



UNIVERSITÉ
DE GENÈVE

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT F.-A. FOREL
DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT ET DE L'EAU

Laboratoire de Microbiologie Environnementale

Dr. John Poté

Prévalence et quantification des bactéries et gènes de résistance aux antibiotiques dans les effluents hospitaliers et communaux de la Ville de Genève



Rapport final, Novembre 2018

Mots clés: *bactéries résistantes aux antibiotiques; gènes de résistances; beta-lactamases à spectre élargi (BLSE); Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ERC), Carbapénème; Céphalosporine; effluents hospitaliers, station d'épuration, risques humains et environnementaux*

Une étude sur mandat l'Office Fédéral de l'Environnement (OFEV)

AVANT-PROPOS

Ce travail, financé par l'Office Fédéral de l'Environnement (OFEV), a été réalisé par le groupe de microbiologie environnementale du département F.-A. Forel de l'Université de Genève, avec la collaboration des institutions suivantes:

- Hôpitaux Universitaires de Genève (HUG)
- Service Industriel de Genève (station d'épuration des eaux usées (STEP d'Aïre))
- Voirie de la Ville de Genève, service du génie civil

Remerciements

Nous tenons à remercier très chaleureusement toute les personnes ayant participé à la conception et réalisation de la présente étude, notamment, Mme **Dre. Saskia Zimmermann-Steffens** de l'OFEV, Prof. **Stephan Harbarth** et Dre. **Nathalie Vernaz**, des HUG, M. **Adrien Baer** de SIG, M. **Pascal Chavannaz**, chef du service du génie civil de la Voirie ville de Genève, et Dr. **Sivalingam Periyasamy**, Mme **Amandine Laffite** et Mlle **Carmen Diaz Salgado** du groupe de microbiologie environnementale du département F.-A. Forel de l'Université de Genève.

Seul le groupe de microbiologie environnementale du département F.-A. Forel de l'Université de Genève est responsable du rapport rédigé.

Sé/John Poté, PhD, MER.

Responsable du groupe de Microbiologie Environnementale



Département F.-A. Forel des sciences de l'environnement et de l'eau
Uni Carl Vogt
Bureau B 209
66, Boulevard Carl-Vogt
CH-1211 Genève 4, Suisse
Email: John.Pote@unige.ch
Website: <https://www.unige.ch/forel/en/microbiologie-environnementale/>
Tél Direct: +41223790321

RESUME

La résistance aux antimicrobiens est actuellement une des plus sérieuses menaces pour la santé humaine et l'environnement. Les infections dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques telles que les bactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et des entérobactéries résistantes au carbapénèmes (ERC) deviennent de plus en plus courantes et les options thérapeutiques sont de plus en plus limitées. En effet, la résistance aux antibiotiques de 1^{ère} et 2^{nde} intentions poussent la médecine à utiliser des antibiotiques de réserve qui sont plus coûteux, plus toxiques mais aussi moins efficace pour le traitement des infections. La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs), des bactéries productrices de BLSE et des ERC est liée à l'utilisation des antibiotiques à large spectre en médecine humaine et vétérinaire. Les stations d'épuration des eaux usées (STEP), réceptrices des effluents provenant des habitations, hôpitaux, élevages et industries, sont considérées comme la source majeure de la dissémination des ARGs, BLSE et ERC en milieu aquatique. Le ruissellement du sol à partir de la couverture végétale (animaux/vétérinaire) n'est pas à exclure. Bien qu'elle provoque des effets néfastes dans l'environnement et pour la santé humaine, la dissémination des ARGs, BLSE et ERC en milieu aquatique reste très peu explorée et aucune donnée quantitative n'est à titre d'exemple disponible pour les eaux usées du canton de Genève. Dans le canton de Genève, aucune donnée n'est disponible concernant la dissémination de l'antibiorésistance depuis les effluents hospitaliers, les effluents communaux et les stations d'épuration.

