TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS 11

TABLE DES ILLUSTRATIONS 12

TABLE DES TABLEAUX 13

INTRODUCTION 14

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 15

1. *ACINETOBACTER* SPP. 15

1.1. Le genre Acinetobacter : caractéristiques et identification 15

1.2. Epidémiologie d'A. baumannii 17

1.2.1. Infections hospitalières à *A. baumannii* 18

1.2.2. Infections communautaires à *A. baumannii* 19

1.3. Réservoir extra-hospitalier d'A. baumannii 20

1.3.1. Portage humain 20

1.3.2. Réservoir environnemental 21

1.3.3. Réservoir animal 21

1.4. A. baumannii et résistance aux antibiotiques 23

1.5. Typage épidémiologique d'A. baumannii 25

2. ENTÉROBACTÉRIES MULTI-RÉSISTANTES 27

2.1. La famille des entérobactéries : caractéristiques et classification 27

2.2. Entérobactéries multi-résistantes et résistance aux β-lactamines 29

2.3. Epidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE 31

2.3.1. Infections hospitalières 31

2.3.2. Infections communautaires 32

2.4. Réservoir extra-hospitalier des entérobactéries productrices de BLSE 32

2.4.1. Portage humain 32

2.4.2. Réservoir environnemental 33

2.4.3. Réservoir animal 34

a) Entérobactéries et production animale 34

b) Entérobactéries et chaîne alimentaire 35

c) Entérobactéries et animaux domestiques 36

MATERIEL ET METHODES 39

1. COLLECTE DES PRÉLÈVEMENTS 39

2. TRAITEMENT DES ÉCOUVILLONS ET ENSEMENCEMENT DES PRÉLÈVEMENTS 40

3. IDENTIFICATION BACTÉRIENNE 41

3.1. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....42

3.2. Identification par séquençage du gène rpoB pour les souches identifiées comme Acinetobacter par MALDI-TOF MS 43

3.3. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques 44

3.3.1. Cas d'*A. baumannii* et des autres *Acinetobacter* 44

3.3.2. Cas des entérobactéries productrices de BLSE 45

4. ETUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DES SOUCHES D'*A. BAUMANNII* 46

4.1. Typage par Multilocus Sequence Typing selon le schéma de l'Institut Pasteur (MLST^P).....46

4.2. Typage par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) 47

RESULTATS..... 49

1. PRÉLÈVEMENTS DES ANIMAUX 49

2. RECHERCHE D'*ACINETOBACTER* 49

2.1. Caractéristiques des animaux porteurs d'A. baumannii 51

2.2. Sensibilité aux antibiotiques des A. baumannii.....53

2.3. Typage des souches d'A. baumannii 55

2.4. Caractéristiques des animaux porteurs d'Acinetobacter spp. 56

2.5. Sensibilité aux antibiotiques des souches d'Acinetobacter autres qu'A. baumannii 59

3. ENTÉROBACTÉRIES MULTI-RÉSISTANTES 61

DISCUSSION 65

CONCLUSION..... 72

BIBLIOGRAPHIE 74

LISTE DES ABREVIATIONS

A. baumannii: *Acinetobacter baumannii*

Acb: Complexe « *Acinetobacter calcoaceticus – Acinetobacter baumannii* »

ADN: Acide désoxyribo-nucléique

BHR: Bactérie hautement résistante

BlastN: Basic local alignment search tool nucleotidic

BLSE: Bêta-lactamases à spectre étendu

BMR: Bactérie multi-résistante

C3G: Céphalosporine(s) de troisième génération

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

CHN: Céphalosporinases de haut niveau

CMI: Concentration minimale inhibitrice

IVD: In vitro diagnosis

MALDI-TOF MS: Spectrométrie de masse par matrix assisted-laser desorption ionization time-of-flight

MH: Muëller-Hinton

MLST^{P}: Multilocus sequence typing selon Pasteur

NDM: New Dehli metallo-β-lactamase

PAVM: Pneumonie acquise sous ventilation mécanique

pb: Paires de bases

PCR: Poly chain reaction

PFGE: Electrophorèse en champ pulsé (Pulsed-field gel electrophoresis)

PLP: Protéine de liaison à la pénicilline

rep-PCR: Repetitive-sequenced-based-PCR

RAISIN: Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales

RUO: Research use only

SARAMIS^{TM}: Spectral archive and microbial identification system

ST: Sequence type

UPGMA: Unweighted pair-group method with arithmetic averages

USI: Unité de soins intensifs

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1. Cultures d'*A. baumannii* (Souche de l'animal n°4).

FIGURE 2. Antibiogrammes des deux souches *d'A. baumannii* résistantes à l'imipénème.

FIGURE 3. Electrophorèse en champ pulsé des deux souches d'*A. baumannii* résistantes à l'imipénème et ayant le même séquence type.

FIGURE 4. Espèces animales porteuses d'*Acinetobacter* spp.

FIGURE 5. Test combiné des disques mettant en évidence une entérobactérie BLSE ou CHN.

FIGURE 6. Répartition des espèces d'entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre étendu et de céphalosporinases de haut niveau chez les animaux prélevés.

FIGURE 7. Structure schématisée d'un spectromètre de masse de type MALDI TOF (référence bioMérieux).

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU I. Espèces appartenant au genre *Acinetobacter*, actuellement décrites.

TABLEAU II. Classification des entérobactéries selon leurs résistances naturelles aux différentes familles de β-lactamines.

TABLEAU III. Phénotypes de résistance acquise aux pénicillines et aux céphalosporines en fonction du niveau d'expression des β-lactamases.

TABLEAU IV. Caractéristiques des gènes et des amorces utilisées pour le typage par MLST selon le schéma de Pasteur.

TABLEAU V. Caractéristiques des 20 souches d'*Acinetobacter* spp. isolées à partir des 150 animaux étudiés.

TABLEAU VI. Informations collectées sur les quatre animaux porteurs d'*A. baumannii*.

TABLEAU VII. Sensibilité aux antibiotiques des quatre souches d'*A. baumannii* isolées chez les animaux étudiés.

TABLEAU VIII. Résultats du typage par MLST pour les quatre souches d'*A. baumannii* isolées chez les animaux étudiés.

TABLEAU IX. Informations collectées sur les 16 animaux porteurs d'*Acinetobacter* spp.

TABLEAU X. Sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Acinetobacter* spp. isolées des animaux porteurs.

TABLEAU XI. Entérobactéries multi-résistantes : identification bactérienne et susceptibilité aux antibiotiques.

INTRODUCTION

La détection, la surveillance et la diffusion de la résistance des bactéries aux antibiotiques sont devenues un enjeu majeur au niveau mondial, depuis la découverte et la diffusion de bactéries multi-résistantes (BMR), et plus récemment, de bactéries hautement résistantes (BHR). Parmi elles, les entérobactéries et *Acinetobacter baumannii* sont sur le devant de la scène.

L'origine et la source des gènes de résistance de par le monde sont mal connues. Des travaux récents suggèrent que les animaux domestiques et sauvages, l'environnement (rivières, sol …), mais aussi le tube digestif des mammifères et des hommes pourraient représenter un réservoir et une source importante de gènes de résistance, susceptibles d'être transmissibles à l'homme.

Des études préliminaires portant sur *A. baumannii* ont été réalisées dans l'équipe de recherche dans un but exploratoire chez des animaux de compagnie (chiens et chats) et chez du bétail vivant sur l'Ile de La Réunion, afin d'évaluer l'intérêt d'étudier un réservoir animal potentiel. Ce travail a été réalisé grâce à une collaboration avec les vétérinaires de l'Ile. Les premiers résultats ont montré une prévalence de la colonisation d'*A. baumannii* à 6,5%.

Les objectifs de ce présent projet visent à explorer le taux de portage d'*A. baumannii*, mais également d'entérobactéries multi-résistantes, chez des animaux domestiques vus en consultation à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ONIRIS), afin d'évaluer ce réservoir animal potentiel.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Acinetobacter* spp.

1.1. Le genre *Acinetobacter* : caractéristiques et identification

Le genre *Acinetobacter* a subi des modifications taxonomiques significatives depuis ces dix dernières années et comprend actuellement 41 espèces distinctes avec des noms publiés et validés (**Tableau I**). Ce genre appartient à l'ordre des *Gammaproteobacteria* et à la famille des *Moraxellaceae*. L'espèce la plus représentative est *A. baumannii*, un pathogène opportuniste appartenant au complexe « *Acinetobacter calcoaceticus – Acinetobacter baumannii* » (Acb). Ce complexe contient deux autres espèces cliniquement pertinentes, *A. nosocomialis* et *A. pittii*, ainsi que *A. calcoaceticus*, une espèce environnementale.

TABLEAU I. Espèces appartenant au genre *Acinetobacter*, actuellement décrites. (www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html)

Espèce bactérienne	Source(s) d'isolement	Auteurs
A. apis	Animal: abeille	Kim *et al.*
A. baumannii	NR	Bouvet et Grimont
A. baylyi	Environnement: boue	Carr *et al.*
A. beijerinckii	Homme	Nemec *et al.*
A. bereziniae	NR	Nemec *et al.*
A. bohemicus	Environnement: sol et eau	Krizova *et al*.
A. boissieri	Environnement: plante	Alvarez-Pérez *et al.*
A. bouvetii	Environnement: boue	Carr *et al.*
A. brisouii	Environnement: marais	Anandham *et al.*
A. calcoaceticus	NR	Baumann *et al.*
A. gandensis	Animaux: chevaux et bétail	Smet *et al.*

Rapport-Gratuit.com

A. gerneri	Environnement: boue	Carr *et al*.
A. grimontii	Environnement: boue	Carr *et al.*
A. guangdongensis	Environnement: mine abandonnée	Feng *et al.*
A. guillouiae	NR	Nemec *et al.*
A. gyllenbergii	Homme	Nemec *et al.*
A. haemolyticus	NR	Bouvet et Grimont
A. harbinensis	Environnement: rivière	Li *et al.*
A. indicus	Environnement: décharges	Malhotra *et al.*
A. johnsonii	NR	Bouvet et Grimont
A. junii	NR	Bouvet et Grimont
A. kookii	Environnement: sol	Choi *et al.*
A. lwoffii	NR	Brisou et Prévot
A. nectaris	Environnement: plante	Alvarez-Pérez *et al.*
A. nosocomialis	NR	Nemec *et al.*
A. pakistanensis	Environnement: industrie	Abbas *et al.*
A. parvus	Homme: échantillon clinique	Nemec *et al.*
A. pittii	NR	Nemec *et al.*
A. puyangensis	Environnement: plante	Li *et al.*
A. qingfengensis	Environement: plante pathogène	Li *et al.*
A. radioresistens	Environnement: coton et sol	Nishimura *et al.*
A. rudis	Environement: eaux usées et lait cru	Vaz-Moreira *et al.*
A. schindleri	Homme: échantillon clinique	Nemec *et al.*
A. seifertii	Homme: échantillon clinique	Nemec *et al.*
A. soli	Environement: sol	Kim *et al.*
A. tandoii	Environment: boue	Carr *et al.*
A. tjernbergiae	Environement: boue	Carr *et al.*
A. towneri	Environement: boue	Carr *et al.*
A. ursingii	Homme: échantillon clinique	Nemec *et al.*
A. variabilis	Homme/Animal	Krizova *et al.*
A. venetianus	NR	Vaneechoutte *et al.*

NR: non renseigné

Les *Acinetobacter* sont des bactéries Gram négatif ubiquitaires, aérobies strictes, non exigeantes, non mobiles, ne fermentant pas les sucres, à catalase positive et à réaction d'oxidase négative. Le genre *Acinetobacter* possède un contenu en ADN G+C compris entre 39% et 47%. Les membres du genre présentent essentiellement une morphologie coccobacillaire lorsque l'observation est faite à partir de colonies présentes

sur gélose. Cependant, en milieu liquide, la forme bacillaire est la plus fréquemment observée, en particulier dans les premières phases de croissance. Ainsi, la morphologie des *Acinetobacter* spp. peut être assez variable dans les échantillons cliniques.

Les tests phénotypiques utilisés dans les laboratoires de diagnostic (Vitek®2, galeries API) ne sont pas capables d'identifier avec certitude au rang d'espèce les bactéries appartenant au genre *Acinetobacter*. Cette observation est particulièrement vérifiée lors de l'identification des espèces appartenant au complexe Acb. Récemment, la spectrométrie de masse matrix assisted-laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF MS) a été établie avec succès pour l'identification rapide des bactéries dans les laboratoires de microbiologie clinique. Cette technique est basée sur la détermination exacte de la masse de petites protéines par mesure du ratio masse/charge des analytes. Les résultats sont affichés sous la forme d'un spectre de masse qui est caractéristique de chaque espèce. Cependant, en-dehors du fait que l'identification a été améliorée pour beaucoup d'espèces bactériennes à l'aide du MALDI-TOF MS, des erreurs persistent avec cette technique, et notamment lorsqu'il s'agit d'identifier les *Acinetobacter.* Ainsi, les outils de biologie moléculaire sont de loin le meilleur moyen de dépasser les limites que présentent les identifications phénotypiques à déterminer les espèces d'*Acinetobacter*. Concernant l'identification d'*A. baumannii*, une des méthodes de référence est la détection du gène $bla_{\text{oxa-51-like}}$ par PCR temps réel (Turton *et al.,* 2006). Ce gène code pour une oxacillinase qui est chromosomique, intrinsèque et spécifique à l'espèce *A. baumannii*. Pour identifier les autres espèces du genre *Acinetobacter*, la méthode la plus efficace est le séquençage partiel du gène *rpo*B, développé par Gundi *et al*. (Gundi *et al.,* 2009). Le séquençage s'intéresse plus précisément à une zone hypervariable de 350 pb au sein du gène *rpo*B.

1.2. Epidémiologie d'*A. baumannii*

A. baumannii est la bactérie la plus significative cliniquement, ce qui justifie que l'épidémiologie a été principalement focalisée sur cette espèce.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

1.2.1. Infections hospitalières à *A. baumannii*

A. baumannii est l'espèce la plus représentative du genre *Acinetobacter,* même si de plus en plus d'études relatent la présence d'*A. pittii* et d'*A. nosocomialis* dans les infections chez l'homme. Bien que dans les années 60 *A. baumannii* ait été considéré comme faiblement pathogène et était ignoré quand il était isolé de prélèvements cliniques, il est devenu l'un des pathogènes les plus importants, particulièrement dans les unités de soins intensifs (USI). *A. baumannii* est responsable de pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM), de bactériémies, d'infections de plaies ou encore de méningites (Joly-Guillou, 2005). Les patients infectés présentent dans la majorité des cas des facteurs de prédisposition tels que la présence d'un dispositif invasif, une augmentation du temps d'hospitalisation, un séjour en USI, une antibiothérapie à large spectre ou encore une immunosuppression (Fournier, Richet et Weinstein, 2006).

A. baumannii a été mis sur le devant de la scène en février 2010, lorsque le New York Times rapportait que « *Acinetobacter baumannii* … d'après quelques estimations est déjà en train de tuer des dizaines de milliers de patients hospitalisés chaque année. » Cette espèce bactérienne est le septième germe le plus communément isolé de patients lourdement malades (Beggs *et al.,* 2006). Elle est également reconnue comme l'un des pathogènes les plus menaçants d'après la Société Américaine des Maladies Infectieuses, avec une mortalité dans les PAVM pouvant atteindre les 75% (Fournier, Richet et Weinstein, 2006).

L'un des principaux intérêts portés à *A. baumannii* est sa remarquable capacité à acquérir et accumuler des gènes de résistance aux antibiotiques. Alors qu'encore récemment, les carbapénèmes étaient considérées comme le traitement de référence pour les souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G), des souches résistantes à ces antibiotiques ont émergé à travers le monde, certaines devenant même résistantes à tous les antibiotiques conventionnels. La première souche résistante à tous ces antibiotiques communément utilisés a été isolée en 2002 à Taïwan

(Hsueh *et al.,* 2002) et depuis, des souches restant uniquement sensibles à la colistine se sont répandues au sein des hôpitaux.

Finalement, une importante caractéristique d'*A. baumannii* est sa capacité à facilement disséminer dans l'environnement hospitalier. Cette bactérie est capable de survivre pendant de longues périodes dans un service hospitalier. Ainsi, lors d'épidémies, l'environnement des patients peut être aisément contaminé. La transmission de patient à patient se fait le plus souvent par manuportage, *via* le personnel soignant.

1.2.2. Infections communautaires à *A. baumannii*

Depuis une quinzaine d'années, une augmentation de la fréquence des infections communautaires à *A. baumannii* a été observée. Ces infections sont principalement des pneumonies et des infections de la peau et des tissus mous. La majorité des cas sont décrits en Asie du Sud Est et en Océanie. Une saisonnalité des infections a été observée, avec une augmentation des cas pendant les saisons chaudes et humides (Chen *et al.,* 2001). Concernant les pneumonies communautaires à *A. baumannii*, des facteurs de risque ont été décrits tels qu'une obstruction chronique des poumons ou un alcoolisme chronique. La pneumonie est caractérisée par une évolution fulminante, débutant sévèrement par une dyspnée, une toux et de la fièvre qui progressent rapidement vers une insuffisance respiratoire puis un choc. Malheureusement, le taux de mortalité semble supérieur à la mortalité globale (24%) et s'explique par un délai notable avant d'instaurer une antibiothérapie efficace (Leung *et al.,* 2006).

Des infections à *A. baumannii* ont également été observées dans les conflits armés (soldats US en Iraq et Afghanistan) (Scott *et al.,* 2007) ou chez les survivants de catastrophes naturelles comme les tremblements de terre ou les tsunamis (Sebeny, Riddle et Petersen, 2008). La présence de cette bactérie a été observée chez les blessés suite aux tremblements de terre en Turquie (Marmara 1999), au Pakistan ou encore en Chine (Wenchuan 2008), mais aussi suite au tsunami qui a touché l'Océan

Indien en 2004 (Öncül *et al.,* 2002 ; Zhang *et al.,* 2012). Par ailleurs, depuis 2003, l'incidence des infections à *A. baumannii* dans les hôpitaux militaires américains a augmenté, principalement parmi les troupes blessées ayant combattu en Asie du Sud Ouest. Les patients présentaient, pour la majorité, des infections de la peau et des tissus mous ainsi que des infections articulaires, osseuses ou des septicémies (Scott *et al.,* 2007). C'est en 2004 que la première souche multi-résistante a été identifiée en contexte extra-hospitalier. Elle a été isolée chez un soldat américain blessé au cours du conflit iraquien. Plus récemment, une souche produisant une carbapénémase de type New-Dehli metallo-bêta-lactamase (NDM-1) a été isolée chez un civil syrien blessé de guerre (Rafei *et al.,* 2014, b).

1.3. Réservoir extra-hospitalier d'*A. baumannii*

1.3.1. Portage humain

Les *Acinetobacter* font partie de la flore commensale de la peau humaine, et sont surtout retrouvés au niveau des aisselles et de l'aine. Toutefois, *A. baumannii*, agent pathogène le plus impliqué cliniquement, n'a été rapporté que rarement sur la peau, 0.5% à 3% selon les études (Berlau *et al.,* 1999, a ; Seifert *et al.*, 1997). Une étude a également montré la présence de la bactérie dans les selles de 0.9% des individus sains prélevés au Royaume-Uni et aux Pays-Bas (Dijkshoorn *et al.,* 2005). Néanmoins, cette situation est différente dans les régions à climat tropical. Ainsi, à Hong-Kong, *A. baumannii* est retrouvé sur la peau chez près de 4% des individus. Une autre étude réalisée au Sénégal a mis en évidence la présence de la bactérie dans 5.4% des selles humaines prélevées chez des individus sains dans des villages assez reculés (Kempf *et al.*, 2012, c). Enfin, une étude effectuée à New York a montré que près de 10% des résidents de la communauté portaient *A. baumannii* sur leurs mains (Zeana *et al.,* 2003).

