 99–128. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035600>
- Whitfield, C., Amor, P. A., & Köplin, R. (1997). Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by

- determinants of polymer chain length. *Molecular microbiology*, 23(4), 629–638. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.2571614.x>
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 39(3), 309–317. <https://doi.org/10.1086/421946>
- Wu, W., Feng, Y., & Zong, Z. (2020). Precise Species Identification for *Enterobacter*: a Genome Sequence-Based Study with Reporting of Two Novel Species, *Enterobacter quasiroggenkampii* sp. nov. and *Enterobacter quasimori* sp. nov. *mSystems*, 5(4), e00527-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00527-20>
- Wu, W., Wei, L., Feng, Y., Xie, Y., & Zong, Z. (2021). Precise Species Identification by Whole-Genome Sequencing of *Enterobacter* Bloodstream Infection, China. *Emerging infectious diseases*, 27(1), 161–169. <https://doi.org/10.3201/eid2701.190154>
- Wynn, J. L., Wong, H. R., Shanley, T. P., Bizzarro, M. J., Saiman, L., & Polin, R. A. (2014). Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatric critical care medicine: a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*, 15(6), 523–528. <https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000000157>
- Xing, J., Li, X., Sun, Y., Zhao, J., Miao, S., Xiong, Q., Zhang, Y., & Zhang, G. (2019). Comparative genomic and functional analysis of *Akkermansia muciniphila* and closely related species. *Genes & genomics*, 41(11), 1253–1264. <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00855-1>
- Yeganeh Sefidan, F., Mohammadzadeh-Asl, Y., & Ghotaslou, R. (2019). High-Level Resistance to Aminoglycosides due to 16S rRNA Methylation in *Enterobacteriaceae* Isolates. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 25(9), 1261–1265. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0171>
- Yigit, H., Anderson, G. J., Biddle, J. W., Steward, C. D., Rasheed, J. K., Valera, L. L., McGowan, J. E., Jr, & Tenover, F. C. (2002). Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter*

aerogenes is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. Antimicrobial agents and chemotherapy, 46(12), 3817–3822. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3817-3822.2002>

- Yuan, S., Wu, G., & Zheng, B. (2019). Complete genome sequence of an IMP-8, CTX-M-14, CTX-M-3 and QnrS1 co-producing *Enterobacter asburiae* isolate from a patient with wound infection. Journal of global antimicrobial resistance, 18, 52–54. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.05.029>
- Zaher, A., & Cimolai, N. (1997). ERIC-PCR typing profiles of *Enterobacter cloacae* are stable after development of advanced cephalosporin resistance. International journal of antimicrobial agents, 9(3), 165–167. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(97\)00046-0](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(97)00046-0)
- Zhang, D., He, W., Tong, Q., Zhou, J., & Su, X. (2016). Multi-omics analysis on the pathogenicity of *Enterobacter cloacae* ENHKU01 isolated from sewage outfalls along the Ningbo coastline. Proteome science, 14, 15. <https://doi.org/10.1186/s12953-016-0104-y>
- Zhang, M., Zhang, Y., Han, X., Wang, J., Yang, Y., Ren, B., Xia, M., Li, G., Fang, R., He, H., & Jia, Y. (2021). Whole genome sequencing of *Enterobacter mori*, an emerging pathogen of kiwifruit and the potential genetic adaptation to pathogenic lifestyle. AMB Express, 11(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01290-w>
- Zhao, K., Jin, M., Chen, Q., & Zheng, P. S. (2015). Polysaccharides produced by *Enterobacter cloacae* induce apoptosis in cervical cancer cells. International journal of biological macromolecules, 72, 960–964. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.047>
- Zhou, K., Yu, W., Bonnet, R., Cattoir, V., Shen, P., Wang, B., Rossen, J. W., & Xiao, Y. (2017). Emergence of a novel *Enterobacter kobei* clone carrying chromosomal-encoded CTX-M-12 with diversified pathogenicity in northeast China. New microbes and new infections, 17, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.01.006>
- Zhou, K., Yu, W., Cao, X., Shen, P., Lu, H., Luo, Q., Rossen, J., & Xiao, Y. (2018). Characterization of the population structure, drug resistance mechanisms and plasmids of the community-associated *Enterobacter cloacae* complex in China. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 73(1), 66–76. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx361>

- Zhu, B., Lou, M. M., Xie, G. L., Wang, G. F., Zhou, Q., Wang, F., Fang, Y., Su, T., Li, B., & Duan, Y. P. (2011). *Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on *Morus alba* L. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 61(Pt 11), 2769–2774. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.028613-0>
- Zhu, X., Li, P., Qian, C., Liu, H., Lin, H., Zhang, X., Li, Q., Lu, J., Lin, X., Xu, T., Zhang, H., Hu, Y., Bao, Q., & Li, K. (2020). Prevalence of Aminoglycoside Resistance Genes and Molecular Characterization of a Novel Gene, *aac(3)-IIg*, among Clinical Isolates of the *Enterobacter cloacae* Complex from a Chinese Teaching Hospital. Antimicrobial agents and chemotherapy, 64(9), e00852-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00852-20>
- Zhuang, Z., Lv, L., Lu, J., Lin, J., & Liu, J. H. (2019). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* producing OXA-48 carbapenemases from retail meats in China, 2018. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 74(12), 3632–3634. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz394>
- Zong, Z., Feng, Y., & McNally, A. (2021). Carbapenem and Colistin Resistance in *Enterobacter*: Determinants and Clones. Trends in microbiology, 29(6), 473–476. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.12.009>
- Zorrilla-Vaca, C., & Zorrilla-Vaca, A. (2014). Endotoxin overproduction of *Enterobacter cloacae* and mortality rate. Infection control and hospital epidemiology, 35(5), 601. <https://doi.org/10.1086/675845>

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

PREMIER TRAVAIL

***Enterobacter bugandensis*, espèce émergente en réanimation néonatale**

RICAI 2020. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse. Paris, France 2020.

DEUXIÈME TRAVAIL

***Enterobacter cloacae* complex associated with neonatal sepsis, a retrospective multicenter study in France**

ECCMID 2021. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Autriche2021.

TROISIÈME TRAVAIL

Epidemiology and characterization of *Enterobacter* strains associated with neonatal nosocomial sepsis

Emergence of plasmid-mediated AmpC genes in *Enterobacter cloacae* complex strains from a sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit

MICROBE 2021. Congrès National de la Société Française de Microbiologie. Nantes, France 2021.

QUATRIÈME TRAVAIL

***dnaJ*: a new approach to identifying species within the genus *Enterobacter* in the clinical practice**

RICAI 2021. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse. Paris, France 2021.

CINQUIÈME TRAVAIL

Antimicrobial epidemiology of *Enterobacter* spp., from bloodstream infections in Neonatal Intensive Care Units

ECCMID 2022. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Lisbon, Portugal 2022.

SIXIÈME TRAVAIL

Investigation of an *Enterobacter* Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit

Antimicrobial Resistance of Enterobacter Strains Responsible for Healthcare Associated Neonatal Sepsis

ASM Microbe 2022. American Society of Microbiology. Washognton, DC États-Unis d'Amérique 2022.