De ce fait, l'Office Fédéral de l'Environnement (OFEV) - Division Eaux a chargé le groupe de microbiologie environnementale du département F.-A. Forel de l'Université de Genève d'effectuer une étude concernant la prévalence et la quantification des bactéries et gènes de résistance aux antibiotiques dans les effluents communaux et hospitaliers de la ville de Genève, ainsi que d'évaluer l'importance du fleuve Rhône en tant que milieu récepteur des effluents de la station d'épuration. Les effluents communaux de la ville de Genève, ceux des Hôpitaux Universitaires de Genève (HUG) et de la STEP d'Aire (à l'entrée et à la sortie), ainsi que l'eau du fleuve Rhône ont fait l'objet d'échantillonnages et d'analyses des ARGs, BLSE et ERC.

L'étude est focalisée essentiellement sur les points suivants:

- La détection et la quantification des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques de la famille de carbapénèmes et céphalosporines, avec la réalisation de tests de susceptibilité aux antibiotiques sur *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas* spp.
- La quantification et caractérisation des gènes de résistances aux antibiotiques (ARGs) notamment les gènes ***bla*_{TEM}**, ***bla*_{SHV}**, ***bla*_{CTX-M}**, ***bla*_{NDM}**, ***bla*_{VIM}**, ***bla*_{KPC}** et ***bla*_{OXA-48}**, qui sont majoritairement responsable de la résistance aux BLSEs et aux carbapénèmes. En effet, ***bla*_{TEM}**, ***bla*_{SHV}** et ***bla*_{CTX-M}** sont liés à la résistance aux céphalosporines à spectre étendu (i.e. céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, céfépime et aztreonam) alors que les Métallo-β-Lactamases (***bla*_{KPC}**, ***bla*_{OXA-48}**, ***bla*_{VIM}** et ***bla*_{NDM}**) sont responsables de la résistance bactérienne aux carbapénèmes (i.e. ertapénem, méropénem, doripénem).

L'analyse statistique descriptive de la prévalence de la multi-résistance aux antibiotiques dans l'environnement et l'évaluation de leur impact potentiel ont fait aussi objet de cette étude.

Les résultats statistiques permettent les conclusions suivantes :

- Les effluents communaux et hospitaliers sont caractérisés par des taux élevés de bactéries multi-résistantes BLSE et ERC. Les effluents hospitaliers constituent toutefois la source la plus importante de bactéries et gènes de résistance aux antibiotiques.
- Pour la résistance aux antibiotiques de la famille de carbapénèmes, nous avons observé **16-20.6%** de résistance dans les effluents hospitaliers, **2.7-6.8%** dans les effluents communaux, **2.6-7.9%** en entrée de la STEP, **~1%** en sortie de la STEP et **1.6%** dans le Rhône.
- Les taux de résistance dépendent des quartiers prélevés dans la ville de Genève. Ils sont plus élevés dans le quartier touristique des Pâquis.
- Bien qu'elle réduit le taux des bactéries, avec son débit en continue (en moyenne 2.5 m³/s, lors de cette étude) la station d'épuration (STEP) reste une source importante de relargage de bactéries BLSE et des ERC dans le Rhône.
- Toutefois, les quantités de bactéries BLSE et des ERC en amont et aval des rejets de la STEP montrent que la STEP n'est pas l'unique source de rejets de ces bactéries dans le Rhône.

Globalement, nos résultats indiquent que le gène ***bla*_{NDM-1}** est le plus souvent détecté dans les échantillons hospitaliers, puis dans les effluents communaux et ceux de la STEP. Malgré le nombre limité d'isolats résistants aux carbapénèmes analysés, les résultats de notre étude

suggèrent fortement que des études de suivi et de surveillance régulières des bactéries BLSE et des ERC dans les effluents hospitaliers, communaux et ceux de la STEP soient périodiquement mise en œuvre, afin de doter le canton de Genève de données quantitatives permettant la réduction des risques potentiels.