1.3.2. Réservoir environnemental

Les espèces du genre *Acinetobacter* sont des bactéries ubiquitaires dont de nombreuses sources peuvent en être l'origine : les sols, l'eau, les produits destinés à la consommation, les environnements des eaux usées et l'environnement autour des hôpitaux (Alouache *et al.,* 2012 ; Berlau *et al.,* 1999, b). Il a été estimé que les espèces du genre *Acinetobacter* représentaient 0,001% de la flore aérobique hétérotrophique des sols et de l'eau (Towner, 2009). Concernant *A. baumannii*, peu de données sont disponibles sur son occurrence dans l'environnement. Mais quelques unes indiquent sa présence, avec des pourcentages variables, à la surface des légumes, du poisson, de la viande et des sols. *A. baumannii* a été retrouvé dans les sols contaminés par des hydrocarbures de pétrole dans des pays présentant des conditions climatiques variées tels qu'en Inde et en France. Cette bactérie a également été retrouvée dans les sites d'aquaculture de poissons et de crevettes en Asie du Sud Est (Berlau *et al.*, 1999, b). Il n'est pas encore clairement défini si ces observations sont attribuables à une niche environnementale ou un contact avec les hommes ou les animaux (Dijkshoorn, Nemec et Seifert, 2007). Dans une étude réalisée au Liban, la bactérie a été isolée d'un grand nombre de sources : dans 6,9% des échantillons d'eau, 2,7% des échantillons de lait, 8,0% des échantillons de viande et 14,3% des échantillons de fromage (Rafei *et al.,* 2015). Enfin, une étude conduite en Corée du Sud a isolé la bactérie de surfaces inertes en contact avec les hommes telles que des tables situées dans un parc ou encore sur des consoles de jeux vidéo.

1.3.3. Réservoir animal

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Plusieurs études récentes ont montré la présence d'*A. baumannii* chez des animaux. Toutefois, la majorité de ces études ont été menées dans des cliniques vétérinaires ou dans des hôpitaux. La dissémination nosocomiale de ce pathogène a été décrite (Eveillard *et al.,* 2013). Les infections dues à *A. baumannii* ont été décrites chez des chevaux et des animaux de compagnie, avec une légère prédominance dans les

infections de plaies et d'abcès. Cependant, parce que les animaux étaient prélevés dans un contexte hospitalier, il était difficile de statuer sur l'origine extra-hospitalière des souches isolées. Néanmoins, les animaux peuvent toujours être colonisés même après être guéris, et donc constituer un réservoir pour une potentielle transmission de la bactérie dans l'environnement, à d'autres animaux, ou aux hommes (Zordan *et al.,* 2011 ; Eveillard *et al.,* 2013).

Dans une étude conduite en Ecosse, des cochons et du bétail menés à l'abattoir afin d'être destinés à la consommation humaine et provenant de différentes fermes ont été prélevés (fécès, peau, narines, oreilles) dans le but d'isoler *A. baumannii*. La prévalence du portage s'élevait à 1,2%. Les seize *A. baumannii* isolés ont été groupés en trois clusters différents, mais leurs profils électrophorétiques obtenus après électrophorèse en champ pulsé (PFGE) étaient différents des trois clones majeurs européens ECI, ECII et ECIII, retrouvés chez l'homme. Dans d'autres études, des souches multi-résistantes ont été mises en évidence (Hamouda *et al.,* 2011). Zordan *et al*. (Zordan *et al.,* 2011) ont rapporté que 56 isolats d'*A. baumannii* obtenus dans plusieurs cliniques vétérinaires allemandes étaient très résistants aux antibiotiques, dont une forte proportion était génétiquement similaire aux clones européens I, II ou III, et la plupart d'entre eux appartenaient au même cluster.

Ces observations indiquent que, comme en médecine humaine, *A. baumannii* est un pathogène opportuniste en pleine émergence en médecine vétérinaire, particulièrement lorsqu'il s'agit d'animaux hospitalisés. Cependant, aucune étude de cohorte ou de contrôle/témoin n'a été réalisée afin d'investiguer si le contact entre les hommes et les animaux augmentait les risques de contracter des infections à *A. baumannii*. Au Liban, une étude a été conduite chez du bétail (cochons, volailles et bœufs) dans le but de vérifier le portage d'*A. baumannii*. Les auteurs ont trouvé une prévalence de portage de 7,7%. La bactérie était présente chez des animaux n'ayant eu aucun contact avec un environnement hospitalier (Rafei *et al.,* 2015).

Récemment, Belmonte *et al.* se sont intéressés à la prévalence d'*A. baumannii* chez les animaux de compagnie. L'étude réalisée sur l'Ile de La Réunion a été menée sur des chats et des chiens venant en consultation dans des cliniques vétérinaires. Les

résultats ont montré une prévalence de portage de 6,5% (Belmonte *et al.,* 2014). Cette étude est très intéressante étant donné que la relation entre les animaux domestiques et leurs propriétaires a évolué. Dans nos modes de vie moderne les animaux de compagnie sont à présent considérés comme « des membres de la famille à part entière », ce qui encourage la proximité avec des réservoirs potentiels (dans la famille des animaux de compagnie ou dans son environnement) d'*A. baumannii* et donc sa transmission aux humains. Aujourd'hui, nous sommes plus concernés par le bien-être de nos animaux domestiques. Leur donner des antibiotiques est devenu usuel et parfois ces molécules sont les mêmes que celles utilisées en médecine humaine. Cependant, les traitements délivrés aux animaux sont couramment empiriques, entraînant le mauvais usage et l'abus des traitements antibiotiques (Guardabassi, Schwarz et Lloyd, 2004).

En-dehors des animaux vertébrés, des souches d'*A. baumannii* ont été identifiées chez des poux humains. La Scola et Raoult ont démontré que la prévalence moyenne d'ADN provenant d'*A. baumannii,* parmi les 622 poux de corps étudiés et provenant de différents continents (Europe, Afrique et Amérique du Sud), variait de 3% à 58% (La Scola et Raoult, 2004). Une étude plus récente conduite en Ethiopie a montré la présence d'*A. baumannii* chez les poux de corps et également chez les poux de tête (Kempf *et al.,* 2012, a). Dans une autre étude également récente et réalisée à Paris, *A. baumannii* a été isolé dans 33% des poux de tête prélevés chez des écoliers (Bouvresse *et al.,* 2011). Cependant, même si les poux semblent être un hôte préférentiel pour *A. baumannii* cette hypothèse n'a pas été établie.

1.4. *A. baumannii* et résistance aux antibiotiques

A. baumannii fait preuve d'une grande capacité à réguler ou acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques de part la flexibilité de son génome. Ainsi, de plus en plus de souches deviennent multi-résistantes, c'est-à-dire résistantes à plus de deux classes d'antibiotiques parmi les cinq familles d'antibiotiques les plus utilisées telles que les céphalosporines, les carbapénèmes, les fluoroquinolones, les aminoglycosides ou le

sulbactam-ampicillin (Peleg, Seifert et Paterson, 2008). Par conséquent, les infections sont de plus en plus difficiles à traiter. Le problème est exacerbé par le nombre croissant d'industries pharmaceutiques qui n'investissent plus dans la recherche sur de nouvelles molécules antibiotiques (Peleg, Seifert et Paterson, 2008).

Jusqu'à récemment, la plupart des isolats d'*A. baumannii* restaient sensibles aux carbapénèmes, même si la résistance à ces molécules a été rapportée depuis le début des années 90 (Kempf et Rolain, 2012). La résistance aux carbapénèmes chez cette espèce est à présent considérée comme un sérieux problème de santé du fait de l'émergence de souches possédant des carbapénémases qui hydrolysent les carbapénèmes. Ces enzymes appartiennent principalement à la classe B (metallo-β-lactamases) et à la classe D (oxacillinases – OXA) de la classification d'Ambler, limitant les options de traitement antibiotique. Les carbapénémases de type OXA ont émergé et sont devenues le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes dans le monde entier. Les gènes les plus fréquemment retrouvés sont les gènes $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-24-like}}$ et $bla_{\text{OXA-58-like}}$. Plus récemment, des souches présentant le gène de résistance codant pour une metallo-β-lactamase NDM ont émergé sur tous les continents. Ce gène, originellement isolé chez *Klebsiella pneumoniae*, a été transféré à *A. baumannii* par le biais d'un transposon (Kempf et Rolain, 2012). Au-delà de ces mécanismes de résistance enzymatiques, des mécanismes de résistance non-enzymatiques et des pompes à efflux en nombre varié ont également été décrits (Peleg, Seifert et Paterson, 2008). Au-delà des carbapénèmes, d'autres options de traitement sont proposées comme les polymyxines, la tigécycline ou les aminoglycosides. Cependant, la résistance à ces antibiotiques a déjà émergé chez *A. baumannii* (Kempf et Rolain, 2012).

Dans l'environnement extra-hospitalier, les données sur les *A. baumannii* multi-résistants sont limitées à ce jour. Le premier rapport a été publié en 2010. Les chercheurs avaient isolé une souche présentant le gène de résistance $bla_{\text{OXA-23-like}}$ dans l'eau de la Seine à Paris (Girlich, Poirel et Nordmann, 2010). Plus récemment, des souches d'*A. baumannii* portant le gène $bla_{\text{OXA-23-like}}$ ont été isolées dans les selles de sénégalais résidant dans des lieux où la pression de sélection par des antibiotiques est normalement inexistante (Kempf *et al.*, 2012, c).

1.5. Typage épidémiologique d'*A. baumannii*

La formidable capacité *d'A. baumannii* de pouvoir évoluer rapidement dans un environnement hospitalier et celle à être impliqué dans les épidémies ont mené les chercheurs à développer des méthodes efficaces de typage épidémiologique. Au cours du temps, de nombreuses méthodes de typage ont été proposées, allant des méthodes phénotypiques aux méthodes moléculaires. Actuellement, l'usage des méthodes phénotypiques a été réduit pour faire place aux méthodes moléculaires. En effet, les méthodes de génotypage ont permis de dépasser les limites que présentaient les méthodes phénotypiques. Selon le but recherché, la méthode de génotypage utilisée ne sera pas la même. Par exemple, s'il s'agit d'étudier des souches potentiellement impliquées dans des épidémies, il est indispensable d'utiliser des outils avec un grand pouvoir discriminant afin de pouvoir différencier une souche d'une autre. Dans ce cas, l'électrophorèse en champ pulsé (pulsed-field gel electrophoresis – PFGE) est considérée comme le « gold standard » pour les investigations d'épidémies à *A. baumannii*. Elle est utilisée pour différencier deux souches étroitement reliées (Zarrilli *et al.,* 2013). La PFGE est une méthode de fragmentation de l'ADN dont le principe est basé sur l'usage d'une enzyme de restriction, la plus utilisée étant *Apa*I, dans le but d'obtenir des fragments de l'ensemble du génome (Turton *et al.*, 2004 ; Seifert *et al.,* 2005). Ces fragments vont ensuite migrer dans un gel sous l'influence d'un champ électrique. Une fois le profil électrophorétique obtenu, la relation génomique entre les souches est confirmée s'il y a plus de 80% de similarité (Turton *et al.,* 2004). Cette méthode est caractérisée par un haut pouvoir discriminatoire (Cetin *et al.,* 2009). Cependant, il existe quelques limites, comme par exemple une faible reproductibilité entre les laboratoires et le long processus de la manipulation sur plusieurs jours.

Concernant les études de populations bactériennes, plusieurs outils sont également disponibles. Pour *A. baumannii*, la méthode de typage par multi-locus sequence typing (MLST) est considérée internationalement comme la méthode de référence. Cette méthode n'analyse pas le génome dans sa globalité, mais sept gènes de ménage, qui sont séquencés. Chaque séquence différente obtenue pour un gène donné est considérée comme un allèle. La combinaison des sept allèles attribue un

Rapport-Gratuit.com

« sequence type » (ST) à la souche analysée. Actuellement, pour *A. baumannii* deux schémas de MLST sont disponibles: i) $MLST^B$ pour la méthode de Bartual's (Bartual *et al.,* 2005) qui type les gènes *glt*A, *gyr*B, *gdh*B, *rec*A, *cpn*60, *gpi* et *rpo*D. Les allèles sont ensuite insérés dans la base de données d' « Oxford » et un ST est attribué à la souche. ii) $MLST^P$ pour la méthode de Pasteur (Diancourt *et al.,* 2010) qui a trois gènes en commun avec le schéma précédent (*glt*A, *rec*A et *cpn*60) et quatre autres différents (*fus*A, *pyr*G, *rp*IB, *rpo*B). La combinaison des allèles est ensuite comparée à la base de données MLST Pasteur. Le MLST est considéré comme le « gold standard » dans l'étude de populations. C'est une technique standardisée et reproductible avec des bases de données internationales. Toutefois, elle requière du temps et est coûteuse (Rafei *et al.,* 2014, c). Alternativement, il est possible de faire une étude de population par typage du gène $bla_{\text{OXA-51-like}}$, (appelé « single-locus-sequence-typing »). A ce jour, une centaine de variants différents de ce gène ont été identifiés (Poirel et Nordmann, 2006). Cette méthode est intéressante car un seul gène est séquencé. Elle nécessite donc moins de temps et est moins coûteuse. Rafei *et al*. a démontré l'intérêt de cet outil dans une étude (Rafei *et al.,* 2014, a) comparant quatre méthodes de typage (PFGE, rep-PCR, MLST and $bla_{\text{OXA-51-like}}$ sequence-based-typing) pour l'analyse de souches d'*A. baumannii* isolées au Liban, afin de vérifier la robustesse de ces outils de biologie moléculaire. Les résultats ont montré que les souches étaient correctement typées par séquençage du gène $bla_{\text{OXA-51-like}}$. Cette technique était moins discriminatoire que la PFGE mais les résultats étaient corrélés avec ceux obtenus par les trois autres techniques. Aussi, le typage du gène $bla_{\text{OXA-51-like}}$ peut être utilisé en préliminaire pour faire un screening des souches. D'autres méthodes de « single-locus-sequence-typing » sont également disponibles pour étudier les souches d'*A. baumannii,* comme par exemple le séquençage des gènes *ade*B ou *rec*A. Ces outils partagent les mêmes avantages et limites que le séquençage du gène $bla_{\text{OXA-51-like}}$. Comme dernier exemple, des méthodes séquençant trois gènes (*omp*A, *csu*E, $bla_{\text{OXA-51-like}}$) à la place des sept gènes dans le MLST peuvent être intéressantes car elles sont plus rapides et faciles à mettre en œuvre. De plus, des bases de données sont disponibles (Rafei *et al.,* 2014, c).

2. Entérobactéries multi-résistantes

2.1. La famille des entérobactéries : caractéristiques et classification

La famille des entérobactéries regroupe un grand nombre d'espèces bactériennes commensales du tube digestif. Ces pathogènes opportunistes sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs et ne sporulant pas. La majorité de ces espèces est mobile *via* principalement des ciliatures péritriches, et non capsulée. Ces bactéries ne sont pas exigeantes, elles poussent sur des milieux ordinaires en 18 à 24 heures à 37°C. Elles sont capables de fermenter le glucose, réduire les nitrates en nitrites. Elles possèdent une catalase mais pas d'oxidase. Jusqu'à récemment, leur identification était basée essentiellement sur leurs caractères phénotypiques (API20E, VitekS …). Depuis quelques années, elle est établie par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux pénicillines G, V et M, molécules de la famille des β-lactamines. En fonction de leurs résistances naturelles envers les autres molécules de cette famille d'antibiotiques, ces bactéries sont classées en groupes. Il existe ainsi 7 groupes (**Tableau II**) (Bonnet, 2006).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

TABLEAU II. Classification des entérobactéries selon leurs résistances naturelles aux différentes familles de β-lactamines (Bonnet, 2006).

	Groupe 0	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5	Groupe 6
Aminopénicillines	S	S/I	R	R	R	R	R /I
Aminopénicillines + CLA	S	S/I	S	R	R	S	S/I
Carboxypénicillines	S	S	R	S	R	S	R /I
Carboxypénicillines + CLA	S	S	S	S	S	S	S
Uréidopénicillines	S	S	S	S	S	S	I /S
Uréidopénicillines + TAZ	S	S	S	S	S	S	S
C1G	S	S/I	S	R	R	R	R //
C2G	S	S	S	R/I/S	S	R	I/R
Céfoxitine	S	S	S	R/I/S	S	S	S
C3G	S	S	S	S	S	S	S
C4G	S	S	S	S	S	S	S
Carbapénèmes	S	S	S	S	S	S	S
Mécanisme de résistance	Pas de gène de résistance	Case (AmpC) chromosomique non inductible	Pase de bas niveau	Case de bas niveau chromosomique et inductible (AmpC)	Case inductible (AmpC) + Pase de bas niveau	Case inductible	BLSE de bas niveau
Principales espèces retrouvées en milieu hospitalier	*P. mirabilis* *Salmonella* spp.	*E. coli* *Shigella* spp.	*Klebsiella* spp. *Citrobacter* spp.	*Enterobacter* spp. *Serratia* spp. *Morganella* spp. *Citrobacter freundii*	*Y. enterocolitica* *S. fonticola*	*Proteus* spp.	*Kluyvera* spp. *R. aquatilis* *C. seldakii*

CLA: acide clavulanique; TAZ: tazobactam; C1G: céphalosporine de 1ère génération; C2G : céphalosporine de 2ème génération; C3G: céphalosporine de 3ème génération; C4G: céphalosporine de 4ème génération; Case: céphalosporinase; Pase: pénicillinase; BLSE: β-lactamase à spectre étendu; S: sensible; I: sensibilité intermédiaire; R: résistante.

2.2. Entérobactéries multi-résistantes et résistance aux β-lactamines

Les β-lactamines sont la famille d'antibiotiques la plus utilisée en thérapeutique pour traiter les infections dues aux entérobactéries (Livermore et Woodford, 2006). En effet, ce sont des molécules faiblement toxiques et possédant un large spectre d'activité (Bonnet, 2006). Ces antibiotiques possèdent un cycle β-lactame à l'origine de leur activité. Ils se fixent sur les protéines de liaison à la pénicilline (PLP) qui sont nécessaires à la synthèse de la paroi des bactéries (Bonnet, 2006).

La résistance acquise aux β-lactamines chez les entérobactéries est principalement due à la production d'enzymes appelées β-lactamases qui hydrolysent le noyau β-lactame, rendant ainsi l'antibiotique inactif (Bonnet, 2006). Il existe deux catégories de β-lactamases : les pénicillinases et les céphalosporinases (Shah *et al.* 2008), dont les niveaux d'expression varient selon les espèces ou les souches bactériennes (**Tableau III**). Les gènes codant les pénicillinases peuvent être chromosomiques ou plasmidiques, alors que ceux codant des céphalosporinases sont essentiellement d'origine chromosomique (Gutmann et Williamson, 1987).

TABLEAU III. Phénotypes de résistance acquise aux pénicillines et aux céphalosporines en fonction du niveau d'expression des β-lactamases (Bonnet, 2006).

	Pénicillinase		**B-lactamase à spectre étendu**	**Céphalosporinase**	
	Bas niveau	**Haut niveau**		**Bas niveau**	**Haut niveau**
Aminopénicillines	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**
Aminopénicillines + CLA	S	**R**	**R**	**R**	**R**
Carboxypénicillines	**R**	**R**	**R**	S	**R**
Carboxypénicillines + CLA	S	**I**	**I**/**R**	S	**R**
Uréidopénicillines	S	**R**	**R**	S	**R**
Uréidopénicillines + TAZ	S	**I**	S/**I**	S	**R**/I
C1G	S	**R**	**R**	**R**	**R**
C2G	S	S/**I**/**R**	**R**	**R**/**I**/S	**R**/I
Céfoxitine	S	S	S	**R**/**I**/S	**R**/I
C3G	S	S	**R**	S	**R**
C4G	S	S	S	S	S

CLA: acide clavulanique; TAZ: tazobactam; C1G: céphalosporine de 1ère génération; C2G : céphalosporine de 2ème génération; C3G: céphalosporine de 3ème génération; C4G: céphalosporine de 4ème génération; Case: céphalosporinase; Pase: pénicillinase; BLSE: β-lactamase à spectre étendu; S: sensible; I: sensibilité intermédiaire; R: résistante.

L'existence des β-lactamases n'est pas récente. La première enzyme a été identifiée en 1940 chez une souche d'*E. coli* (Turner, 2005). En revanche, ce n'est qu'en 1965 que les premières β-lactamases médiées par un plasmide ont été mises en évidence en milieu hospitalier (Turner, 2005). L'origine plasmidique de cette résistance en faisait un problème majeur de santé publique, ce « vecteur de résistance » étant facilement transmissible d'une bactérie à une autre au sein des entérobactéries. Ceci était d'autant plus inquiétant que Cottell *et al.* ont démontré que même dans un environnement où la pression de sélection par les antibiotiques était inexistante, les plasmides transférant des gènes de résistance persistaient (Cottell, Webber et Piddock, 2012).

Avec le temps, les entérobactéries ont développé des résistances de plus en plus importantes vis-à-vis des β-lactamines jusqu'à obtenir des résistances aux C3G. La résistance aux C3G peut être due à la production d'une β-lactamase à spectre étendu (BLSE) ou d'une céphalosporinase de haut niveau (CHN) de type AmpC (**Tableau III**). Une BLSE est définie comme une pénicillinase touchant au-moins une C3G. Son activité est inhibée par les inhibiteurs de β-lactamases comme l'acide clavulanique, le sulbactam ou encore le tazobactam. Les BLSE ne sont pas actives sur les carbapénèmes ou les céphamycines (Paterson et Bonomo, 2005). Actuellement, le gène codant pour des BLSE qui prédomine dans le monde est de type CTX-M. Ce gène est dans la majorité des cas médié par un plasmide (Livermore et Woodford, 2006).

La présence d'une CHN de type AmpC entraîne généralement une résistance à l'ensemble des β-lactamines, sauf les carbapénèmes. A l'inverse des BLSE, l'activité des CHN n'est pas inhibée par un inhibiteur de β-lactamase (Perez *et al.,* 2007 ; Paterson et Bonomo, 2005). Ce type d'enzyme hydrolyse particulièrement bien le céfotaxime et la ceftriaxone, alors qu'il est moins efficace sur la ceftazidime (Livermore et Woodford,

2006 ; Pitout et Laupland, 2008). Les CHN sont codées par des gènes qui sont essentiellement chromosomiques (Shah *et al.,* 2008). Cliniquement elles peuvent être considérées comme moins « menaçantes » que les BLSE du fait d'une diffusion beaucoup moins importante. Cependant, elles ne sont pas à laisser sans surveillance puisque des CHN plasmidiques ont été décrites chez des entérobactéries (Hordijk *et al.,* 2013 ; So *et al.,* 2012).

2.3. Epidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE

La diffusion mondiale des entérobactéries multi-résistantes concerne surtout celles productrices de BLSE. Aussi, dans les chapitres suivants ne sont exposées que les données portant sur les BLSE.

Les entérobactéries multi-résistantes par production de BLSE ont été décrites sur tous les continents. En revanche, d'une région du monde à une autre leur occurrence est variable. Par exemple, une étude de 2008 rapportait que la prévalence d'*Escherichia coli* productrices de BLSE en milieu hospitalier était de 3,3% aux Etats-Unis et 4,2% au Canada (Bush, 2008), alors qu'au début des années 2000, cette prévalence était déjà de 24,5% en Chine.

2.3.1. Infections hospitalières

A l'origine, les entérobactéries productrices de BLSE ont été isolées en milieu hospitalier et plus particulièrement dans les USI. La principale espèce isolée était *Klebsiella pneumoniae*. Les infections dues aux entérobactéries productrices de BLSE étaient particulièrement retrouvées chez des patients gravement malades dont la durée du séjour à l'hôpital était augmentée, et souvent amenés à recevoir un dispositif invasif et une antibiothérapie à large spectre (Paterson et Bonomo, 2005 ; Reinert *et al.,* 2007 ; Shah *et al.,* 2008). Aujourd'hui, quasiment tous les services hospitaliers sont

confrontés à des patients porteurs de BLSE. Les principales infections dues à ces bactéries sont des infections de l'appareil respiratoire et urinaire, des bactériémies ou des infections intra-abdominales (Pitout et Laupland, 2008).

2.3.2. Infections communautaires

Des entérobactéries habituellement responsables de diarrhées lors d'infections communautaires comme *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp. sont aujourd'hui capables de produire des BLSE (Paterson et Bonomo, 2005). Dans différentes régions du monde, une augmentation des souches d'*E. coli* BLSE responsables d'infections urinaires ou de bactériémies a aussi été observée (Reinert *et al.,* 2007 ; Paterson, 2006). Dans la majorité des cas, les souches ne sont pas clonalement reliées entre elles, ce qui montre bien la capacité d'expansion de ces BMR (Pitout et Laupland, 2008). Souvent, les patients développant ces infections présentent des facteurs de risque: l'âge élevé, le sexe féminin, le diabète mellitus, des infections récurrentes du tractus urinaire, la prise préliminaire d'aminopénicillines, de céphalosporines ou de fluoroquinolones (Reinert *et al.,* 2007 ; Paterson, 2006).

2.4. Réservoir extra-hospitalier des entérobactéries productrices de BLSE

2.4.1. Portage humain

Les entérobactéries sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme donc fréquemment retrouvées dans les fécès. De nombreuses études ont montré que l'homme pouvait être porteur asymptomatique de ces BMR. A titre d'exemple, dans une étude réalisée en Tunisie, il a été montré que des souches d'*E. coli* BLSE étaient détectées dans les fécès d'individus sains, qu'ils aient été en contact ou non avec un

réservoir animal ou un environnement hospitalier (Sallem *et al.,* 2011). La prévalence de portage était de 7,3%. Certains isolats possédaient le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$. Cependant, ces souches étaient génétiquement variées puisque sept ST différents ont été identifiés. Une étude similaire réalisée en Côte-d'Ivoire a montré une prévalence de portage d'entérobactéries productrices de BLSE de 27%. Ces souches avaient été détectées dans les fécès d'individus sains vivant dans un village (Albrechtova *et al.,* 2014).

2.4.2. Réservoir environnemental

Des entérobactéries productrices de BLSE ont été décrites dans plusieurs sources environnementales, notamment autour des usines de traitement des eaux usées ou encore sur des végétaux destinés à la consommation humaine.

Plusieurs études se sont intéressées au réservoir environnemental qu'est l'eau. En Suisse, Zurfluh *et al.* se sont intéressés à la présence d'entérobactéries productrices de BLSE dans les eaux des rivières et des lacs (Zurfluh *et al.,* 2013). En effet, les rivières et les lacs récupèrent les eaux usagées et sont au contact de l'activité humaine. Ces BMR ont été retrouvées dans 36,2% des échantillons réalisés. Au total, 74 souches productrices de BLSE ont été isolées dont une majorité d'*E. coli*, mais également des *K. pneumoniae* ou des *Enterobacter* spp. Le gène de résistance $bla_{CTX\text{-}M}$ a été identifié chez 71 des souches. Les variants associés à ce gène étaient nombreux, mais le plus fréquent était le variant $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ (identifié ici chez 46 souches) également essentiellement retrouvé chez l'homme. Ces observations ont été appuyées par les résultats d'une étude portant sur la recherche d'entérobactéries productrices de BLSE dans des eaux localisées en zone rurale, donc proches des activités humaines et des élevages (Zhang *et al.,* 2015). En effet, ces BMR ont été retrouvées dans 16,7% des points d'eau prélevés. Enfin, une étude a mis en évidence la présence d'*E. coli* productrices de BLSE par acquisition du gène $bla_{CTX\text{-}M}$ dans des eaux de plaisance (Blaak *et al.,* 2014). Ces eaux se trouvaient en aval de lieux de traitements des eaux usagées, montrant ainsi un lien entre la présence de ces entérobactéries et l'activité humaine. D'autres études se sont particulièrement intéressées aux zones de traitement

des eaux usagées, l'une d'elle a été réalisée en France (Diallo *et al.,* 2013) et l'autre, en Espagne (Ojer-Usoz *et al.,* 2014). Concernant l'étude conduite en France, les auteurs se sont particulièrement intéressés aux souches pathogènes retrouvées en médecine humaine. Ils ont mis en évidence que la prévalence de ces souches était plus élevée dans les effluents des eaux usagées provenant de la ville que dans ceux provenant d'abattoirs. En Espagne, 67,4% des souches présentaient le gène de résistance $bla_{CTX\text{-}M}$.

Une large étude menée aux Pays-Bas a comparé des légumes provenant de différents pays européens (Allemagne, Belgique, Espagne, France, Italie, Pays-Bas) et africains (Maroc et Egypte) (Van Hoek *et al.,* 2015). Des entérobactéries résistantes aux C3G ont été isolées sur 5,2% des légumes étudiés, indiquant un réservoir tellurique. Les espèces les plus fréquemment retrouvées étaient *Enterobacter* spp. (33%), et *Serratia* spp. (44%).

2.4.3. Réservoir animal

Le réservoir animal est intéressant puisque la transmission d'entérobactéries multi-résistantes entre l'animal et l'homme a été établie. Plusieurs études ont illustré le lien homme – animal en s'intéressant à la présence de telles bactéries au sein des élevages, des abattoirs ou encore chez les animaux domestiques.

a) Entérobactéries et production animale

Dans les élevages d'animaux, la diffusion d'entérobactéries productrices de BLSE peut s'expliquer par la promiscuité des animaux mais aussi l'utilisation fréquente d'antibiotiques (Carattoli, 2008 ; Hunter *et al.,* 2010). Ainsi, de telles bactéries ont été isolées chez des animaux sains (Ferreira *et al.,* 2014 ; Reich, Atanassova et Klein, 2013) ou non (Saishu, Ozaki et Murase, 2014), et ont pu être retrouvées chez les

fermiers (Dohmen *et al.,* 2015) ou dans l'environnement autour des fermes (Von Salviati *et al.,* 2015 ; Laube *et al.,* 2014).

La première description de bactéries BLSE a été faite dans un élevage de bétail chez des veaux atteints de diarrhée en 2004 au Pays de Galle. La bactérie incriminée était une souche d'*E. coli* possédant une BLSE de type CTX-M-14. Cette souche a persisté dans le temps et a été transmise à des vaches appartenant au même élevage (Hunter *et al.,* 2010). Dans un second temps, toujours au Royaume-Uni, une souche d'*E. coli* productrice d'une BLSE de type CTX-M-15 a été isolée chez des veaux. Ce type de BLSE est par ailleurs fréquemment retrouvé chez l'homme (Carattoli, 2008), illustrant le transfert de BMR de l'homme vers l'environnement et ensuite vers les animaux.

Une étude chinoise a démontré qu'en 10 ans, la prévalence des entérobactéries productrices de BLSE de type CTX-M était en forte augmentation (5,7% en 2003 – 2005 contre 35,3% en 2009 – 2012) chez des animaux malades (volailles et cochons) et destinés à la consommation humaine (Rao *et al.,* 2014). Des entérobactéries productrices de BLSE ont aussi été mises en évidence chez d'autres espèces animales, infectées ou non, dans plusieurs régions du monde: chez des chevaux en République Tchèque (Dolejska *et al.,* 2011), aux Pays-Bas (Vo *et al.,* 2007), en Grande-Bretagne (Johns *et al.,* 2012) et en Belgique (Boyen *et al.,* 2013); des oiseaux en Allemagne (Guenther *et al.,* 2012, a), au Bangladesh (Hasan *et al.,* 2014) et aux Pays-Bas (Veldman *et al.,* 2013); des animaux sauvages en Afrique (Janatova *et al.,* 2014) ou encore des animaux dans les zoos en République Tchèque (Dobiasova *et al.,* 2013) ; des rats en milieu urbain en Allemagne (Guenther *et al.,* 2012, b) ; et des renards roux au Portugal (Radhouani *et al.,* 2012).

b) Entérobactéries et chaîne alimentaire

Certains auteurs ont démontré la présence de souches d'entérobactéries multi-résistantes identiques chez l'homme et chez l'animal, grâce à l'analyse du génome par

Rapport-Gratuit.com

séquençage. La transmission a ainsi pu être établie entre l'animal et l'homme, *via* la chaîne alimentaire. Une étude conduite en Suède a démontré que l'occurrence de telles bactéries était plus élevée dans la viande de volaille, et variait en fonction de son origine. Des auteurs ont montré que des entérobactéries BLSE étaient retrouvées à 95% dans la viande de volaille provenant d'Amérique du Sud contre 65% pour l'Europe (Egervärn *et al.,* 2014). En France en 2012, la prévalence d'entérobactéries productrices de BLSE était de 29,4% dans la flore fécale de veaux (Haenni *et al.* 2014, a). La circulation de telles souches est mondiale, étant donné que la viande circule librement, du fait du commerce international des denrées alimentaires (Schaumburg *et al.,* 2014).

c) Entérobactéries et animaux domestiques

Plusieurs auteurs ont récemment décrit la présence d'entérobactéries productrices de BLSE chez les animaux de compagnie (Rubin et Pitout, 2014). Chez ces animaux, les chercheurs s'intéressent principalement à la détection d'*E. coli*, étant donné que c'est la principale espèce d'entérobactérie isolée dans un contexte infectieux, aussi bien dans les hôpitaux qu'en milieu communautaire (Rubin et Pitout, 2014). Les animaux domestiques peuvent être malades ou porteurs asymptomatiques de ces pathogènes opportunistes et donc être un réservoir. Ils nécessitent donc une surveillance, d'autant plus que leur contact avec l'homme est plus étroit comme ils partagent le même environnement, mais souvent également les mêmes classes d'antibiotiques.

Quelques études récentes ont été menées au sein de cliniques vétérinaires, afin de démontrer la présence de souches d'*E. coli* productrices de BLSE chez des animaux de compagnie hospitalisés. Par exemple, en Corée, 63 *E. coli* multi-résistants ont été identifiés dans des échantillons fécaux chez des chiens hospitalisés dont 21 produisaient des BLSE de type CTX-M (CTX-M-14 était le gène principalement identifié) (So *et al.,* 2012). Au Pays-Bas des *E. coli* producteurs de BLSE de type CTX-M ont été détectés chez des animaux de compagnie présentant principalement des infections

urinaires (Dierikx *et al.,* 2012). En Italie, une étude a mis en évidence la présence de *Klebsiella* spp. producteurs de BLSE dans des prélèvements cliniques de chats et chiens de compagnie ayant développés une infection (Donati *et al.,* 2014). D'autre part, en Suisse, des échantillons urinaires ont été effectués sur des chats et des chiens présentant des cystites à répétition. Parmi les 107 isolats d'*E. coli*, huit étaient producteurs de BLSE, tous avec le gène CTX-M-15 (Huber *et al.,* 2013). Cette espèce bactérienne multi-résistante a aussi été mise en évidence dans la bile de deux chiens atteints de cholangiohépatite, dans une clinique vétérinaire en Grande-Bretagne. Les deux souches étaient productrices d'une BLSE de type CTX-M-15 (Timofte *et al.,* 2011).

Une étude a comparé la prévalence du portage fécal chez des chats et chiens sains avec celui de chats et chiens présentant des diarrhées (Hordijk *et al.,* 2013). Une souche d'*E. coli* multi-résistante a été isolée chez 45% des chiens sains et 55% de chiens diarrhéiques. Par ailleurs, aucune souche multi-résistante n'a été retrouvée chez les chats sains, alors que 25% des chats diarrhéiques en hébergeaient une. Il semble que la production de BLSE ait été préférentiellement observée chez les chiens et les chats domestiques malades. Dans cette étude, des CTX-M (1, 14 et 15) ont été détectées.

D'autres auteurs se sont intéressés à l'occurrence des entérobactéries productrices de BLSE chez des animaux de compagnie porteurs asymptomatiques, vivant en communauté ou non. En 2014, à Paris, des souches d'*E. coli* productrices de BLSE ont été mises en évidence chez 13,0% des chiens urbains inclus dans l'étude, alors que le portage asymptomatique de l'homme était de 6% (Haenni *et al.,* 2014, b). Le gène CTX-M-1 était prépondérant chez ces chiens, gène également retrouvé chez l'homme, d'où l'hypothèse que les chiens pourraient être un réservoir d'entérobactéries productrices de BLSE CTX-M-1. Dans une étude menée en Côte-d'Ivoire, des entérobactéries productrices de BLSE de type CTX-M-15, dont une majorité d'*E. coli,* ont été détectées dans les fécès de chats et chiens domestiques. Les prévalences de portage obtenues s'élevaient respectivement à 67% et à 32% (Albrechtova *et al.,* 2014). La présence du clone mondialement connu (CTX-M-15) chez ces animaux a été expliquée par le fait que: i) ces animaux pouvaient consommer la même eau et les mêmes denrées alimentaires que les hommes. ii) l'étude s'étant déroulée dans un

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MEMOIRES

village africain, la défécation se faisait dans l'environnement et sans précautions particulières. Or si l'homme est porteur d'entérobactéries multi-résistantes, il est possible qu'il ait contaminé son environnement proche et donc par la suite les animaux domestiques. Ce lien de transmission homme – animal domestique a été illustré lors d'une campagne de détection d'*E. coli* productrices de BLSE chez des hommes sains (Meyer *et al.,* 2012). Ainsi, 3,5% des personnes incluses dans l'étude étaient porteuses de la bactérie. Par ailleurs, des facteurs de risque ont été mis en évidence tels qu'un voyage à l'étranger en Grèce ou en Afrique, d'où la circulation des souches dans le monde, mais aussi la vie en communauté avec un animal domestique, caractérisant ces derniers comme un potentiel réservoir d'entérobactéries multi-résistantes.

MATERIEL ET METHODES

Le portage d'*A. baumannii* et d'entérobactéries multi-résistantes a été étudié chez des animaux de compagnie (chats et chiens). Pour cela, des prélèvements buccaux et rectaux ont été réalisés par écouvillonnage, et analysés.

1. Collecte des prélèvements

Les prélèvements ont été collectés par des vétérinaires de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ONIRIS, 44). Seuls les chats et les chiens domestiques venant en consultation dans le service de médecine préventive de l'école ont été inclus dans cette étude. Pour chaque animal, deux prélèvements ont été réalisés, par écouvillonnage : un prélèvement buccal, identifié "B", et un prélèvement rectal, identifié "F". Les écouvillons ont ensuite été acheminés au Laboratoire de Bactériologie du CHU d'Angers. Afin d'optimiser la conservation des échantillons, chaque écouvillon a été conservé dans un milieu de transport (Amies agar gel medium transport, Copan, USA).

Un consentement écrit a été demandé au propriétaire de l'animal avant réalisation de tout prélèvement. Par ailleurs, un questionnaire standardisé a été proposé dans le but de collecter le maximum d'informations sur l'animal lui-même, son mode de vie …, afin de permettre une étude épidémiologique. Le consentement ainsi que le questionnaire sont présentés dans l'**Annexe 1**.

2. Traitement des écouvillons et ensemencement des prélèvements

A leur arrivée au Laboratoire de Bactériologie du CHU d'Angers, les écouvillons ont été déchargés dans des tubes à hémolyse contenant 1 mL de bouillon nutritif cœur-cervelle (Brain Heart culture broth BHI-T, bioMérieux, France), puis vortexés pendant environ 5 secondes. Les tubes ont ensuite été placés à l'étuve pendant 24 heures à 37°C pour enrichissement.