Ce rapport met à disposition des autorités de l'OFEV des données quantitatives sur la dissémination des ARGs, des bactéries BLSE et des ERC dans les milieux aquatiques du canton de Genève, spécialement sur les rejets environnementaux issus des effluents hospitaliers, communaux et de la station d'épuration, ainsi que le rôle du milieu récepteur. Ces données poseront les bases pour l'amélioration de la gestion des eaux usées et éventuellement la mise en place de stratégies pour la réduction de l'utilisation des antibiotiques à la source et les nouvelles stratégies de traitement des eaux usées des STEPs eu égard à la présence des micropolluants biologiques émergents comme les ARGs, des bactéries BLSE et des ERC. Nous proposons l'élargissement de cette étude en tenant compte des variations saisonnières. ***La quantification des bactéries BLSE et des ERC dans les différentes plages du canton de Genève est vivement recommandée.***

Cette recherche peut s'étendre dans les environnements similaires des autres cantons Suisses.

Ce rapport est remis à l'OFEV qui a assuré le financement de l'étude. L'exploitation de données de cette étude est soumise à autorisation par l'OFEV.

Table des matières

AVANT-PROPOS.....	3
RESUME.....	5
Partie 1 Les objectifs et déroulement de l'étude	11
1.1. Mandat et objectif de l'étude	13
1.2. Cadre de l'étude	13
1.3. Déroulement de l'étude	14
Partie 2 Echantillonnage	15
2.1. Prélèvement des échantillons dans les effluents communaux	17
2.2. Prélèvement des échantillons dans les effluents hospitaliers	20
2.3. Prélèvement des échantillons dans la station d'épuration (STEP d'Aire)	20
2.4. Prélèvement des échantillons dans le milieu récepteur, le Rhône	22
Partie 3 Méthodes d'analyses.....	23
3.1. Isolement des bactéries et tests de susceptibilité	23
3.2. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance au carbapénèmes	24
Partie 4 Résultats de l'étude et discussion	25
4.1. Prévalence des bactéries résistante à la 3ème génération de céphalosporines	27
4.2. Constat général sur les bactéries multirésistantes isolées	28
4.2.1. Prévalence des ERC dans les effluents de l'unités 6A Lina Stern des HUG	32
4.2.2. Prévalence des ERC dans les effluents communaux	33
4.2.3. Prévalence des ERC dans les effluents de la STEP du canton de Genève	34
4.2.4. Prévalence des ERC dans le fleuve Rhône, receveur terminal des effluents.	34
Partie 5 Conclusion	35
Partie 6 Les perspectives	37
6.1. Impact des variations saisonnières sur la dissémination des bactéries résistantes aux carbapénèmes.	37
6.2. Identification des isolats bactériens de cette étude	37
6.3. Détermination des groupes phylogénétiques de <i>Escherichia coli</i>	37
6.4. Mise en évidence du transfert horizontal des gènes liés à la résistance aux carbapénèmes	38
6.5. Multilocus sequence typing (MLST) des souches <i>K. pneumoniae</i>	38
Annexe	40

Partie 1 Les objectifs et déroulement de l'étude



Photo-1. Un des lieux de prélèvement des effluents communaux au centre de Genève avec l'aide de la voirie de la ville de Genève (quartier Bel Air, photo John Poté, sept. 2017)

1.1. Mandat et objectif de l'étude

En date du 01 septembre 2017, l'Office Fédéral de l'Environnement (OFEV) - Division Eaux a chargé le groupe de microbiologie environnementale du département F.-A. Forel de l'Université de Genève d'effectuer une étude concernant la prévalence et la quantification des bactéries et gènes de résistance aux antibiotiques dans les effluents communaux et hospitaliers de la ville de Genève, ainsi que d'évaluer l'importance du fleuve Rhône en tant que milieu récepteur des effluents de la station d'épuration. De ce fait, les effluents communaux, des Hôpitaux Universitaires de Genève (HUG), de la station d'épuration (STEP) d'Aïre, ainsi que l'eau du Rhône ont fait l'objet d'échantillonnages.