Dix microlitres de chacun des prélèvements ont ensuite été ensemencés sur deux types de gélose à l'aide d'une oëse. Les géloses ensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24 heures, en aérobiose. Les deux milieux d'ensemencement utilisés étaient:

- la *gélose ChromAgar™ Acinetobacter base* (ChroMagar, Paris, France). Il s'agit d'une gélose sélective et chromogène, permettant la croissance préférentielle des bactéries appartenant au genre *Acinetobacter*. Ce milieu a nécessité une reconstitution. Ainsi, 32,8 g de poudre AC092(B) contenant de l'agar ont été dispersés dans 1 litre d'eau purifiée. A ce mélange, 4 mL de supplément liquide AC092(S) ont été ajoutés. Le tout a été porté à ébullition (100°C), tout en mélangeant régulièrement jusqu'à complète fusion de l'agar. Puis, 20 mL de milieu ainsi obtenu ont été coulés dans des boîtes de Pétri stériles lorsque la température est redescendue à 45-50°C. Après 30 minutes, les boîtes ont immédiatement été utilisées ou conservées à +4°C, après avoir été parafilmées.

- la *gélose UTI®* (Oxoïd, Basingstoke, UK). C'est une gélose chromogène non sélective qui permet habituellement la détection de bactéries appartenant à la famille des entérobactéries. Cependant, *A. baumannii* ainsi que la plupart des autres *Acinetobacter* sont également capables de croître sur ce milieu, en donnant des colonies de couleur crème.

Pour la recherche d'entérobactéries produisant une BLSE, la gélose utilisée a été la *gélose ChromID ESBL agar* (bioMérieux, France). Cette gélose permet la sélection des bacilles Gram négatifs résistants aux C3G grâce à l'addition dans le milieu d'antibiotiques appartenant à cette famille. De plus, la gélose se compose de deux milieux distincts, associant un milieu Mac Conkey (rouge) et un milieu Drigalski (vert). Ces deux milieux permettent également de démontrer si la colonie est capable de fermenter le lactose ou non. Il est à noter que cette gélose n'est pas sélective des entérobactéries BLSE, aussi, pour toute colonie qui pousse, un test complémentaire doit être réalisé (voir ci-dessous).

3. Identification bactérienne

L'identification bactérienne a été réalisée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF sur les colonies d'intérêt qui ont poussé sur les différentes géloses ensemencées.

Concernant la recherche d'*A. baumannii* et des autres *Acinetobacter*, les colonies d'intérêt apparaissent rouges sur *gélose ChromAgar™ Acinetobacter* base, et beige sur *gélose UTI®*.

Concernant la recherche d'entérobactéries BLSE, pour toute bactérie ayant poussé sur *gélose ChromID ESBL*, un test de réaction d'oxidase a été préalablement réalisé. Ce test rapide permet de discriminer les entérobactéries qui sont à réaction d'oxidase négative, d'autres bactéries telles que le *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *Stenotrophomonas maltophilia*, qui sont à réaction d'oxidase positive. Une identification par spectrométrie de masse a été réalisée sur toute colonie oxidase négative.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.1. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse permet une identification rapide basée sur la détermination des masses moléculaires des protéines bactériennes, pour la plupart ribosomales, par la détection du rapport masse sur charge de la protéine. Les résultats sont présentés sous forme d'un spectre de masse. Celui-ci est caractéristique de chaque espèce et est comparé aux spectres d'une base de données.

Au Laboratoire de Bactériologie du CHU d'Angers, le spectromètre de masse utilisé est le VITEK®MS plus de bioMérieux (Marcy l'Etoile, France). Il existe deux modes d'utilisation du VITEK®MS plus : i) un mode IVD (*in vitro* diagnosis) utilisé en routine, dont la version 2.0 actuelle permet l'identification de 645 espèces bactériennes et 110 espèces fongiques différentes. Ce mode comprend une base de données fermée, c'est-à-dire non modifiable, mais qui est marquée CE. ii) un mode RUO (research use only), utilisant la version 4.12. de la base de données SARAMIS™ (spectral archive and microbial identification system). Cette base de données contient 1202 espèces bactériennes et fongiques. Elle est modifiable, mais elle n'est pas validée dans le cadre du diagnostic médical.

Classiquement, les entérobactéries sont toutes identifiées à l'aide du mode IVD. Concernant l'identification d'*A. baumannii* et des autres *Acinetobacter*, les modes IVD et RUO fournis par bioMérieux ne permettent pas une identification correcte au rang d'espèce. Récemment, le Laboratoire de Bactériologie a implémenté la base de données RUO avec des spectres spécifiques pour permettre une identification fiable et rapide d'*A. baumannii, A. pittii* et *A. nosocomialis* (Pailhoriès *et al.,* 2015). Cette base de données a été utilisée dans notre étude.

Brièvement, chaque colonie d'intérêt a été déposée sur une cible Vitek MS® (DS ref. 410893) à l'aide d'une oëse. En parallèle, la souche de référence *Escherichia coli* ATCC8739 servant de calibrant a été déposée. Puis, 1 µL d'une matrice acide de type CHCA (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique) a été ajouté sur chaque dépôt bactérien. Après cristallisation, l'ensemble échantillon/matrice a été ionisé par un faisceau laser.

Les ions ainsi formés ont été soumis à un champ électrique et sont entrés dans un tube sous vide au bout duquel est placé un détecteur. Les ions ont ainsi été séparés selon leur rapport masse/charge par la durée de leur « temps de vol » jusqu'au détecteur. Ces rapports permettent d'obtenir des spectres qui ont ensuite été comparés à une base de données fournie avec l'automate (IVD pour les entérobactéries et RUO pour les *Acinetobacter*). Lorsqu'il existait des concordances avec des spectres de la base de données, le genre et l'espèce bactérienne ont été indiqués, accompagnés d'un pourcentage de concordance. Le principe de la technique est expliqué en **Annexe 2**.

3.2. Identification par séquençage du gène *rpo*B pour les souches identifiées comme *Acinetobacter* par MALDI-TOF MS

L'identification des *Acinetobacter* spp. par MALDI-TOF MS n'étant pas fiable à 100%, le séquençage du gène *rpo*B a été réalisé, selon le schéma proposé par Gundi *et al.* (Gundi *et al.,* 2009). Le séquençage de ce gène reste à ce jour le meilleur moyen pour identifier correctement au rang d'espèce les bactéries du genre *Acinetobacter*.

Brièvement, dans un premier temps, une suspension bactérienne a été réalisée à partir des colonies d'intérêt, dans 500 µL d'eau stérile. Une extraction d'ADN a été réalisée à l'aide de l'automate NucliSENS® easyMAG™ (bioMérieux, France) selon les recommandations données par le fournisseur. Puis, un fragment de 350 pb, qui permet de discriminer aisément les différentes espèces d'*Acinetobacter*, a été amplifié à l'aide des amorces Ac696F (5'-TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG-3') et Ac1093R (5'-CMACACCYTTGTTMCCRTGA-3') (Gundi *et al.,* 2009), selon les conditions de PCR suivantes: après l'activation de l'enzyme (GoTaq DNA polymerase – Promega Madison, USA) à 94°C pendant 15 minutes, une étape d'amplification de l'ADN cible a été réalisée sur 40 cycles. Chaque cycle comprend une phase de dénaturation de 30 secondes à 94°C, une phase d'hybridation de 30 secondes à 55°C et une phase d'élongation de 1 minute à 72°C. Enfin, une étape d'élongation finale a été réalisée à 72°C pendant 5 minutes. Les amplicons ont ensuite été purifiés à l'aide du kit

Nucleofast® (Macherey Nagel, Düren, Germany), selon les recommandations du fournisseur. Puis, la réaction de séquence a été réalisée à l'aide du kit BigDye Terminator (v3.1. – Applied Biosystems, Foster City, USA), selon les conditions de PCR recommandées par le fournisseur: activation de l'enzyme à 96°C pendant 1 minute, étape d'amplification réalisée sur 25 cycles, chaque cycle comprenant une phase de dénaturation de 10 secondes à 96°C, une phase d'hybridation de 5 secondes à 50°C et une phase d'élongation de 4 minutes à 60°C. Enfin, après purification des produits de séquence à l'isopropanol, une électrophorèse a été réalisée avec le séquenceur 3130XL Genetic Analyzer® (Applied Biosystems, Foster City, USA). Les séquences nucléotidiques obtenues ont ensuite été analysées sur le serveur NCBI avec le logiciel BlastN (basic local alignment search tool nucleotidic). Un isolat était considéré comme correctement identifié lorsque la séquence obtenue présentait une similarité ≥ 98% avec la séquence la plus proche de l'espèce bactérienne donnée par BlastN.

3.3. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

3.3.1. Cas d'*A. baumannii* et des autres *Acinetobacter*

La sensibilité aux antibiotiques a été évaluée sur toutes les souches identifiées comme des *Acinetobacter* (*A. baumannii* et les autres *Acinetobacter* spp.). Les antibiotiques testés étaient: l'amoxicilline, l'amoxicilline + acide clavulanique, la ticarcilline, la ticarcilline + acide clavulanique, la pipéracilline + tazobactam, la ceftazidime et l'imipénème (antibiotiques appartenant à la famille des β-lactamines), l'amikacine, la tobramycine et la nétilmycine (antibiotiques appartenant à la famille des aminosides), la ciprofloxacine (antibiotique de la famille des quinolones), la rifampicine, la doxycycline et la tigécycline, le cotrimoxazole et la colistine. Les antibiogrammes ont été réalisés par la technique de diffusion en milieu gélosé MH (Muëller-Hinton) en utilisant des disques chargés d'antibiotique (Biorad), selon les recommandations 2013 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

Brièvement, à partir d'une culture de 18 à 24 heures, une dilution de raison 100 d'une suspension bactérienne à 0,5 Mac Farland a été préparée. Le mélange a été vortexé et ensemencé par écouvillonnage (trois écouvillonnages successifs effectués suivant trois axes différents avec le même écouvillon non rechargé). Après incubation des géloses pendant 18 à 24 heures à 37°C pour les souches d'*A. baumannii*, et 30°C pour les autres *Acinetobacter* spp., le diamètre correspondant à la zone d'inhibition de croissance des bactéries a été mesuré et le profil de résistance des souches vis-à-vis de chaque antibiotique a été déterminé. Toute résistance à l'imipénème a été confirmée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis de cet antibiotique, à l'aide d'une bandelette E-test. La CMI était lue après incubation des géloses à 35°C +/- 1°C dans des conditions aérobiques pendant 16 à 20 heures. La CMI correspond à la valeur lue sur la bandelette au niveau de l'intersection de l'ellipse d'inhibition et de la bandelette elle-même.

Lorsque la résistance aux carbapénèmes était confirmée, le gène codant la carbapénémase a été recherché par PCR en temps réel. Les gènes recherchés étaient: $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-24-like}}$, $bla_{\text{OXA-58-like}}$, $bla_{\text{OXA-143-like}}$, bla_{NDM}, bla_{SIM}, bla_{IMP} et bla_{VIM}. La PCR a été réalisée sur l'ADN extrait, selon les conditions suivantes: activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 minutes, amplification de l'ADN sur 40 cycles. Chaque cycle comprenait une phase de dénaturation de 15 secondes à 95°C, et une phase d'élongation de 15 secondes à 58°C.

3.3.2. Cas des entérobactéries productrices de BLSE

Pour différencier les entérobactéries produisant une BLSE de celles produisant une CHN, un test complémentaire composé de disques d'antibiotiques alliant une C3G associées ou non à un inhibiteur a été réalisé. Les disques testés ont été: céfépime, céfépime + acide clavulanique, céfotaxime, céfotaxime + acide clavulanique, céfotaxime + cloxacilline, ceftazidime, ceftazidime + acide clavulanique et ceftazidime + cloxacilline.

Rapport-Gratuit.com

La souche bactérienne testée était considérée comme une BLSE si le diamètre d'inhibition de l'antibiotique associé à l'acide clavulanique était ≥ 5 mm à celui du même antibiotique sans l'inhibiteur. Le même principe était appliqué pour déterminer les entérobactéries productrices de CHN, avec un diamètre d'inhibition de l'antibiotique avec la cloxacilline ≥ 5 mm par rapport à celui du même antibiotique sans l'inhibiteur.

Sur toutes les souches d'entérobactéries identifiées comme BLSE ou CHN, la sensibilité vis-à-vis des antibiotiques suivants a été par la suite déterminée en milieu gélosé MH comme précédemment décrit : amoxicilline, amoxicilline/acide clavulanique, ticarcilline, ticarcilline/acide clavulanique, pipéracilline/tazobactam, ceftazidine, ertapénème, méropénème, imipénème, amikacine, tobramycine, nétilmycine, ciprofloxacine, cotrimoxazole et colistine.

4. Etude épidémiologique des souches d'*A. baumannii*

Dans ce travail nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux souches d'*A. baumannii*, pour lesquelles nous avons réalisé une étude épidémiologique. L'objectif était de mettre en évidence la présence éventuelle de clones identiques. Pour cela, deux techniques de typage moléculaire ont été utilisées, le MLST et la PFGE.

4.1. Typage par Multilocus Sequence Typing selon le schéma de l'Institut Pasteur (MLST^P)

Cette méthode de typage est couramment utilisée pour étudier des populations bactériennes. Dans ce travail, les souches ont été typées par MLST selon le schéma proposé par l'Institut Pasteur (http://pubmlst.org/abaumannii/info/primers_Pasteur.shtml). Le principe repose sur le séquençage de sept gènes de ménage *cpn*60, *fus*A, *glt*A, *pyr*G, *rec*A, *rpl*B et *rpo*B. Les

séquences nucléotidiques obtenues sont ensuite analysées en utilisant la base de données MLST *Acinetobacter* (http://pubmlst.org/abaumannii/). Ainsi, pour chaque gène séquencé, un numéro d'allèle est attribué. La somme des sept allèles permet ainsi d'assigner un numéro de ST à la souche. Un nouveau ST sera soumis si la mutation d'au moins un des gènes de ménage est confirmée.

Les conditions expérimentales requises pour le séquençage de chaque gène sont présentées sur le site Internet de l'Institut Pasteur. Le **Tableau IV** présente les caractéristiques des sept gènes de ménage ainsi que les amorces utilisées pour les séquencer.

TABLEAU IV. Caractéristiques des gènes et des amorces utilisées pour le typage par MLST selon le schéma de Pasteur.

Locus	Fonction du gène	Séquence sens (5' à 3')	Séquence anti-sens (5' à 3')
*cpn*60	60-KDa chaperonin	ACTGTACTTGCTCAAGC	TTCAGCGATGATAAGAAGTGG
*fus*A	Facteur d'élongation EF-G	ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT	CCAACATACKYTGWACACCTTTGTT
*glt*A	Citrate synthase	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG
*pyr*G	CTP synthase	GGTGTTGTTTCATCACTAGGWAAAGG	ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA
*rec*A	Facteur de recombinaison homologue	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC
*rp*IB	Sous-unité ribosomale 50S de la protéine L2	GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC	CACCACCACCRTGYGGGTGATC
*rpo*B	Sous-unité B de l'ARN polymérase	GGCGAAATGGCDGARAACCA	GARTCYTCGAAGTTGTAACC

4.2. Typage par électrophorèse en champ pulsé (PFGE)

Cette méthode, qui utilise la macrorestriction génomique, est à ce jour encore la méthode reconnue comme étant celle de référence pour typer les souches d'*A. baumannii* isolées dans des contextes d'épidémies hospitalières. Elle permet d'atteindre

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MEMOIRES

un pouvoir discriminant très élevé. Pour vérifier leur clonalité, les souches ayant un ST identique ont été typées par PFGE.

L'enzyme de restriction utilisée pour l'étude a été *Apa*I et le protocole suivi a été celui décrit par Seifert *et al.* (Seifert *et al.* 2005). Les fragments d'ADN ont été séparés dans le système CHEF-DRIII (Biorad, Marne La Coquette, France) à 6 V/cm et 14°C pour 21 heures avec des impulsions variant de 3 à 20 secondes. L'analyse assistée par ordinateur a été réalisée en utilisant le logiciel fingerpriting II (Biorad, Marne La Coquette, France) avec la méthode d'unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) et le coefficient de Dice pour la comparaison des bandes d'intérêts. Un type de PFGE était défini par un ensemble d'isolats montrant ≥ 80% de similarités.

RESULTATS

1. Prélèvements des animaux

Entre le 10 avril 2015 et le 10 juin 2015, 150 animaux ont été prélevés, donnant lieu à 150 écouvillons buccaux et 149 écouvillons rectaux (l'écouvillonnage rectal n'a pas été effectué sur le chat n°67). La population animale étudiée était composée de 46 chats et 104 chiens. Ces animaux venaient en consultation en médecine préventive à l'Ecole Vétérinaire de Nantes, dans le but d'être vaccinés. De ce fait, ces chats et chiens étaient en bonne santé générale (ni blessure, ni infection, …) et non hospitalisés au moment de la consultation. Les prélèvements étaient effectués sur Nantes mais les animaux écouvillonnés se répartissent sur tout le département de Loire-Atlantique (44) (seul l'animal n°79 était originaire d'Angers, département du Maine et Loire, 49).

2. Recherche d'*Acinetobacter*

Au total, vingt animaux ont été retrouvés porteurs d'au moins une espèce appartenant au genre *Acinetobacter*, soit une prévalence de portage de 13,3% (IC95%: 7,5 – 19,1%). La **Figure 1** présente l'aspect des colonies sur les deux géloses ensemencées. Parmi ces vingt animaux, 17 étaient porteurs d'une seule espèce d'*Acinetobacter*, un était porteur de deux espèces différentes d'*Acinetobacter* (animal n°125), et deux étaient porteurs de trois espèces différentes d'*Acinetobacter* (animaux n°45 et 47) (**Tableau V**). Toutes les souches ont été identifiées par MALDI-TOF MS et cette identification a été confirmée par le séquençage du gène *rpo*B. Donc, deux souches (animaux n°21 et 43) n'ont pas pu être identifiées par MALDI-TOF MS. Le séquençage *rpo*B a permis d'identifier un *A. calcoaceticus*. Par ailleurs, deux souches ont été faussement identifiées par MALDI-TOF MS comme étant des *A. haemolyticus*

(animaux n°44 et 45), en réalité il s'agissait d'*A. beijerinckii* (identification par séquençage *rpo*B). Une autre souche a été faussement identifiée par MALDI-TOF MS comme étant un *A. haemolyticus* (animal n°53), alors que le séquençage *rpo*B l'a identifiée comme un *A. calcoaceticus*.

Quatre des vingt animaux étaient porteurs de l'espèce *A. baumannii,* ce qui représente 1/5 de ces animaux. Sur l'ensemble de la population étudiée, la prévalence du portage d'*A. baumannii* était de 2,7% (IC95%: 0,1 – 5,3%). Parmi ces quatre animaux positifs à *A. baumannii*, trois étaient porteurs de la souche au niveau de la cavité buccale et un avait un portage rectal.

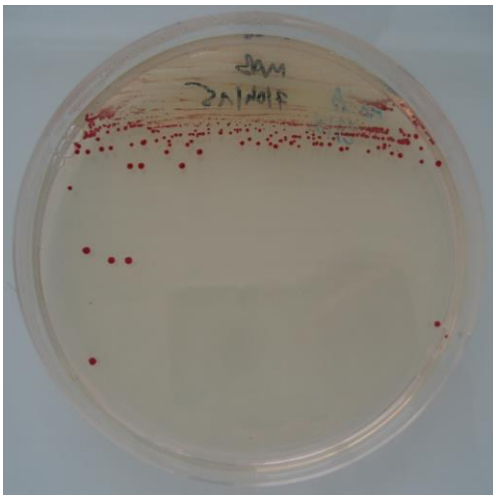
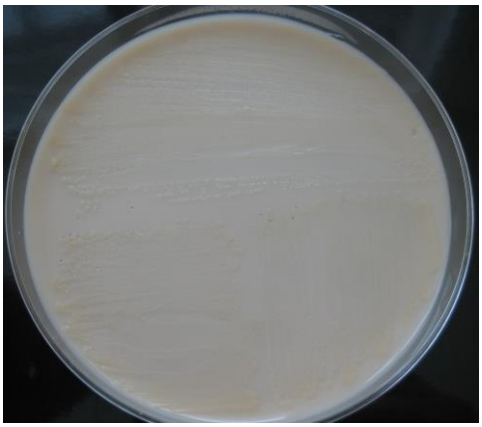
A.  **B.** 

FIGURE 1. Cultures d'*A. baumannii* (Souche de l'animal n°4).

A. *Gélose ChromAgar™ Acinetobacter base* (ChroMagar) : colonies rouges d'*A. baumannii* ; **B.** *Gélose UTI*® (Oxoïd) : colonies beiges d'*A. baumannii.*

TABLEAU V. Caractéristiques des 20 souches d'*Acinetobacter* spp. isolées à partir des 150 animaux étudiés.

	Espèce animale	Identification par MALDI-TOF	Identification par séquençage du gène *rpo*B	Site d'isolement de la bactérie
Animal n°1	Chat	*A. lwoffi*	*A. lwoffi*	Fécal
Animal n°4	**Chien**	***A. baumannii***	***A. baumannii***	**Buccal**
Animal n°8	**Chien**	***A. baumannii***	***A. baumannii***	**Fécal**
Animal n°9	Chien	*A. lwoffi*	*A. lwoffi*	Buccal
Animal n°15	**Chien**	***A. baumannii***	***A. baumannii***	**Buccal**
Animal n°19	Chien	*A. ursingii*	*A. ursingii*	Buccal
Animal n°21	Chien	Pas d'identification	*A. calcoaceticus*	Buccal
Animal n°29	Chien	*A. lwoffi*	*A. lwoffi*	Buccal
Animal n°42	**Chien**	***A. baumannii***	***A. baumannii***	**Buccal**
Animal n°43	Chien	Pas d'identification	*A. calcoaceticus*	Fécal
Animal n°44	Chien	*A. haemolyticus*	*A. beijerinckii*	Buccal
Animal n°45	Chien	*A. calcoaceticus*	*A. calcoaceticus*	Buccal
		A. haemolyticus	*A. beijerinckii*	Buccal
		A. johnsonii	*A. johnsonii*	Fécal
Animal n°47	Chien	*A. calcoaceticus*	*A. calcoaceticus*	Fécal
		A. johnsonii	*A. johnsonii*	Fécal
		A. pittii	*A. pittii*	Buccal
Animal n°48	Chat	*A. johnsonii*	*A. johnsonii*	Buccal
Animal n°53	Chat	*Acinetobacter* DNA	*A. calcoaceticus*	Buccal
Animal n°57	Chien	*A. ursingii*	*A. ursingii*	Buccal
Animal n°61	Chien	*A. johnsonii*	*A. johnsonii*	Fécal
Animal n°93	Chat	*A. lwoffi*	*A. lwoffi*	Buccal
Animal n°125	Chien	*A. calcoaceticus*	*A. calcoaceticus*	Buccal
		A. guillouiae	*A. guillouiae*	Buccal
Animal n°127	Chat	*A. johnsonii*	*A. johnsonii*	Buccal

2.1. Caractéristiques des animaux porteurs d'*A. baumannii*

Quatre animaux ont été identifiés comme porteurs d'*A. baumannii*. Ils appartenaient tous à des propriétaires distincts. Le **Tableau VI** présente les informations inhérentes à chacun de ces quatre animaux.

TABLEAU VI. Informations collectées sur les quatre animaux porteurs d'*A. baumannii*.

		Animal n°4	Animal n°8	Animal n°15	Animal n°42
Espèce animale		Chien	Chien	Chien	Chien
Sexe		Mâle	Mâle	Femelle	Mâle
Age (en années)		9	4	1	5
Lieu de résidence		Nantes	Nantes	Casson	Couëron
Milieu de vie		Urbain	Semi-urbain	Rural	Semi-urbain
Mode de vie		Appartement	Jardin clôturé	Jardin clôturé	Jardin clôturé
Alimentation		Aliment sec	Aliment sec	Aliment sec	Aliment sec
Vie en communauté avec d'autres animaux		Non	Non	Oui : 1 chat	Oui : 1 chien (animal n°43)
Hospitalisation dans l'année		Non	Non	Non	Non
Intervention chirurgicale dans le mois et/ou l'année		Non	Non	Non	Non
Antibiothérapie dans le mois		Non	Non	Non	Non
Traitement antiparasitaire	Externe	Non	Non	Non	9/an
	Interne	4/an	Non	2/an	4/an

Les quatre animaux porteurs d'*A. baumannii* étaient des chiens, trois étaient des mâles et le quatrième une femelle. La moyenne d'âge de ces quatre spécimens était de 4,8 ans.

Deux animaux résidaient à Nantes même. Le domicile de l'animal n°4 se situait dans le centre ville de Nantes, près de La Loire et du centre hospitalier universitaire. L'animal n°8 résidait près de L'Erdre, au nord de Nantes. L'animal n°15 résidait dans le centre de Casson, qui est une commune rurale située en Loire-Atlantique (44), à 22 kilomètres au nord de Nantes. Enfin, l'animal n°42 vivait dans le centre de Couëron, une commune urbaine également située en Loire-Atlantique (44) près de La Loire, à 16 kilomètres à l'ouest de Nantes. L'ensemble de ces animaux vivait dans un espace clos.

Deux des quatre animaux vivaient en communauté avec d'autres animaux. L'animal n°15, vivait en communauté avec un chat qui n'a malheureusement pas été prélevé. Il est donc impossible de savoir si ce dernier était porteur ou non d'un *A. baumannii*. En revanche, un chien vivait en communauté avec l'animal n°42, il a été

inclus dans cette étude mais nous n'avons pas retrouvé d'*A. baumannii*. Il était toutefois porteur d'un *A. calcoaceticus*.

Aucun des animaux n'a eu de traitement antibiotique dans le mois précédant le prélèvement. Toutefois, seul un animal (n°8) n'a jamais reçu de traitement antiparasitaire.

2.2. Sensibilité aux antibiotiques des *A. baumannii*

Les sensibilités des quatre souches d'*A. baumannii* vis-à-vis de 16 antibiotiques a été testée et les résultats sont présentés dans le **Tableau VII**.

TABLEAU VII. Sensibilité aux antibiotiques des quatre souches d'*A. baumannii* isolées chez les animaux étudiés.

	Animal n°4	Animal n°8	Animal n°15	Animal n°42
PTZ	R	R	S	S
AMX	R	R	I	I
AMC	R	R	I	I
TIC	R	R	S	S
TCC	R	R	S	S
CAZ	S	S	S	S
IPM	R	R	S	S
AN	S	S	S	S
TOB	R	R	S	S
GM	R	R	S	S
SXT	R	R	S	S
CIP	R	R	S	S
DO	R	R	S	R
TIG	S	S	S	S
COL	S	S	S	S
RA	S	S	S	S

PTZ: pipéracilline + tazobactam; AMX: amoxicilline; AMC: amoxicilline + acide clavulanique; TIC: ticarcilline; TCC: ticarcilline + acide clavulanique; CAZ: ceftazidime; IPM: imipénème; AN: amikacine; TOB: tobramycine; GM: gentamicine; SXT: Sulfaméthoxazole + triméthoprime; CIP: ciprofloxacine; DO: doxycycline; TIG: tigécycline; COL: colistine; RA: rifampicine; S: sensible; I: intermédiaire; R: résistant.

Les souches isolées des animaux n°4 et 8 présentaient une résistance à toutes les β-lactamines testées, y compris à l'imipénème, et conservaient juste une sensibilité vis-à-vis de la ceftazidime. De même, ces deux souches étaient résistantes à la tobramycine, gentamycine, triméthoprime + sulfaméthoxazole, ciprofloxacine et à la doxycycline. Les souches isolées des animaux n°15 et 42 étaient sensibles à tous les antibiotiques testés, excepté à l'amoxicilline, avec ou sans inhibiteur. Finalement, la souche d'*A. baumannii* isolée chez l'animal n°42 présentait une résistance à la doxycycline (**Figure 2**).

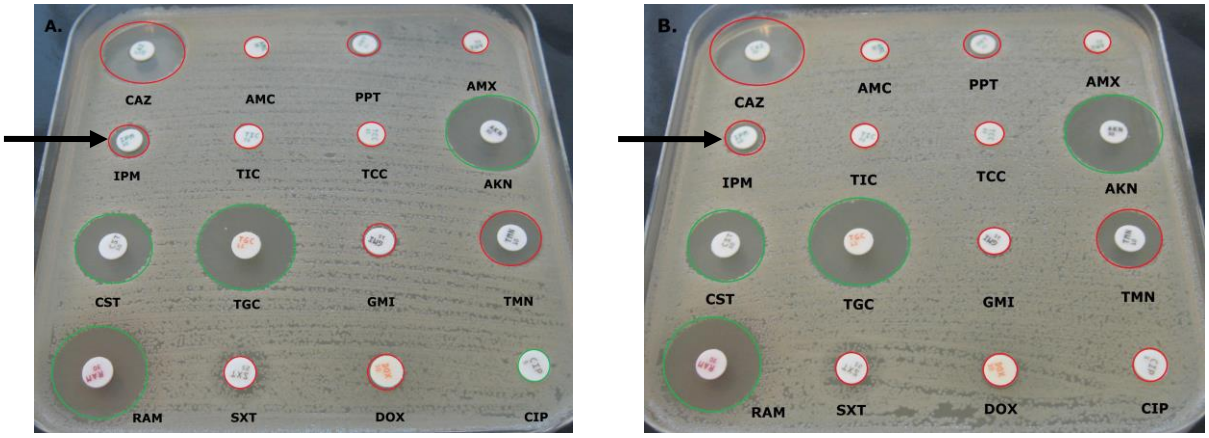


FIGURE 2. Antibiogrammes des deux souches *d'A. baumannii* résistantes à l'imipénème.

CAZ: ceftazidime; AMC: amoxicilline + acide clavulanique; PPT: pipéracilline + tazobactam; AMX: amoxicilline; IPM: imipénème; TIC: ticarcilline; TCC: ticarcilline + acide clavulanique; AKN: amikacine; CST: colistine; TGC: tigécycline; GMI: gentamycine; TMN: tobramycine; RAM: rifampicine; SXT: sulfaméthoxazole + triméthoprime; DOX: doxycycline; CIP: ciprofloxacine.

En vert: souche sensible à l'antibiotique; en rouge: souche résistante à l'antibiotique.

A. Souche d'*A. baumannii* 4B : la flèche indique la résistance à l'imipénème. **B.** Souche d'*A. baumannii* 8F : la flèche indique la résistance à l'imipénème.

La PCR en temps réel a été réalisée sur les deux souches d'*A. baumannii* résistantes à l'imipénème (animaux n°4 et 8) afin d'identifier le mécanisme de résistance. Les résultats ont montré que les deux souches étaient porteuses du gène $bla_{\text{OXA-23-like}}$, codant pour la carbapénémase OXA-23.

2.3. Typage des souches d'*A. baumannii*

Le typage par MLST[P] a été réalisé sur les quatre souches d'*A. baummannii*. Trois ST différents ont été obtenus (**Tableau VIII**). Les souches isolées des animaux n°4 et 8 possédaient le même ST25. L'animal n°42 avait une souche d'*A. baumannii* appartenant au ST250. Enfin, nous avons mis en évidence une souche (animal n°15) avec un nouveau ST. L'allèle attribué pour le gène *pyr*G ne concordait pas à 100% avec l'un des allèles connus dans la base de données. Donc, un nouveau numéro d'allèle a été attribué par la base de données MLST[P] qui était l'allèle 59, et le ST753 a été attribué à la souche.

TABLEAU VIII. Résultats du typage par MLST pour les quatre souches d'*A. baumannii* isolées chez les animaux étudiés.

N° animal	Gènes testés par typage MLST							Sequence type (ST)
	cpn60	*fusA*	*gltA*	*pyrG*	*recA*	*rpIB*	*rpoB*	
Animal 4	3	3	2	4	7	2	4	25
Animal 8	3	3	2	4	7	2	4	25
Animal 15	3	3	101	**59**	4	4	2	**753**
Animal 42	50	3	6	1	3	4	4	250

Concernant les deux souches avec le même ST (souches n°4 et n°8), leur clonalité a été étudiée par PFGE. En utilisant la limite de ≥ 80% de similarités comme

Rapport-Gratuit.com

seuil, nous pouvons voir que les deux souches présentent le même profil électrophorétique, démontrant qu'elles sont clonalement reliées. La **Figure 3** présente le gel obtenu après électrophorèse.

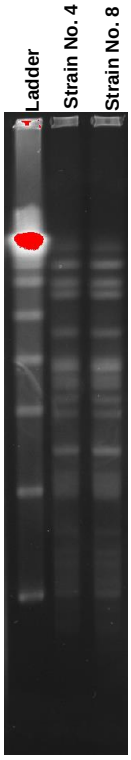


FIGURE 3. Electrophorèse en champ pulsé des deux souches d'*A. baumannii* résistantes à l'imipénème et ayant le même sequence type.

2.4. Caractéristiques des animaux porteurs d'*Acinetobacter* spp.

Le **Tableau IX** résume les informations collectées sur les animaux porteurs de souches d'*Acinetobacter* autres qu'*A. baumannii*. Sur les seize animaux, onze (69%) étaient des chiens et pour treize d'entre eux (81%) le portage des *Acinetobacter* était buccal.

TABLEAU IX. Informations collectées sur les 16 animaux porteurs d'*Acinetobacter* spp.

N° animal	Espèce animale	Sexe	Age (en années)	Lieu de résidence	Milieu de vie	Mode de vie	Alimentation	Vit en communauté avec d'autres animaux	Hospitalisation dans l'année	Intervention chirurgicale dans l'année	Antibiothérapie dans le mois et/ou l'année	Traitement antiparasitaire	
												Externe	Interne
Animal 1	Chat	Mâle	6	Orvault	Urbain	Jardin non clôturé	Sèche et humide	Oui : 1 chat	Non	Non	Non	Non	Non
Animal 9	Chien	Femelle	5	Chapelle s/ Erdre	Urbain	Jardin clôturé	Familiale et sèche	Non	Non	Non	Non	12/an	Non
Animal 19	Chien	Femelle	4	Thouaré s/ Loire	Urbain	Jardin clôturé	Sèche	Non	Non	Non	Non	9/an	4/an
Animal 21	Chien	Femelle	1	St Mars de Coutais	Semi-urbain	Jardin clôturé	Sèche	Oui : 2 chiens	Non	Non	Non	Ne sait pas	Ne sait pas
Animal 29	Chien	Mâle	0	St Sébastien s/ Loire	Urbain	Appartement	Sèche	Oui : 1 chat	Non	Non	Non	12/an	Non
Animal 43	Chien	Femelle	3	Couëron	Semi-urbain	Jardin clôturé	Sèche	Oui : 1 chien	Non	Non	Non	Non	4/an
Animal 44	Chien	Mâle	1	Nantes	Semi-urbain	Jardin clôturé	Sèche	Oui: 1 chien	Non	Non	Non	12/an	4/an
Animal 45	Chien	Mâle	0	Nantes	Semi-urbain	Jardin clôturé	Sèche	Oui : 1 chien	Non	Non	Non	12/an	8/an
Animal 47	Chien	Mâle	0	St Julien de Concelles	Urbain	Appartement	Sèche	Non	Non	Non	Non	Non	8/an
Animal 48	Chat	Mâle	1	Ste Luce s/ Loire	Urbain	Jardin clôturé	Sèche	Oui : 1 cochon d'inde	Non	Non	Non	Non	Non
Animal 53	Chat	Femelle	4	Nantes	Semi-urbain	Jardin clôturé	Sèche	Non	Non	Non	Non	12/an	Non
Animal 57	Chien	Mâle	2	Nantes	Urbain	Jardin clôturé	Sèche	Oui : 1 chien	Non	Non	Non	4/an	4/an
Animal 61	Chien	Mâle	14	Carquefou	Urbain	Jardin clôturé	Sèche	Oui : 1 chien	Non	Non	Non	-	-
Animal 93	Chat	Mâle	4	Nantes	Urbain	Appartement	Sèche	Oui : 1 lapin	Non	Non	Non	4/an	4/an
Animal 125	Chien	Femelle	2	Carquefou	Semi-urbain	Jardin clôturé	Sèche	Non	Non	Non	Non	12/an	4/an
Animal 127	Chat	Femelle	0	St Jean de Boiseau	Semi-urbain	Jardin clôturé	Sèche et humide	Non	Non	Non	Non	Non	Non

Deux animaux (n°44 et 45) étaient porteurs d'*A. beijerinckii* au niveau buccal (**Tableaux V et IX**). Ils appartenaient au même propriétaire. L'animal n°45 était par ailleurs porteur d'*A. calcoaceticus* et *A. johnsonii*. Concernant le portage d'*A. calcoaceticus,* cette espèce a été retrouvée chez six animaux (n°21, 43, 45, 47, 53, 125). Cinq étaient des chiens et pour quatre d'entre eux (67%), la bactérie a été retrouvée dans la cavité buccale. Les lieux de résidence de ces animaux étaient variés. L'espèce *A. guillouiae* a été retrouvée chez un seul animal (n°125), un chien, au niveau de sa cavité buccale. *A. johnsonii* a quant à lui été retrouvé chez cinq animaux (n°45, 47, 48, 61 et 127), dont trois chiens, avec un portage à prédominance rectale (trois animaux sur cinq). *A. lwoffi* a été identifié chez deux chiens et deux chats (n°1, 9, 29, 93), avec un portage essentiellement buccal (75%). Un seul animal a été porteur d'*A. pittii* (n°47) et il s'agissait d'un chien avec un portage buccal. Enfin, *A. ursingii* était présent au niveau buccal chez deux chiens (n°19 et 57).

La **Figure 4** représente le nombre de chiens et de chats domestiques porteurs d'autres *Acinetobacter* en comparaison avec ceux porteurs d'*A. baumannii.*

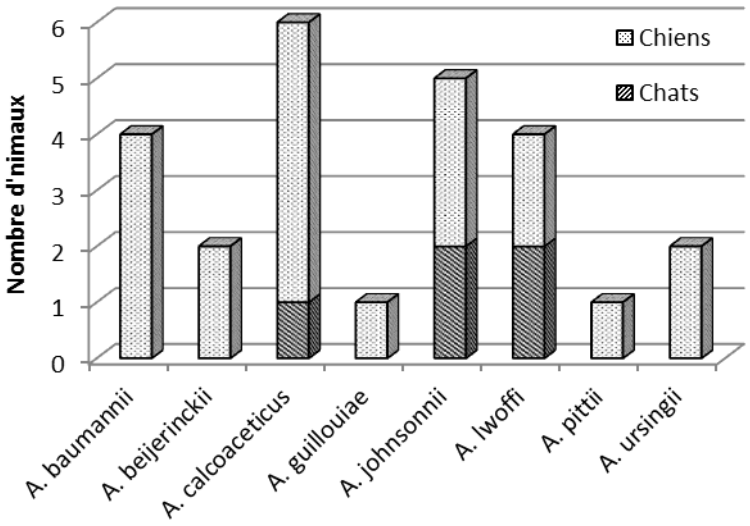


FIGURE 4. Espèces animales porteuses d'*Acinetobacter* spp.

2.5. Sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Acinetobacter* autres qu'*A. baumannii*

Globalement, toutes les espèces d'*Acinetobacter* spp. qui ont été isolées dans cette étude étaient sensibles à toutes les classes d'antibiotiques testées, excepté pour l'*A. johnsonii* isolé de l'animal n°48 qui était résistant au triméthoprime + sulfaméthoxazole. Par ailleurs, la sensibilité des souches vis-à-vis de l'amoxicilline et de la ceftazidime était diminuée dans un peu moins de la moitié des cas (**Tableau X**).

TABLEAU X. Sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Acinetobacter* spp. isolées des animaux porteurs.