L'objectif principal de l'étude vise la quantification des gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs), des bactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et des entérobactéries résistantes au carbapénème (ERC) dans les eaux usées de la ville de Genève. Dans ce contexte, nous avons procédé à un screening des ARGs, des bactéries BLSE et des ERC à partir des sources potentielles de la dissémination que sont les effluents hospitaliers et communaux, ainsi que les rejets de la station d'épuration (entrée et sortie). Par la suite, nous avons vérifié le rôle du milieu récepteur, notamment le fleuve Rhône qui reçoit non seulement les effluents des stations d'épuration d'eaux usées, mais aussi les eaux de ruissellement de la couverture végétale.

Les approches analytiques étaient focalisées sur les points suivants:

- La détection et quantification des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques de la famille de carbapénèmes et céphalosporines, avec la réalisation de tests de susceptibilité aux antibiotiques sur *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*,
- La quantification et caractérisation des gènes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *blac*_{KPC} et *bla*_{OXA-48},
- L'analyse statistique de la prévalence de la multi-résistance aux antibiotiques dans l'environnement ont fait aussi objet de cette étude.

1.2. Cadre de l'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre de recherches effectuées depuis plusieurs années au Département F.-A. Forel des sciences de l'environnement et de l'eau "Groupe de recherche en microbiologie environnementale" dirigé par le Dr. John Poté. La collaboration a été effectuée avec le Service Industriel de Genève (SIG), **M. Adrien Baer**, Ingénieur d'exploitation

de la STEP d'Aire, les Hôpitaux Universitaires de Genève (**HUG**), notamment Prof. **Stephan Harbarth** et Dre. **Nathalie Vernaz**, et **M. Pascal Chavannaz**, chef du service du génie civil, voirie de la ville de Genève.

La phase analytique a été complètement réalisée au laboratoire de microbiologie environnementale du département F.-A. Forel, Université de Genève.

1.3. Déroulement de l'étude

Cette étude s'est déroulée pour une période de 6 mois d'échantillonnage (de septembre 2017 à Février 2018) et plusieurs mois d'expérimentations. Il a été toutefois convenu avec l'OFEV de remettre un rapport intermédiaire du déroulement de l'étude de septembre à novembre 2017, puis par la suite un rapport final au plus tard le 15 novembre 2018.

Partie 2 Echantillonnage



Photo-2. Echantillonnage des effluents hospitaliers (Photo prise par Maria-Eugenia Riccio des HUG, fév. 2018).

Les échantillons d'eau ont été prélevés selon la disponibilité des techniciens des institutions de collaboration comme indiqué dans le Tableau-1:

- Dans les conduites des effluents urbains (communaux) avec l'aide de la voirie de la ville de Genève.
- Dans la conduite des eaux usés du bloc 6A (unités des différents soins: unités 0AL-0FL à 8AL-8FL) des Hôpitaux Universitaires de Genève avec l'aide des techniciens des HUG.
- A l'entrée et sortie de la station d'épuration (STEP) d'Aire avec l'aide de leur service technique.
- Dans la rivière Rhône, environ 200 m en amont et 200 m en aval du rejet de la STEP, avec l'aide des techniciens du département F.-A. Forel..

Le Tableau 1 indique les dates et lieux de prélèvement des échantillons.

Tableau 1 Dates et lieux d'échantillonnage

Mois	Effluents communaux	Effluents hospitaliers	STEP	Rhône
Septembre			04.09.2017	
Octobre	05.10.2017		18.10.2017	26.10.2017
Novembre	20.11.2017		15.11.2017	15.11.2017
Décembre	18.12.2017	20.12.2017		
Janvier		17.01.2018		
Février		14.02.2018		

2.1. Prélèvement des échantillons dans les effluents communaux

Les effluents communaux ont été prélevés avec l'aide de la voirie de la ville de Genève dans quatre réseaux principaux de la ville de Genève en dates de 05/10, 20/11 et 18/12/2017. Les endroits prélevés sont sans influence des effluents hospitaliers. Les échantillons ont été collectés pendant la semaine entre 8h00 et 9h00. Le débit d'écoulement des effluents communaux est variable et dépend des conduites. Lors de prélèvement, le débit variait entre 2-3 m³/s.