		Antibiotiques testés																
No. animal	Name of the specie	AMX	AMC	PTZ	TIC	TCC	CAZ	IPM	AK	TOB	GM	NET	SXT	CIP	DO	TIG	COL	RA
Animal 1	*A. lwoffi*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
Animal 9	*A. lwoffi*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
Animal 19	*A. ursingii*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
Animal 21	*A. calcoaceticus*	I	I	S	S	S	I	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
Animal 29	*A. lwoffi*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
Animal 43	*A. calcoaceticus*	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
Animal 44	*A. beijerinckii*	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
Animal 45	*A. calcoaceticus*	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
	A. beijerinckii	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
	A. johnsonii	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
Animal 47	*A. calcoaceticus*	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
	A. johnsonii	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
	A. pittii	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	S	S	S
Animal 48	*A. johnsonii*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	R	S	S	S	S	S
Animal 53	*A. calcoaceticus*	I	I	S	S	S	R	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	*NR*	S	S
Animal 57	*A. ursingii*	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	*NR*	S	S
Animal 61	*A. johnsonii*	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	*NR*	S	S	S	*NR*	S	S
Animal 93	*A. lwoffi*	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S
Animal 125	*A. calcoaceticus*	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S
	A. guillouiae	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S
Animal 127	*A. johnsonii*	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	*NR*	S	S

AMX: amoxicilline; AMC: amoxicilline + acide clavulanique; TZP: pipéracilline + tazobactam; TIC: ticarcilline; TCC: ticarcilline + acide clavulanique; CAZ: ceftazidime; IPM: imipénème; AK: amikacine; TOB: tobramycine; GEN: gentamicine; NET: netilmycine; SXT: sulfaméthoxazole + triméthoprime; CIP: ciprofloxacine; DO: doxycyline, TGC: tigécycline; COL: colistine; RA: rifampicine; *NR*: non réalisé; S: sensible; I: intermédiaire; R: résistant.

3. Entérobactéries multi-résistantes

Parmi les 150 animaux inclus dans cette étude, quinze étaient porteurs d'une entérobactérie multi-résistante (**Tableau XI**): il s'agissait de deux animaux porteurs d'une souche produisant une BLSE (animal n°56 et 115) et de treize animaux porteurs d'une souche produisant une CHN (animaux n°15, 31, 32, 35, 40, 50, 89, 91, 107, 120, 123, 131, 141). La prévalence du portage d'entérobactéries multi-résistantes était donc respectivement de 1,3% (IC95%: 0,0 – 3,1%) pour les BLSE et 8,7% (IC95%: 4,2 – 13,2%) pour les CHN.

La **Figure 5A** montre une entérobactérie productrice d'une BLSE. Les diamètres d'inhibition obtenus avec l'antibiotique seul et l'antibiotique combiné avec la cloxacilline sont de taille identique. En revanche, le diamètre d'inhibition de l'antibiotique + acide clavulanique est plus large de ≥ 5 mm, ce qui définit une BLSE. Le même phénomène est observé pour les entérobactéries productrices d'une CHN (**Figure 5B**). Toutefois, dans ce cas, c'est le diamètre d'inhibition de l'antibiotique + cloxacilline qui est plus large de ≥ 5 mm alors que le diamètre de l'antibiotique avec l'acide clavulanique est similaire à celui de l'antibiotique seul (**Figure 5**).

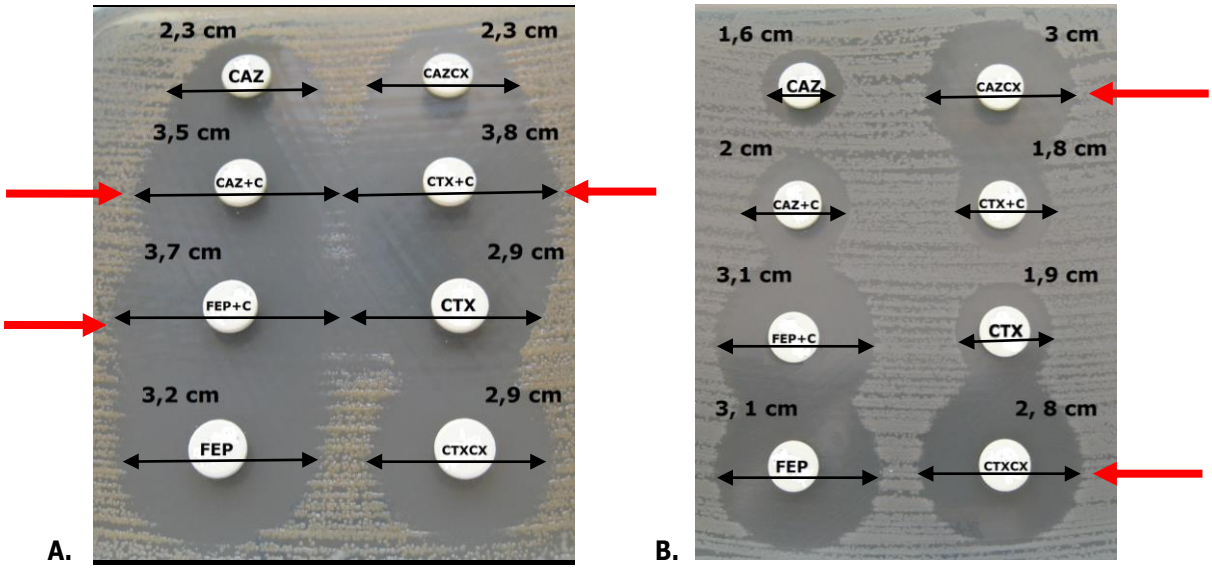


FIGURE 5. Test combiné des disques mettant en évidence une entérobactérie BLSE ou CHN.

CAZ: ceftazidime; CAZ+C: ceftazidime + acide clavulanique; FEP+C: céfépime + acide clavulanique; FEP: céfépime; CAZCX: ceftazidime + cloxacilline; CTX+C: céfotaxime + acide clavulanique; CTX: céfotaxime; CTXCX: céfotaxime + cloxacilline.

A. Souche 56F BLSE (β-lactamase à spectre étendu) : les flèches indiquent les disques d'antibiotique + acide clavulanique, un phénomène de synergie est observé. **B.** Souche 120F CHN (céphalosporinase de haut niveau) : les flèches indiquent les disques d'antibiotique + cloxacilline, un phénomène de synergie est observé.

Dans notre étude, les deux entérobactéries productrices de BLSE étaient un *Enterobacter cloacae,* isolé du prélèvement rectal de l'animal n°56 et une *Serratia fonticola,* isolée du prélèvement buccal de l'animal n°115. Ces deux souches restaient sensibles aux carbapénèmes.

Les entérobactéries possédant une CHN étaient représentées par plusieurs espèces : *Citrobacter* spp. (trois animaux), *Enterobacter cloacae* (deux animaux), *Escherichia coli* (deux animaux), *Hafnia alvei* (trois animaux), et *Morganella morganii* (trois animaux) (**Figure 6**). Aucune de ces souches n'était résistante aux carbapénèmes. Neuf de ces souches ont été isolées au niveau rectal, les quatre autres, au niveau buccal.

Il est à noter que l'animal n°15 était porteur à la fois d'une entérobactérie productrice de CHN, et d'un *A. baumannii* (cf **Tableau VI** pour les informations collectées sur l'animal). C'était le seul animal qui combinait deux genres différents de BMR, sur les 150 animaux prélevés.

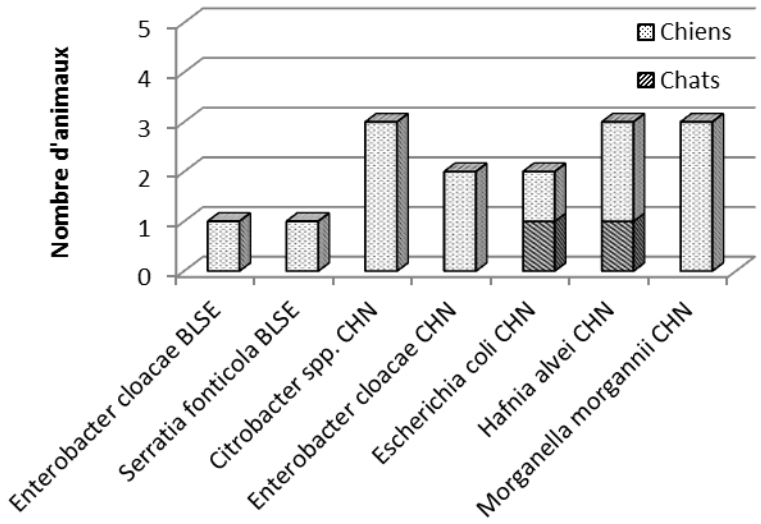


FIGURE 6. Répartition des espèces d'entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre étendu et de céphalosporinases de haut niveau chez les animaux prélevés.

BLSE: β-lactamase à spectre étendu ; CHN: céphalosporinase de haut niveau

TABLEAU XI. Entérobactéries multi-résistantes: identification bactérienne et susceptibilité aux antibiotiques.

	N° animal	Identification bactérienne : MALDI-TOF	AMP	TZP	AMX	AMC	TIC	TCC	CF	FOX	CTX	CAZ	IPM	MEM	ETP
BLSE	Animal 56	*Enterobacter cloacae*	*NR*	R	R	R	R	S	*NR*	*NR*	*NR*	R	S	S	S
	Animal 115	*Serratia fonticola*	R	S	R	R	R	S	R	I	R	S	S	S	S
CHN	Animal 15	*Morganella morganii*	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S
	Animal 31	*Hafnia alvei*	R	S	R	R	S	S	R	R	I	R	S	S	S
	Animal 32	*Morganella morganii*	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S
	Animal 35	*Hafnia alvei*	*NR*	R	R	R	R	R	*NR*	*NR*	*NR*	R	S	S	S
	Animal 40	*Hafnia alvei*	*NR*	R	R	R	R	R	*NR*	*NR*	*NR*	R	S	S	S
	Animal 50	*Enterobacter cloacae*	*NR*	R	R	R	R	R	*NR*	*NR*	*NR*	R	S	S	S
	Animal 89	*Enterobacter spp.*	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	Animal 91	*Escherichia coli*	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	Animal 107	*Morganella morganii*	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S
	Animal 120	*Escherichia coli*	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	Animal 123	*Citrobacter spp.*	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	Animal 131	*Citrobacter freundii*	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	Animal 141	*Citrobacter freundii*	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I

AM: ampicilline; TZP: pipéracilline + tazobactam; AMX: amoxicilline; AMC: amoxicilline + acide clavulanique; TIC: ticarcilline; TCC: ticarcilline + acide clavulanique; CF: céfalotine; FOX: céfoxitine; CTX: céfotaxime; CAZ: ceftazidime; IPM: imipénème; MEM: méropénème; ETP: ertapénème; *NR*: non réalisé; S: sensible; I: intermédiaire; R: résistant.

BLSE: Bêta-Lactamase à Spectre Etendu; CHN: Céphalosporinase de Haut Niveau.

DISCUSSION

Dans notre étude, nous avons mis en évidence un portage d'*A. baumannii* et d'entérobactéries multi-résistantes chez des animaux de compagnie n'ayant pas eu d'antécédents d'hospitalisation.

Concernant *A. baumannii*, même si son existence ubiquitaire dans la nature a été considérée par quelques auteurs comme une idée fausse (Towner, 2009), plusieurs études récentes ont incontestablement souligné la présence de réservoirs extra-hospitaliers (Eveillard *et al.,* 2013 ; Belmonte *et al.,* 2014 ; Rafei *et al.,* 2015). Ces observations ont été établies grâce à l'implémentation récente de méthodes moléculaires comme le séquençage du gène *rpo*B, améliorant la détection et l'identification des *Acinetobacter* au rang d'espèce.

Parmi ces réservoirs, le réservoir animal semble réellement significatif. Des études antérieures ont déjà montré un portage d'*A. baumannii* chez des animaux tels que des chevaux, des chats ou encore des chiens, mais jamais dans nos latitudes (Rafei *et al.,* 2015 ; Kempf *et al.,* 2012, c ; Hamouda *et al.* 2011 ; Belmonte *et al*., 2014). Notre étude est la première à mettre en évidence un portage d'*A. baumannii* chez des animaux de compagnie vivant en France métropolitaine. Précédemment, Belmonte *et al*. ont étudié le portage de la bactérie chez des animaux de compagnie dans des cliniques vétérinaires sur l'Ile de La Réunion (Belmonte *et al*., 2014) et ont montré une prévalence de 6,5%. Deux chats et sept chiens étaient porteurs. Ils avaient été prélevés dans quatre cliniques vétérinaires différentes sur l'Ile. Par ailleurs, huit des neuf isolats possédaient le même profil de sensibilité aux antibiotiques (sensible aux carbapénèmes mais résistant à la ciprofloxacine et au cotrimoxazole). Ces huit isolats étaient tous de ST25 et le typage par PFGE a montré un lien étroit entre eux. Le neuvième isolat était sensible à tous les antibiotiques testés, il était de ST239 et n'était pas relié aux autres isolats. Quelques facteurs de prédisposition au portage de la bactérie ont été significativement démontrés dans cette étude, comme la durée d'hospitalisation supérieure à 1 journée et un traitement par au moins un antibiotique dans les 15 jours précédant le jour du prélèvement (Belmonte *et al*., 2014). Dans notre étude, la

Rapport-Gratuit.com

prévalence de portage d'*A. baumannii* est plus faible, avec 2,7% (IC95%: 0,1 – 5,3%). Parmi les quatre souches isolées, le ST25 a également été attribué à deux d'entre elles, isolées de chiens. Elles présentaient le même profil électrophorétique après typage par PFGE. Toutefois, contrairement à Belmonte *et al*., nos souches ST25 étaient résistantes aux carbapénèmes et portaient le gène $bla_{\text{OXA-23-like.}}$ Il faut cependant rester prudent sur ces résultats car ces deux chiens avaient été prélevés le même jour dans l'unité de médecine préventive de la clinique vétérinaire. Cette unité comporte six boxs différents qui n'ont pas été tracés pour notre étude, on ne peut ainsi pas exclure que les deux chiens aient été contaminés dans un même box.

Du fait d'une faible prévalence de la bactérie chez les animaux inclus dans notre étude, il nous a été impossible de conclure significativement à une possible association entre le portage d'*A. baumannii* et la présence de certains facteurs de prédisposition tels qu'une hospitalisation dans l'année avant le prélèvement, la prise d'antibiotiques dans le mois ou l'année précédant la visite à la clinique vétérinaire, la vie en communauté avec d'autres animaux ou encore la prise d'un traitement antiparasitaire.

Quelques différences entre les deux études ont été observées. Pour commencer, tous les chats et chiens inclus dans notre étude n'ont été écouvillonnés que dans une seule clinique vétérinaire (Nantes, ONIRIS) contre neuf pour l'étude réalisée sur l'Ile de La Réunion. Par ailleurs, les chats et chiens de compagnie inclus dans notre étude étaient sains et non hospitalisés lors du prélèvement. Pour finir, l'Ile de La Réunion est un territoire français localisé dans l'Océan Indien, où le climat est tropical, alors que notre étude s'est déroulée dans une région à climat tempéré, puisque la période d'écouvillonnage pour notre travail s'est déroulée durant le printemps, période où les températures ne sont pas spécialement élevées.

Comme dans l'article de Belmonte *et al*., aucune information sur les propriétaires des animaux prélevés n'a été demandée. Par conséquent, il est impossible de savoir si les propriétaires des animaux porteurs d'*A. baumannii* ont été hospitalisés et donc s'ils ont pu transmettre la bactérie à leur animal. Il aurait également été intéressant de comparer les souches isolées au sein du CHU de Nantes avec celles isolées au cours de notre étude, pour

voir si les souches circulantes sont identiques, laissant présager une éventuelle transmission des souches d'*A. baumannii* entre le milieu hospitalier et les animaux. Ce travail est un de nos futurs projets.

Parmi les quatre animaux porteurs d'un *A. baumannii*, trois vivaient près de rivières (La Loire et L'Erdre), et sur ces trois animaux, deux étaient porteurs d'une souche résistante aux carbapénèmes. L'une des hypothèses pourrait être que les animaux ont pu être colonisés par *A. baumannii* après consommation de cette eau. En effet, il a déjà été rapporté en France la présence de souches résistantes aux carbapénèmes dans des rivières, et notamment dans la Seine à Paris (Girlich, Poirel et Nordmann, 2010). Par ailleurs, ces quatre chiens vivaient dans des zones closes mais ce qui n'empêchait pas le contact avec d'autres animaux, domestiques ou sauvages. Dans le but de confirmer ces hypothèses, de nouveaux échantillons doivent être prélevés dans l'environnement des animaux concernés.

Des souches d'*A. baumannii* résistantes aux carbapénèmes ont également été décrites chez les animaux, comme chez des porcs, des volailles ou encore des bovins. Le gène de résistance aux carbapénèmes $bla_{\text{OXA-23-like}}$ a été le plus souvent retrouvé (Bayssari *et al.,* 2015). Ce même gène a été retrouvé au Sénégal chez des *A. baumannii* isolés de poux de corps humains (Kempf et al., 2012, c) ou encore en Belgique, chez des *A. baumannii* isolés de chevaux hospitalisés en clinique vétérinaire (Smet *et al.,* 2012). Nos 2 souches appartiennent au ST25. Ce ST a été trouvé, associé au gène $bla_{\text{OXA-72-like,}}$ chez des patients lors d'une épidémie dans des pays méditerranéens (Di Nocera *et al.,* 2011), en Turquie avec une association au gène $bla_{\text{OXA-23-like}}$ ou encore en Grèce avec une association au gène $bla_{\text{OXA-58-like}}$ (Di Popolo *et al.,* 2011). Ce ST est largement répandu dans les épidémies à *A. baumannii* en médecine humaine mais aucune donnée n'est malheureusement disponible sur sa prévalence en-dehors des hôpitaux.

Concernant les autres espèces d'*Acinetobacter* isolées dans cette étude, les résultats ne peuvent être confrontés à la littérature car peu de données sont disponibles. En France, Poirel *et al*. ont trouvé un certain nombre d'espèces appartenant au genre *Acinetobacter*, autre que *baumannii*, chez des vaches laitières. Dans cette étude, les auteurs ont insisté sur le fait que les animaux pouvaient être le réservoir d'*Acinetobacter* spp. (Poirel *et al.,* 2012).

Rapport gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Dans notre étude, le portage des *Acinetobacter* spp. (autres qu'*A. baumannii*) était de 10,7% (IC95%: 9,4 – 11,9%). Par ailleurs, aucune conclusion concrète ne peut être établie sur leur portage: i) les animaux n°1, 57 et 61 étaient des porteurs d'un *Acinetobacter* spp. mais l'animal vivant en communauté avec eux n'était porteur d'aucun *Acinetobacter* spp. ii) les animaux n°44 et 45 avaient le même propriétaire. *A. beijerinckii* a été retrouvé chez les deux animaux. Cependant, l'animal n°5 était aussi porteur de deux autres *Acinetobacter* spp. (*A. calcoaceticus* et *A. johnsonii*) qui n'ont pas été retrouvés chez le second animal. iii) les animaux n°42 et 43 avaient aussi le même propriétaire. Un *A. baumannii* était présent chez le premier animal alors que c'était un *A. calcoaceticus* pour le second. iv) certains animaux étaient porteurs simultanés de différents *Acinetobacter* spp. autres qu'*A. baumannii*: l'animal n°45 était porteur d'un *A. beijerinckii*, d'un *A. calcoaceticus* et d'un *A. johnsonii* ; l'animal n°47 était porteur d'un *A. calcoaceticus*, d'un *A. johnsonii* et d'un *A. pittii* ; l'animal n°125 était porteur d'un *A. calcoaceticus* et d'un *A. guillouiae*. Toutes ces observations nécessitent des études supplémentaires afin de pouvoir conclure sur l'impact des *Acinetobacter* spp. chez les animaux. Parmi toutes ces espèces certaines ont été décrites chez l'homme. C'est le cas par exemple d'*A. pittii*, *A. johnsonii*, ou encore *A. lwoffi*.