La sélection des zones de prélèvement a été basée sur :

- **La présence des commerces et hôtels touristiques; Quartiers Pâquis et Bel Air**



Photo-3. Place d'échantillonnage du quartier Pâquis (Photo prise par J. Poté)



Photo-4. Place d'échantillonnage du quartier Bel Air (Photo prise par J. Poté)

- **Forte densité des personnes autochtones ; Quartier Saint Jean**



Photo-5. Place d'échantillonnage de quartier Saint Jean (Photo prise par J. Poté)

- **Faible densité des personnes : Quartier Acacias**



Fig. 6. Place d'échantillonnage de quartier Acacias (Photo prise par J. Poté)

2.2. Prélèvement des échantillons dans les effluents hospitaliers

Les effluents hospitaliers ont été prélevés avec l'aide des services techniques des HUG en date du 20/12/2017 et des 17/01 et 14/02/2018. La sélection des effluents des blocs a été faite sur base de nos discussions avec les collègues des HUG. Ces blocs comprennent les services cliniques spécialisés, services généraux, la cafétéria et le restaurant. Les échantillons ont été collectés pendant la semaine entre 9h00 et 9h30.



Photo-7. Echantillonnage des effluents hospitaliers (Photo prise par Maria-Eugenia Riccio de HUG, fév. 2018)

2.3. Prélèvement des échantillons dans la station d'épuration (STEP d'Aïre)

La STEP d'Aïre est la plus grande station d'épuration du canton de Genève et l'une des plus grandes de Suisse. Elle reçoit les eaux usées de la Ville de Genève, de 26 communes du canton et d'une partie de la région transfrontalière. Plus de 80% des eaux usées de la région genevoise sont traitées par la STEP soit un débit de 2'000 litres d'eaux usées par seconde pénétrant dans la station. La STEP n'a pas un système de séparation de traitement, et traite toutes les filières d'assainissement des rejets industriels, hospitaliers et domestiques.

Les échantillons ont été prélevés le 04/09, 18/10 et le 15/11/ 2017 à l'entrée (*input*) et à la sortie après traitement (*out put*). Certains paramètres physicochimiques comme la conductivité électrique, le pH, le débit et l'oxygène dissout ont été mesurés lors de prélèvement. Lors de prélèvement, le débit moyen *output* de la STEP était d'environ 2.5 m³/S