Dans notre étude nous avons également mis en évidence des entérobactéries multi-résistantes. Ces bactéries sont décrites depuis de nombreuses années en médecine humaine comme étant responsables d'infections, que ce soit en milieu hospitalier ou en milieu communautaire. Il a également été établi que les animaux d'élevage pouvaient en être porteurs, et donc transmettre ces bactéries à l'homme *via* la chaîne alimentaire (Egervärn *et al.,* 2014 ; Haenni *et al.,* 2014, a ; Petternel *et al.* 2014 ; Geser, Stephan et Hächler, 2012 ; Belmar Campos *et al.,* 2014; Gelinski *et al.,* 2014 ; Zarfel *et al.,* 2014). C'est pourquoi, récemment, des analyses ont été effectuées afin d'étudier le rôle des animaux de compagnie comme réservoir potentiel de ces BMR (So *et al.,* 2012 ; Dierikx *et al.,* 2012 ; Donati *et al.,* 2014 ; Huber *et al.,* 2013 ; Timofte *et al.,* 2011 ; Poirel *et al.,* 2013) mais aussi chez des animaux sains (Haenni *et al.,* 2014, b ; Albrechtova *et al.,* 2014 ; Meyer *et al.,* 2012 ; Murphy *et al.,* 2009).

L'utilisation intempestive d'antibiotiques comme les β-lactamines, tant dans le domaine humain que vétérinaire, a conduit les entérobactéries à devenir de plus en plus

résistantes, jusqu'à développer une résistance aux C3G ou encore aux carbapénèmes. C'est pourquoi, au cours de notre travail, nous avons voulu étudier le portage de ces BMR commensales du tube digestif des mammifères chez des chiens et chats domestiques. Nous avons détecté deux animaux porteurs de souches produisant une BLSE et treize autres porteurs de souches produisant une CHN (8,7%). Chez les entérobactéries, la résistance aux C3G par présence de BLSE est conférée par des plasmides. Les souches dites BLSE positives ont un caractère beaucoup plus épidémiogène que celles qui sont résistantes aux C3G par production d'une CHN, ce qui explique pourquoi les patients porteurs de ces souches BLSE sont isolés. Dans une étude conduite en 2007 sur l'Ile de La Réunion et incluant des patients hospitalisés, la prévalence des entérobactéries CHN était de 5,2% contre 5,8% pour les entérobactéries BLSE (Belmonte *et al.,* 2010).

Concernant la prévalence des souches BLSE, nous remarquons que celle obtenue lors de cette étude (deux animaux sur 150) est faible contrairement à d'autres études menées sur des animaux de compagnie. Par exemple, en Suisse 7,5% des animaux inclus dans l'étude étaient porteurs d'une entérobactérie productrice de BLSE, mais ces animaux présentaient une cystite (Huber *et al.,* 2013). En revanche, à Paris le taux de portage d'entérobactéries productrices de BLSE chez des chiens urbains sains était de 18,5% (Haenni *et al.*, 2014, b). Ou encore, en Côte d'Ivoire, le portage d'entérobactéries productrices de BLSE était de 67% pour des chats et 32% pour des chiens de compagnie, porteurs asymptomatiques (Albrechtova *et al*., 2014). Ces différences de pourcentage peuvent tout d'abord s'expliquer par le choix des animaux inclus dans notre étude. C'est-à-dire que ces derniers provenaient d'une zone géographique limitée, induisant un biais de sélection. Des observations similaires sont faites chez l'homme. Ainsi, d'après le réseau BMR-RAISIN (Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales), en 2012 l'incidence des entérobactéries productrices de BLSE pour 1000 journées d'hospitalisation variait d'une région à une autre en France métropolitaine. Cette incidence était plus élevée pour la région parisienne que pour la région des Pays de La Loire (de 0,6 à 0,8 pour la région parisienne contre 0,4 à 0,6 pour les Pays de La Loire). Contrairement à d'autres études, nous avons isolé chez les animaux de compagnie beaucoup plus d'entérobactéries productrices de CHN que d'entérobactéries productrices de BLSE. Au contraire, en Corée une étude a mis en évidence des *Escherichia coli* multi-résistantes chez des animaux de compagnie, dont parmi

elles 15 bactéries CHN contre 21 BLSE (So *et al*., 2012). Dans notre étude, aucun animal n'était porteur à la fois de souches BLSE et CHN. Des souches d'entérobactérie productrices d'une CTX-M et d'une AmpC en même temps, ont été isolées aux Pays-Bas (Dierikx *et al.*, 2012), en Italie (Donati *et al*., 2014) ou encore en Corée (So *et al*., 2012) chez des animaux de compagnie présentant des infections. Dans notre étude, un animal (n°15) était porteur à la fois d'une entérobactérie productrice de CHN et d'un *A. baumannii*, qui restait sensible à la majorité des antibiotiques testés. Une étude approfondie dans l'environnement de cet animal pourrait être intéressante pour rechercher des éléments pouvant expliquer ce double portage.

L'hyperproduction de β-lactamases AmpC chromosomique est souvent retrouvée chez *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii, E. coli* et *Hafnia alvei* (Rubin et Pitout, 2014). Lors d'une étude conduite sur l'Ile de La Réunion, les principales espèces productrices de CHN étaient des *Enterobacter* spp. alors que pour les bactéries productrices de BLSE il s'agissait surtout d'*E. cloacae* et d'*E. coli* (Belmonte *et al.,* 2010). Dans notre étude, quinze animaux produisaient ces CHN dont: deux *Enterobacter* spp., trois *Citrobacter freundii,* trois *Morganella morganii,* deux *E. coli* et trois *Hafnia alvei*. Ces espèces correspondent à celles retrouvées chez l'homme. Actuellement, les études chez les animaux domestiques sont essentiellement focalisées sur *E. coli* (Rubin et Pitout, 2014). Concernant les BLSE, il s'agissait d'un *E. cloacae* et d'une *Serratia fonticola*. Ce mécanisme de résistance a déjà été associé à ces espèces chez des animaux de compagnie qui étaient malades ou sains (Rubin et Pitout, 2014). Nos résultats concordent ainsi avec ceux de la littérature.

Depuis le début des années 2000, l'on voit apparaître des entérobactéries qui développent des résistances aux carbapénèmes. Cependant, dans notre travail aucune bactérie résistante à cette famille d'antibiotiques n'a été isolée.

Des études supplémentaires seraient nécessaires afin d'identifier les gènes de résistance codant pour ces deux types d'enzymes. Par exemple, pour les BLSE les gènes CTX-M-1 et CTX-M-15 sont les plus courants chez les animaux de compagnie (Rubin et Pitout, 2014). Or ces gènes sont également fréquemment retrouvés en médecine humaine, et notamment chez des clones pandémiques d'*E. coli*. Une étude de la clonalité intra-espèce

des souches productrices de CHN serait également intéressante. De plus, il aurait été intéressant de savoir si les propriétaires des animaux étaient porteurs ou non de ces bactéries afin de statuer sur la transmission homme – animal de ces entérobactéries multi-résistantes. Enfin il serait intéressant d'élargir la recherche d'entérobactéries multi-résistantes, chez les animaux de compagnie, à toute la France. En effet, les résultats obtenus dans cette étude sont difficilement extrapolables puisque les animaux prélevés provenaient d'une zone géographique limitée.

CONCLUSION

Notre étude a permis de mettre en évidence que les animaux de compagnie en France métropolitaine pouvaient être un réservoir de bacilles à Gram négatif multi-résistants.

Tout d'abord, des souches multi-résistantes d'*A. baumannii* peuvent être retrouvées chez des animaux domestiques, même dans nos climats tempérés. Le mécanisme de résistance mondialement connu de type carbapénémase OXA-23 associé au ST25 est également présent dans la ville de Nantes. De plus, les animaux domestiques peuvent être des porteurs asymptomatiques d'autres espèces d'*Acinetobacter*, qui restent eux pour le moment susceptibles aux antibiotiques.

D'autre part, les animaux de compagnie peuvent également être porteurs d'entérobactéries multi-résistantes. Parmi celles-ci, certaines sont productrices de BLSE, potentiellement médiées par un plasmide donc leur résistance est facilement transmissible à d'autres bactéries, alors que les entérobactéries productrices de CHN, principalement chromosomales, sont moins menaçantes.

Des études supplémentaires sont nécessaires. Premièrement, pour compléter cette étude, une investigation au sein de la famille de l'animal peut être intéressante pour rechercher le portage d'*A. baumannii* et d'entérobactéries multi-résistantes chez ses propriétaires. Dans un second temps, une investigation au sein du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes peut être instructive par comparaison des souches d'*A. baumannii* présentes dans l'hôpital avec celles trouvées dans notre étude. Ensuite, il serait intéressant d'étendre cette étude à toute la France, afin de voir si d'autres foyers d'*A. baumannii,* multi-résistants ou non, et d'entérobactéries multi-résistantes peuvent être mis en évidence. Des études seraient également nécessaires afin de caractériser la clonalité des souches d'entérobactéries multi-résistantes et de les comparer avec celles de la littérature.

En conclusion, il est primordial d'encadrer correctement l'usage des anti-infectieux dans les cliniques vétérinaires afin d'éviter le mésusage de ces médicaments et donc l'émergence de bactéries multi-résistantes chez les animaux de compagnie. Par ailleurs, une transmission est potentiellement possible entre les animaux domestiques et les hommes. Aussi, il est essentiel que les médecines humaines et animales travaillent communément dans le but de prévenir la dissémination de telles souches. Enfin, comme la littérature le démontre, les bactéries sont transmises entre les hommes, les animaux et leur environnement. Ainsi le contrôle du bon usage des antibiotiques ne se limite pas seulement aux médecines humaine et animale, mais également à l'agriculture par exemple.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

BIBLIOGRAPHIE

- Albrechtova K, Papousek I, De Nys H, Pauly M, Anoh E, Mossoun A, et al. Low Rates of Antimicrobial-Resistant Enterobacteriaceae in Wildlife in Taï National Park, Côte d'Ivoire, Surrounded by Villages with High Prevalence of Multiresistant ESBL-Producing Escherichia coli in People and Domestic Animals. PLoS ONE [Internet]. 2014 Dec 4 [cited 2015 Sep 23];**9**(12). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4256204/

- Alouache S, Kada M, Messai Y, Estepa V, Torres C, Bakour R. Antibiotic Resistance and Extended-Spectrum β-Lactamases in Isolated Bacteria from Seawater of Algiers Beaches (Algeria). Microbes Environ. 2012 Mar;**27**(1):80–6.

- Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of Acinetobacter baumannii. J Clin Microbiol. 2005 Sep;**43**(9):4382–90.

- Bayssari CA, Dabboussi F, Hamze M, Rolain J-M. Emergence of carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in livestock animals in Lebanon. J Antimicrob Chemother. 2015 Jan 3;**70**(3):950–1.

- Beggs CB, Kerr KG, Snelling AM, Sleigh PA. Acinetobacter spp. and the Clinical Environment. Indoor Built Environ. 2006 Jan 2;**15**(1):19–24.

- Belmar Campos C, Fenner I, Wiese N, Lensing C, Christner M, Rohde H, et al. Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany. Int J Med Microbiol. 2014 Jul;**304**(5-6):678–84.

- Belmonte O, Drouet D, Alba J, Moiton M-P, Kuli B, Lugagne-Delpon N, et al. Évolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'Ile de la Réunion : émergence des bêta-lactamases à spectre élargi. Pathol Biol. 2010 Feb;**58**(1):18–24.

- Belmonte O, Pailhoriès H, Kempf M, Gaultier MP, Lemarié C, Ramont C, et al. High prevalence of closely-related Acinetobacter baumannii in pets according to a multicentre study in veterinary clinics, Reunion Island. Vet Microbiol. 2014 Jun;**170**(3-4):446–50.

- a. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. Distribution of Acinetobacter species on skin of healthy humans. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999 Mar;**18**(3):179–83.

- b. Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL. Isolation of Acinetobacter spp including A. baumannii from vegetables: implications for hospital-acquired infections. J Hosp Infect. 1999 Jul;**42**(3):201–4.

- Blaak H, de Kruijf P, Hamidjaja RA, van Hoek AHAM, de Roda Husman AM, Schets FM. Prevalence and characteristics of ESBL-producing E. coli in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. Vet Microbiol. 2014 Jul;**171**(3-4):448–59.

- Bonnet R. Antibiogramme. 2ème édition. Paris: Editions ESKA, 2006. Chap. 15. β-lactamines et entérobactéries. 141-162

- Bouvresse S, Socolovschi C, Berdjane Z, Durand R, Izri A, Raoult D, et al. No evidence of Bartonella quintana but detection of Acinetobacter baumannii in head lice from elementary schoolchildren in Paris. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2011 Dec;**34**(6):475–7.

- Boyen F, Smet A, Hermans K, Butaye P, Martens A, Martel A, et al. Methicillin resistant staphylococci and broad-spectrum β-lactamase producing Enterobacteriaceae in horses. Vet Microbiol. 2013 Nov;**167**(1-2):67–77.

- Bush K. Extended-spectrum β-lactamases in North America, 1987–2006. Clin Microbiol Infect. 2008 Jan;**14**:134–43.

- Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum β-lactamase producers. Clin Microbiol Infect. 2008 Jan;**14**:117–23.

- Cetin ES, Durmaz R, Tetik T, Otlu B, Kaya S, Çalişkan A. Epidemiologic characterization of nosocomial Acinetobacter baumannii infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. Am J Infect Control. 2009 Feb;**37**(1):56–64.

Rapport-Gratuit.com

- Chen M-Z, Hsueh P-R, Lee L-N, Yu C-J, Yang P-C, Luh K-T. Severe Community-Acquired Pneumonia due to Acinetobacter baumannii. CHEST J. 2001 Oct 1;**120**(4):1072–7.

- Cottell, Jennifer L., Mark A. Webber, et Laura J. V. Piddock. 2012. « Persistence of Transferable Extended-Spectrum-β-Lactamase Resistance in the Absence of Antibiotic Pressure ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56** (9): 4703-6. doi:10.1128/AAC.00848-12.

- Diallo AA, Brugère H, Kérourédan M, Dupouy V, Toutain P-L, Bousquet-Mélou A, et al. Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater. Water Res. 2013 Sep;**47**(13):4719–29.

- Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The Population Structure of Acinetobacter baumannii: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool. PLoS ONE [Internet]. 2010 Apr 7 [cited 2015 Aug 10];5(4). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2850921/

- Dierikx CM, Duijkeren E van, Schoormans AHW, Essen-Zandbergen A van, Veldman K, Kant A, et al. Occurrence and characteristics of extended-spectrum-β-lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. J Antimicrob Chemother. 2012 Jan 6;**67**(6):1368–74.

- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Nat Rev Microbiol. 2007 Jan 12;**5**(12):939–51.

- Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L, van der Reijden TJK, Bernards AT, Nemec A, et al. Prevalence of Acinetobacter baumannii and other Acinetobacter spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. Clin Microbiol Infect. 2005 Apr;**11**(4):329–32.

- Di Nocera PP, Rocco F, Giannouli M, Triassi M, Zarrilli R. Genome organization of epidemic Acinetobacter baumannii strains. BMC Microbiol. 2011 Oct 10;**11**:224.

- Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strains in four Mediterranean

countries with a multilocus sequence typing scheme. Clin Microbiol Infect. 2011 Feb;**17**(2):197–201.

- Dobiasova H, Dolejska M, Jamborova I, Brhelova E, Blazkova L, Papousek I, et al. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among Escherichia coli isolates from zoo animals, Czech Republic. FEMS Microbiol Ecol. 2013 Sep 1;**85**(3):604–11.

- Dohmen W, Bonten MJM, Bos MEH, van Marm S, Scharringa J, Wagenaar JA, et al. Carriage of extended-spectrum β-lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2015 May [cited 2015 Sep 22]; Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X15005649

- Dolejska M, Duskova E, Rybarikova J, Janoszowska D, Roubalova E, Dibdakova K, et al. Plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in Escherichia coli isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. J Antimicrob Chemother. 2011 Jan 4;**66**(4):757–64.

- Donati V, Feltrin F, Hendriksen RS, Svendsen CA, Cordaro G, García-Fernández A, et al. Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in Klebsiella spp. from Companion Animals in Italy. PLoS ONE [Internet]. 2014 Mar 4 [cited 2015 Sep 23];**9**(3). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3942433/

- Egervärn M, Börjesson S, Byfors S, Finn M, Kaipe C, Englund S, et al. Escherichia coli with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and Salmonella on meat imported into Sweden. Int J Food Microbiol. 2014 Feb;**171**:8–14.

- Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriès H, Joly-Guillou M-L. Reservoirs of Acinetobacter baumannii outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. Int J Infect Dis. 2013 Oct;**17**(10):e802–5.

- Ferreira JC, Filho RACP, Andrade LN, Berchieri A, Darini ALC. Detection of chromosomal blaCTX-M-2 in diverse Escherichia coli isolates from healthy broiler chickens. Clin Microbiol Infect. 2014 Oct;**20**(10):O623–6.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- Fournier PE, Richet H, Weinstein RA. The Epidemiology and Control of Acinetobacter baumannii in Health Care Facilities. Clin Infect Dis. 2006 Jan 3;**42**(5):692–9.

- Gelinski JMLN, Bombassaro A, Baratto CM, Vicente VA. Resistance to Extended-Spectrum β-Lactamases in Salmonella from a Broiler Supply Chain. Int J Environ Res Public Health. 2014 Nov;**11**(11):11718–26.

- Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet Res. 2012 Mar 7;**8**:21.

- Girlich D, Poirel L, Nordmann P. First Isolation of the blaOXA-23 Carbapenemase Gene from an Environmental Acinetobacter baumannii Isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jan;**54**(1):578–9.

- Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria Review. J Antimicrob Chemother. 2004 Jan 8;**54**(2):321–32.

- a. Guenther S, Aschenbrenner K, Stamm I, Bethe A, Semmler T, Stubbe A, et al. Comparable High Rates of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Birds of Prey from Germany and Mongolia. PLoS ONE [Internet]. 2012 Dec 31 [cited 2015 Sep 23];**7**(12). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3534101/

- b. Guenther S, Bethe A, Fruth A, Semmler T, Ulrich RG, Wieler LH, et al. Frequent Combination of Antimicrobial Multiresistance and Extraintestinal Pathogenicity in Escherichia coli Isolates from Urban Rats (Rattus norvegicus) in Berlin, Germany. PLoS ONE [Internet]. 2012 Nov 26 [cited 2015 Sep 23];**7**(11). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3506595/

- Gutmann L, Williamson R. Paroi bactérienne et bêta-lactamines. Médecine/Sciences. 1987 Fev;3(2):75-81.

- Gundi VAKB, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, Scola BL. Validation of partial rpoB gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging Acinetobacter species. Microbiology. 2009 Jan 7;**155**(7):2333–41.

- a. Haenni M, Châtre P, Métayer V, Bour M, Signol E, Madec J-Y, et al. Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae in dominant versus subdominant enteric flora in veal calves at slaughterhouse, France. Vet Microbiol. 2014 Jul;**171**(3-4):321–7.

- b. Haenni M, Saras E, Métayer V, Médaille C, Madec J-Y. High Prevalence of blaCTX-M-1/IncI1/ST3 and blaCMY-2/IncI1/ST2 Plasmids in Healthy Urban Dogs in France. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Sep;**58**(9):5358–62.

- Hamouda A, Findlay J, Al Hassan L, Amyes SGB. Epidemiology of Acinetobacter baumannii of animal origin. Int J Antimicrob Agents. 2011 Oct;**38**(4):314–8.

- Hasan B, Islam K, Ahsan M, Hossain Z, Rashid M, Talukder B, et al. Fecal carriage of multi-drug resistant and extended spectrum β-lactamases producing E. coli in household pigeons, Bangladesh. Vet Microbiol. 2014 Jan;**168**(1):221–4.

- Hordijk J, Schoormans A, Kwakernaak M, Duim B, Broens E, Dierikx C, et al. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum β-lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. Front Microbiol [Internet]. 2013 Aug 16 [cited 2015 Sep 23];**4**. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745002/

- Hsueh P-R, Teng L-J, Chen C-Y, Chen W-H, Ho S-W, Luh K-T. Pandrug-Resistant Acinetobacter baumannii Causing Nosocomial Infections in a University Hospital, Taiwan. Emerg Infect Dis. 2002 Aug;**8**(8):827–32.