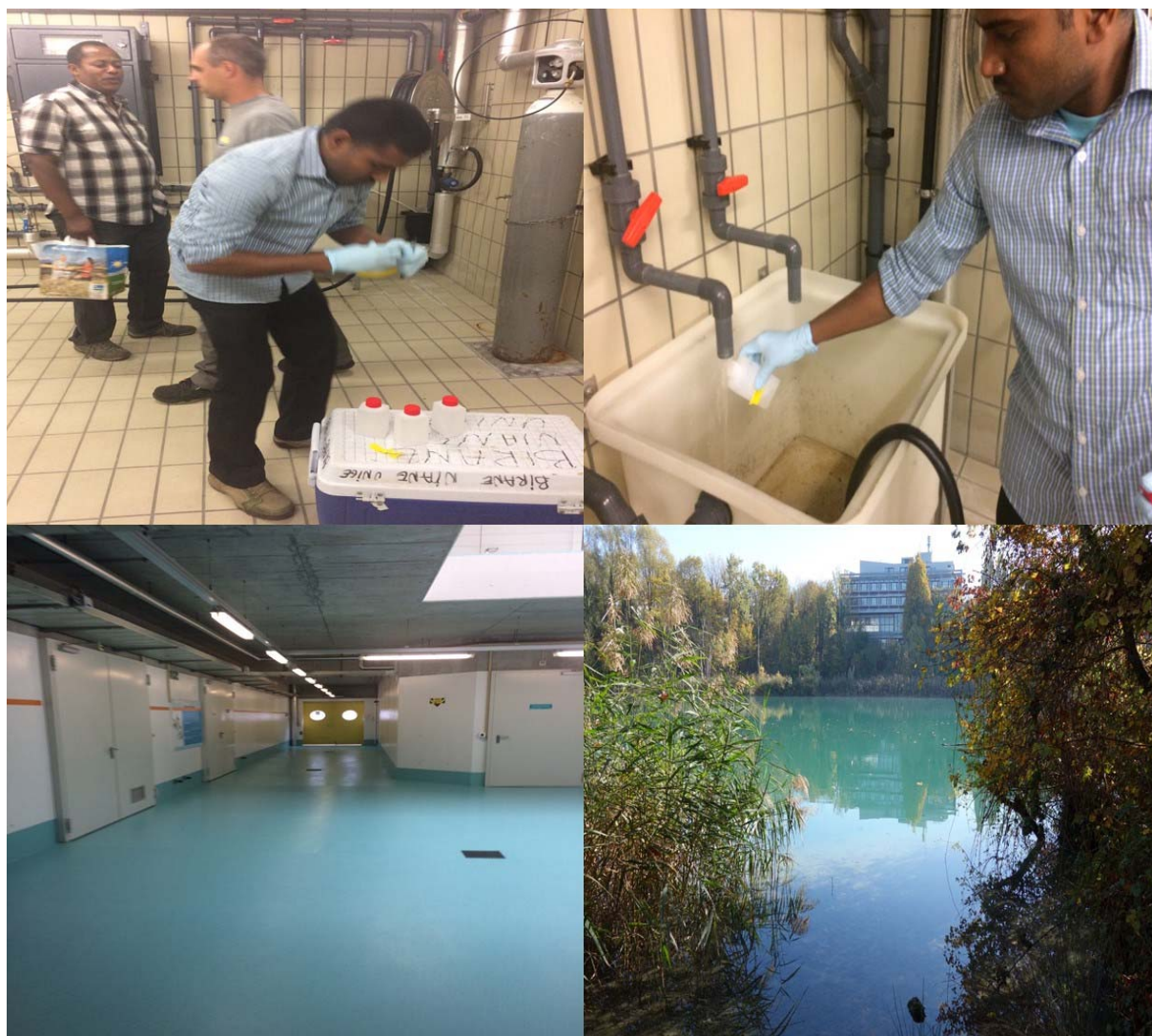


Photo-8. Prélèvement des échantillonnages dans la station d'épuration d'Aire (Photo prise par Maria-Eugenia Riccio de HUG, sept. 2017).

2.4. Prélèvement des échantillons dans le milieu récepteur, le Rhône

Les échantillons d'eau de la rivière Rhône ont été prélevés les 26/10 et 15/11/2017 à environ 200 m en amont et 200 m en aval du point de rejet de la STEP d'Aïre. Le Tableau 2 donne les coordonnées géographiques de prélèvement



Photo-9. Carte Google des points de prélèvement dans le Rhône



Photo-10. Prélèvement de l'eau du Rhône (Photo prise par P. Arpagaus du département Forel, oct. 2017).

Tableau 2 Les coordonnées GPS des points de prélèvement dans le Rhône

Site	Non d'échantillon	Coordonnées Suisse GPS
Milieu récepteur Rhône	Rhône 1	46°12'38.5"N 6°05'36.7"E
	Rhône 2	46°12'12.2"N 6°04'45.4"E
	Rhône 3	46°12'06.8"N 6°04'29.5"E
	Rhône 4	46°12'29.0"N 6°05'34.9"E
	Rhône 5	46°11'55.7"N 6°05'22.2"E

Partie 3 Méthodes d'analyses

3.1. Isolement des bactéries et tests de susceptibilité

L'isolement et la quantification des bactéries ; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas* spp. ont été réalisées selon les méthodes de culture préalablement décrites dans nos recherches et ainsi que d'autres approches (Amos et al. 2014; Brechet et al. 2014; Devarajan et al. 2017; Lu et al. 2010; Mesa et al. 2006; Su et al. 2012; Zurfluh et al. 2017). Pour chaque eau testée, un comptage bactérien a été effectué sur milieu non sélectif avec antibiotique (Céfotaxime, 2µg/mL) et sans antibiotique afin de déterminer le pourcentage de bactéries résistantes à la 3^{ème} génération de céphalosporine et donc probablement BLSE/ERC. Un nombre n de colonies a été prélevé aléatoirement et chaque isolat a été soumis à un test de susceptibilité aux antibiotiques. Les tests de susceptibilité ont été réalisés par l'approche conventionnelle de diffusion sur disque selon les méthodes du CLSI décrites en annexe (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2018)

Les tests de résistance sur les souches bactériennes isolées ont été réalisées sur la sélection de 16 antibiotiques : Ampicilline (AMP, 10 µg), Ampicillin- acide clavulanique (AMC 30 µg), Cephalothine (KF 30 µg), Cefotaxime (CTX, 30 µg), Ciprofloxacin (CIP 5 µg), Gentamicine (CN 10 µg) Tetracycline (TE 30 µg), Streptomycine (S 10 µg), Chloramphenicol (C 30 µg), Kanamycine (K 30 µg), Acide Nalidixique (NA 30 µg), Trimethoprim/sulfaméthoxazole (SXT 25 µg), Piperacillin-tazobactam (TZP 110 µg), Imipenem (IPM, 10 µg), Meropenem (MEM, 10 µg), Cefepime (FEP 30). (Oxoid, UK). Nos souches de *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25922 ont été utilisées comme contrôles (Devarajan et al., 2017). Chaque isolat a été classifié selon 3 catégories : « sensible », « intermédiaire » et « résistant ». Ces catégories sont établies selon les valeurs interprétatives du Clinical Laboratory Standards Institute, qui déterminent un isolat sensible à un antibiotique lorsque sa croissance est inhibée par le dosage cliniquement recommandé (antibiotique cliniquement efficace). Un niveau de résistance intermédiaire, correspond à usage d'un antibiotique à un dosage plus élevé que la dose thérapeutique normale (antibiotique cliniquement peu efficace). Enfin, un isolat classé résistant correspond à l'absence d'effet de l'antibiotique testé (Tableau 4).

Pour plus de détails sur la méthodologie, veuillez voir la description aux points 2 et 3 de l'ANNEXE.

3.2. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance au carbapénèmes

Les gènes de résistances ; *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, and *bla*_{OXA-48} ont été confirmés par amplification PCR sur l'ADN extrait des souches bactériennes exprimant une résistance phénotypique au carbapénèmes en utilisant les amorces spécifiques comme décrit par Devarajan et al. (2017) , Poirel et al. (2011) et Ellington et al. (2007). **Les conditions réactionnelles d'amplification PCR sont décrites dans le point 4 de l'annexe.** Le Tableau 3 donne les séquences d'amorces utilisées.

Tableau 3 Les amorces utilisées dans cette étude (point 4 l'annexe)

Target genes	Primer	Sequences (5'-3')	Amplicon length (bp)	Tm (°C)	References
<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> KPC F	CGT CTA GTT CTG CTG TCT TG	798	60	Ellington et al., 2007
	<i>bla</i> KPC R	CTT GTC ATC CTT GTT AGG CG			
<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> NDM-1 F	GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC	621	60	Ellington et al., 2007 Poirel et al., 2011
	<i>bla</i> NDM-1R	CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC			
<i>bla</i> _{OXA 48}	<i>bla</i> OXA 48 F	GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC	438	58	Poirel et al., 2011
	<i>bla</i> OXA 48 R	CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG			
<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> VIM F	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	390	58	Poirel et al., 2011
	<i>bla</i> VIM R	CGA ATG CGC AGC ACC AG			