- Huber H, Zweifel C, Wittenbrink MM, Stephan R. ESBL-producing uropathogenic Escherichia coli isolated from dogs and cats in Switzerland. Vet Microbiol. 2013 Mar;**162**(2-4):992–6.

- Hunter PA, Dawson S, French GL, Goossens H, Hawkey PM, Kuijper EJ, et al. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. J Antimicrob Chemother. 2010 Jan 2;**65**(suppl 1):i3–17.

- Janatova M, Albrechtova K, Petrzelkova KJ, Dolejska M, Papousek I, Masarikova M, et al. Antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae from humans and wildlife in Dzanga-

Sangha Protected Area, Central African Republic. Vet Microbiol. 2014 Jul;**171**(3-4):422–31.

- Johns I, Verheyen K, Good L, Rycroft A. Antimicrobial resistance in faecal Escherichia coli isolates from horses treated with antimicrobials: A longitudinal study in hospitalised and non-hospitalised horses. Vet Microbiol. 2012 Oct;**159**(3-4):381–9.

- Joly-Guillou M-L. Clinical impact and pathogenicity of Acinetobacter. Clin Microbiol Infect. 2005 Nov 1;**11**(11):868–73.

- a. Kempf M, Abdissa A, Diatta G, Trape J-F, Angelakis E, Mediannikov O, et al. Detection of Acinetobacter baumannii in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. Int J Infect Dis. 2012 Sep;**16**(9):e680–3.

- b. Kempf M, Rolain J-M. Emergence of resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii in Europe: clinical impact and therapeutic options. Int J Antimicrob Agents. 2012 Feb;**39**(2):105–14.

- c. Kempf M, Rolain J-M, Diatta G, Azza S, Samb B, Mediannikov O, et al. Carbapenem Resistance and Acinetobacter baumannii in Senegal: The Paradigm of a Common Phenomenon in Natural Reservoirs. PLoS ONE [Internet]. 2012 Jun 20 [cited 2015 May 2];**7**(6). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3380006/

- d. Kempf M, Rolain J-M, Diatta G, Azza S, Samb B, Mediannikov O, et al. Carbapenem resistance and Acinetobacter baumannii in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs. PloS One. 2012;**7**(6):e39495.

- La Scola B, Raoult D. Acinetobacter baumannii in Human Body Louse. Emerg Infect Dis. 2004 Sep;**10**(9):1671–3.

- Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Rösler U. Transmission of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from broiler chicken farms to surrounding areas. Vet Microbiol. 2014 Aug;**172**(3-4):519–27.

- Leung W-S, Chu C-M, Tsang K-Y, Lo F-H, Lo K-F, Ho P-L. Fulminant Community-Acquired Acinetobacter baumannii Pneumonia as a Distinct Clinical Syndrome. CHEST J. 2006 Jan 1;**129**(1):102–9.

- Livermore DM, Woodford N. The β-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. Trends Microbiol. 2006 Sep;**14**(9):413–20.

- Meyer E, Gastmeier P, Kola A, Schwab F. Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli. Infection. 2012 Sep 13;**40**(6):685–7.

- Murphy C, Reid-Smith RJ, Prescott JF, Bonnett BN, Poppe C, Boerlin P, et al. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. Can Vet J. 2009 Oct;**50**(10):1047–53.

- Ojer-Usoz E, González D, García-Jalón I, Vitas AI. High dissemination of extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in effluents from wastewater treatment plants. Water Res. 2014 Jun;**56**:37–47.

- Öncül O, Keskin ö., Acar HV, Küçükardalı Y, Evrenkaya R, Atasoyu EM, et al. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. J Hosp Infect. 2002 May;**51**(1):47–51.

- Pailhoriès H, Daure S, Eveillard M, Joly-Guillou M-L, Kempf M. Using Vitek MALDI-TOF mass spectrometry to identify species belonging to the Acinetobacter calcoaceticus–Acinetobacter baumannii complex: a relevant alternative to molecular biology? Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 2015 Jun [cited 2015 Aug 13]; Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889315002126

- Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. Am J Infect Control. 2006 Jun;**34**(5):S20–8.

- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β-Lactamases: a Clinical Update. Clin Microbiol Rev. 2005 Oct;**18**(4):657–86.

- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008 Jul;**21**(3):538–82.

- Perez F, Endimiani A, Hujer K, Bonomo R. The continuing challenge of ESBLs. Curr Opin Pharmacol. 2007 Oct;**7**(5):459–69.

- Petternel C, Galler H, Zarfel G, Luxner J, Haas D, Grisold AJ, et al. Isolation and characterization of multidrug-resistant bacteria from minced meat in Austria. Food Microbiol. 2014 Dec;**44**:41–6.

- Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008 Mar;**8**(3):159–66.

- Poirel L, Berçot B, Millemann Y, Bonnin RA, Pannaux G, Nordmann P. Carbapenemase-producing Acinetobacter spp. in Cattle, France. Emerg Infect Dis. 2012 Mar;**18**(3):523–5.

- Poirel L, Nordmann P, Ducroz S, Boulouis H-J, Arné P, Millemann Y. Extended-Spectrum β-Lactamase CTX-M-15-Producing Klebsiella pneumoniae of Sequence Type ST274 in Companion Animals. Antimicrob Agents Chemother. 2013 May;**57**(5):2372–5.

- Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2006 Sep;**12**(9):826–36.

- Radhouani H, Igrejas G, Gonçalves A, Estepa V, Sargo R, Torres C, et al. Molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates from red foxes in Portugal. Arch Microbiol. 2012 Nov 22;**195**(2):141–4.

- a. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Gaultier M-P, et al. Molecular Analysis of Acinetobacter baumannii Strains Isolated in Lebanon Using Four Different Typing Methods. PLoS ONE [Internet]. 2014 Dec 26 [cited 2015 Sep 9];**9**(12). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4277430/

- b. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Mallat H, et al. First report of blaNDM-1-producing Acinetobacter baumannii isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. Int J Infect Dis. 2014 Apr;**21**:21–3.

• Rafei R, Hamze M, Pailhoriès H, Eveillard M, Marsollier L, Joly-Guillou M-L, et al. Extrahuman Epidemiology of Acinetobacter baumannii in Lebanon. Appl Environ Microbiol. 2015 Jan 4;**81**(7):2359–67.

• c. Rafei R, Kempf M, Eveillard M, Dabboussi F, Hamze M, Joly-Guillou M-L. Current molecular methods in epidemiological typing of Acinetobacter baumannii. Future Microbiol. 2014 Oct 1;**9**(10):1179–94.

• Rao L, Lv L, Zeng Z, Chen S, He D, Chen X, et al. Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant Escherichia coli in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003–2012. Vet Microbiol. 2014 Aug;**172**(3-4):534–41.

• Reich F, Atanassova V, Klein G. Extended-Spectrum β-Lactamase– and AmpC-Producing Enterobacteria in Healthy Broiler Chickens, Germany. Emerg Infect Dis. 2013 Aug;**19**(8):1253–9.

• Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. J Antimicrob Chemother. 2007 Jan 11;**60**(5):1018–29.

• Rubin JE, Pitout JDD. Extended-spectrum β-lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals. Vet Microbiol. 2014 May;**170**(1-2):10–8.

• Saishu N, Ozaki H, Murase T. CTX-M-Type Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae Isolated from Cases of Bovine Mastitis in Japan. J Vet Med Sci. 2014 Aug;**76**(8):1153–6.

• Sallem RB, Slama KB, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N, et al. Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli isolates in healthy volunteers in Tunisia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Nov 8;**31**(7):1511–6.

• Schaumburg F, Alabi AS, Frielinghaus L, Grobusch MP, Köck R, Becker K, et al. The risk to import ESBL-producing Enterobacteriaceae and Staphylococcus aureus through

chicken meat trade in Gabon. BMC Microbiol [Internet]. 2014 Nov 19 [cited 2015 Sep 23];14. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4239323/

- Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, et al. An Outbreak of Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii-calcoaceticus Complex Infection in the US Military Health Care System Associated with Military Operations in Iraq. Clin Infect Dis. 2007 Jun 15;**44**(12):1577–84.

- Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K. Acinetobacter baumannii Skin and Soft-Tissue Infection Associated with War Trauma. Clin Infect Dis. 2008 Aug 15;**47**(4):444–9.

- Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of Acinetobacter baumannii. J Clin Microbiol. 2005 Sep;**43**(9):4328–35.

- Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J Clin Microbiol. 1997 Nov;**35**(11):2819–25.

- Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBLs): Characterization, Epidemiology and Detection. Crit Rev Microbiol [Internet]. 2008 Oct 19 [cited 2015 Sep 23]; Available from: http://www.tandfonline.com.gate2.inist.fr/doi/abs/10.1080/10408410490266429

- Smet A, Boyen F, Pasmans F, Butaye P, Martens A, Nemec A, et al. OXA-23-producing Acinetobacter species from horses: a public health hazard? J Antimicrob Chemother. 2012 Jan 12;**67**(12):3009–10.

- So JH, Kim J, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Lim S, et al. Dissemination of multidrug-resistant Escherichia coli in Korean veterinary hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 Jun;**73**(2):195–9.

- Timofte D, Dandrieux J, Wattret A, Fick J, Williams NJ. Detection of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Positive Escherichia coli in Bile Isolates from Two Dogs with Bacterial Cholangiohepatitis ▿. J Clin Microbiol. 2011 Sep;**49**(9):3411–4.

- Towner KJ. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect. 2009 Dec;**73**(4):355–63.

- Turner PJ. Extended-Spectrum β-Lactamases. Clin Infect Dis. 2005 Aug 15;**41**(Supplement 4):S273–5.

- Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of Acinetobacter baumannii by Detection of the blaOXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. J Clin Microbiol. 2006 Aug;**44**(8):2974–6.

- Turton JF, Kaufmann ME, Warner M, Coelho J, Dijkshoorn L, van der Reijden T, et al. A prevalent, multiresistant clone of Acinetobacter baumannii in Southeast England. J Hosp Infect. 2004 Nov;**58**(3):170–9.

- Van Hoek AHAM, Veenman C, van Overbeek WM, Lynch G, de Roda Husman AM, Blaak H. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. Int J Food Microbiol. 2015 Jul;**204**:1–8.

- Veldman K, van Tulden P, Kant A, Testerink J, Mevius D. Characteristics of Cefotaxime-Resistant Escherichia coli from Wild Birds in The Netherlands. Appl Environ Microbiol. 2013 Dec;**79**(24):7556–61.

- Vo ATT, van Duijkeren E, Fluit AC, Gaastra W. Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from horses. Vet Microbiol. 2007 Oct;**124**(3-4):248–55.

- Von Salviati C, Laube H, Guerra B, Roesler U, Friese A. Emission of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from pig fattening farms to surrounding areas. Vet Microbiol. 2015 Jan;**175**(1):77–84.

- Zarfel G, Galler H, Luxner J, Petternel C, Reinthaler FF, Haas D, et al. Multiresistant Bacteria Isolated from Chicken Meat in Austria. Int J Environ Res Public Health. 2014 Dec;**11**(12):12582–93.

- Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal lineages. Int J Antimicrob Agents. 2013 Jan;**41**(1):11–9.

Rapport-Gratuit.com

- Zeana C, Larson E, Sahni J, Bayuga SJ, Wu F, Della-Latta P. The epidemiology of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: does the community represent a reservoir? Infect Control Hosp Epidemiol. 2003 Apr;**24**(4):275–9.

- Zhang B, Liu Z, Lin Z, Zhang X, Fu W. Microbiologic characteristics of pathogenic bacteria from hospitalized trauma patients who survived Wenchuan earthquake. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Aug 22;**31**(10):2529–35.

- Zhang H, Zhou Y, Guo S, Chang W. Multidrug resistance found in extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from rural water reservoirs in Guantao, China. Front Microbiol [Internet]. 2015 Mar 31 [cited 2015 Sep 22];6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4379920/

- Zordan S, Prenger-Berninghoff E, Weiss R, van der Reijden T, van den Broek P, Baljer G, et al. Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii in Veterinary Clinics, Germany. Emerg Infect Dis. 2011 Sep;**17**(9):1751–4.

- Zurfluh K, Hächler H, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Characteristics of Extended-Spectrum β-Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Isolates from Rivers and Lakes in Switzerland. Appl Environ Microbiol. 2013 May;79(**9**):3021–6.

Sites internet:

- www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html: consulté le 07/09/2015
- http://pubmlst.org/abaumannii/info/primers_Pasteur.shtml: consulté le 03/08/2015
- http://pubmlst.org/abaumannii: consulté le 03/08/2015

ANNEXE 1: FICHE RENSEIGNEMENT DE L'ANIMAL PRELEVE.

CONSENTEMENT ECLAIRE

Prélèvements biologiques

Dans le cadre de travaux de recherche sur l'antibiorésistance des bactéries, nous avons besoin de recruter une centaine de chiens/chats sains et de réaliser sur ces animaux, deux prélèvements non invasifs par écouvillonnage ; un au niveau de la cavité buccale et un deuxième au niveau de l'anus.

Sur ces prélèvements nous étudierons la flore buccale et anale des animaux. Nous rechercherons plus particulièrement chez ces animaux la présence d'*Acinetobacter baumanii, bactérie* opportuniste responsable d'infection en milieu hospitalier chez l'homme et sa résistance aux antibiotiques.

Nom : Prénom :
Adresse :
Téléphone :
Mail (facultatif) :

Ainsi, en participant à cette étude :

J'accepte que les prélèvements soient utilisés et leurs résultats soient exploités dans le cadre de ce projet.

J'autorise l'équipe de recherche à utiliser les données concernant mon animal de manière anonyme. L'étude fera l'objet d'une publication scientifique mais aucun résultat individuel ne sera communiqué.

De plus, dans la situation où des renseignements complémentaires seraient nécessaires, j'accepte d'être contacté par téléphone.

Vous trouverez ci-joint un questionnaire à remplir au sujet de votre animal.

Merci par avance pour votre aide précieuse.

Fait le :

Signature N. Ruvoën (Enseignement-Chercheur) Signature I. Nezu (Etudiante) Signature du propriétaire

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Prélèvements réalisés ce jour, le :

☐ Ecouvillon cavité buccale Identification-B
☐ Ecouvillon anal Identification-F

VOTRE ANIMAL :

Espèce : ☐ Chien ☐ Chat

Age :

Sexe : ☐ Femelle ☐ Mâle

Race :

Milieu de vie :

☐ Milieu urbain ☐ Milieu semi urbain ☐ Milieu rural

Mode de vie :

☐ En appartement
☐ En totale liberté
☐ En maison avec jardin non clôturé
☐ En maison avec jardin clôturé

Alimentation :

☐ Aliment familial ☐ Aliment sec ☐ Aliment humide

Vit-il avec d'autres animaux dans le foyer ?

☐ Non ☐ Oui

Si OUI : ☐ Avec chien(s) Nombre de chien(s) : ……
☐ Avec Chat(s) Nombre de chat(s) : ……
☐ Avec d'autre(s) animal (aux) : lesquels ……

L'animal a-t-il été hospitalisé ?

☐ Non ☐ Oui

Si OUI : Date de l'hospitalisation : …….
Motif de l'hospitalisation : …….
Durée de l'hospitalisation : ☐ 1 jour ☐ Entre 2 et 4 jours ☐ ≥ 5j

L'animal a-t-il reçu ce dernier mois des antibiotiques ?

☐ Non ☐ Oui ☐ Ne sait pas

Si OUI : Nom de la spécialité : ……

Traitements antiparasitaires internes et externes ?

☐ Non ☐ Oui

Si OUI : Nombre de fois par an: ……..
Date du dernier traitement: ……..
Nom du/des traitements : ……....

Vaccination ?

☐ Non ☐ Oui

Si OUI : Date de la dernière vaccination : ……

ANNEXE 2: Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Le spectromètre de masse utilisé est un MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time Of Flight) qui comprend 2 composants : une source d'ionisation (MALDI) et un analyseur (TOF) (**Figure 5**).

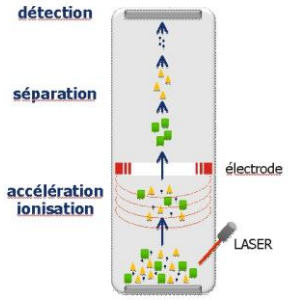


FIGURE 7. Structure schématisée d'un spectromètre de masse de type MALDI TOF (référence bioMérieux).

Le protocole de dépôt est le suivant:

Anaïs HERIVAUX

Etude du portage d'*Acinetobacter baumannii* et d'entérobactéries multi-résistantes chez les animaux de compagnie en France métropolitaine

RÉSUMÉ

La diffusion des bactéries multi-résistantes (MR) aux antibiotiques est devenue un enjeu majeur dans le monde entier. Des travaux récents suggèrent que les animaux domestiques pourraient représenter un réservoir de gènes de résistance, susceptibles d'être transmissibles à l'homme. Notre objectif a été d'étudier le portage d'*A. baumannii* (AB) et d'entérobactéries (EB) MR chez les animaux de compagnie venant en consultation à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. Un écouvillonnage rectal et buccal ont été réalisés et les écouvillons ensemencés. Les colonies d'intérêt ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF et la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée. Pour *Acinetobacter*, l'identification au rang de l'espèce a été confirmée par séquençage du gène *rpo*B. Les souches d'AB ont été typées par multi-locus sequence typing et électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Au total, 46 chats et 104 chiens ont été étudiés, 4 animaux étaient porteurs d'AB (prévalence 2,7%). Deux des souches étaient résistantes aux carbapénèmes. Elles étaient de sequence type (ST) 25 et portaient le gène $bla_{\text{OXA-23-like}}$. Le typage par PFGE a montré le même profil électrophorétique. D'autre part, 16 autres animaux étaient porteurs d'autres espèces d'*Acinetobacter* et 2 animaux étaient porteurs d'une EB productrice de β-lactamase à spectre étendu. C'est la première description d'AB résistant aux carbapénèmes chez des animaux de compagnie en France métropolitaine. Des études supplémentaires sont nécessaires pour démontrer si le même clone résistant aux carbapénèmes est présent ailleurs en France et pour investiguer une potentielle transmission de bactéries MR entre les animaux et les hommes.

Mots-clés: *Acinetobacter baumannii*, entérobactéries, réservoir animal, multi-résistance, France métropolitaine

Acinetobacter baumannii and multi-resistant enterobacteria carriage in pets in metropolitan France

ABSTRACT

Diffusion of multi-drug resistant (MR) bacteria became a major issue worldwide. Recent works have suggested that pets could be a reservoir of resistance genes, susceptible to be transmitted to humans. Our objective was to assess *A. baumannii* (AB) and MR enterobacteria (EB) carriage in pets coming for a consultation in the National Veterinarian School of Nantes. A rectal and mouth swabbing were realized and samples were discharged on agar plates. Colonies of interest were identified by MALDI-TOF mass spectrometry and susceptibility to antibiotics was performed. For *Acinetobacter*, species identification was confirmed by *rpo*B gene sequencing. AB strains were typed by multi-locus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). A total of 46 cats and 104 dogs were studied, 4 animals were carrying AB (prevalence 2.7%). Two strains were resistant to carbapenems. Both were of sequence type (ST) 25 and harbored the $bla_{\text{OXA-23-like}}$ gene. PFGE typing showed the same electrophoretic profile. Besides, 16 other animals were carrying other *Acinetobacter* species and 2 animals were carrying an extended-spectrum-β-lactamase-producing-EB. This is the first description of AB strains resistant to carbapenems in pets in metropolitan France. Additional studies must be conducted to demonstrate whether the same carbapenem-resistant clone is present elsewhere in France and to investigate a potential transmission of MR bacteria between animals and humans.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, enterobacteria, animal reservoir, multi-resistance, metropolitan France

université angers

UFR Sciences Pharmaceutique et Ingénierie de la Santé
Faculté de Pharmacie
16 boulevard Daviers 49100 Angers
Tél. 02 41 22 66 00 | Fax 02 41 22 66 34

UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET INGÉNIERIE DE LA SANTÉ