Partie 4

Résultats de l'étude et discussion

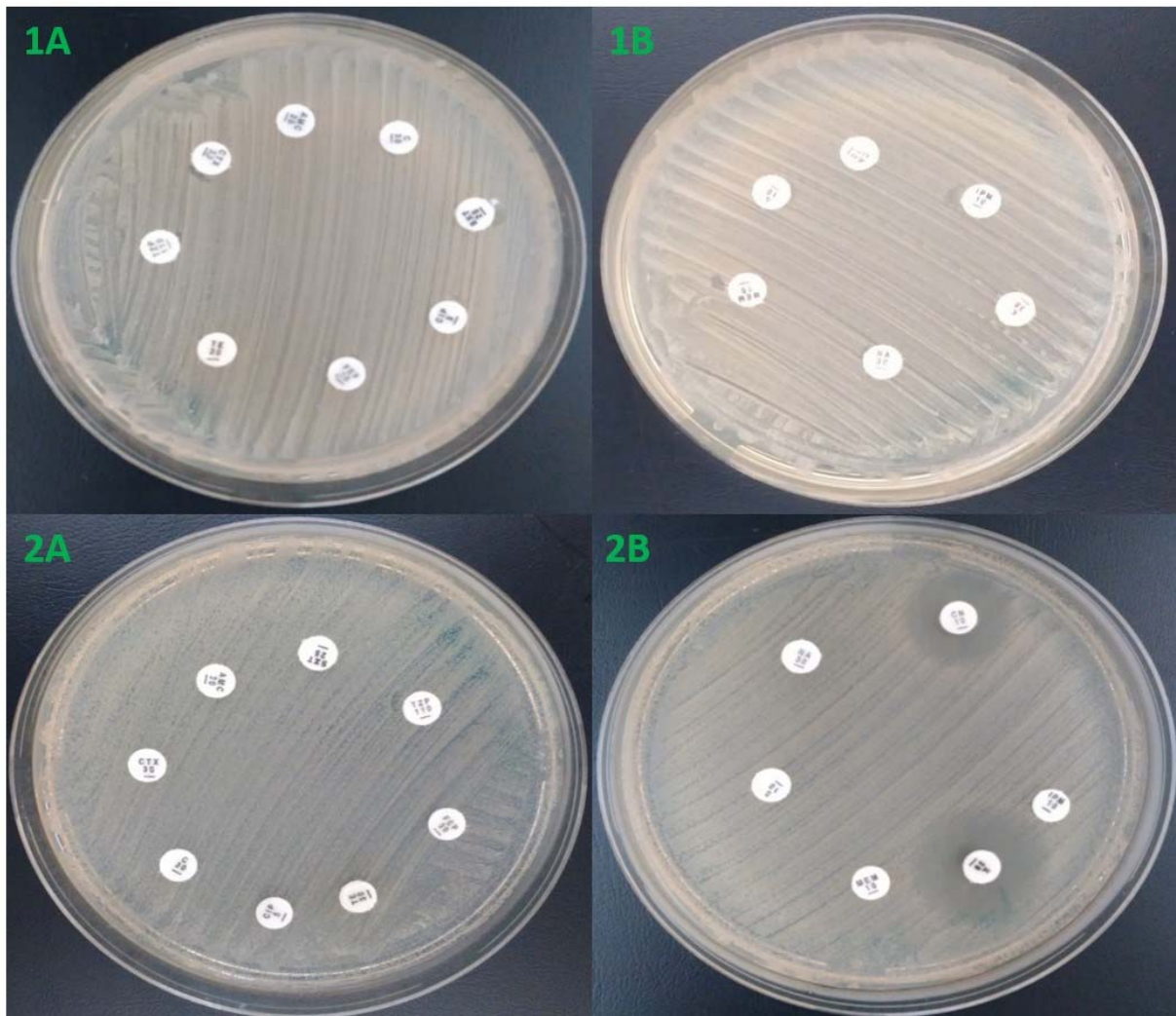


Photo-11. Culture bactérienne sur le milieu Müller-Hinton agar, montrant la résistance des souches bactériennes BLSE et CRE (Sivalingam Periyasamy, Octobre, 2017)

4.1. Prévalence des bactéries résistante à la 3ème génération de céphalosporines

Afin de déterminer l'impact anthropogénique sur la dissémination de la résistance dans l'environnement, nous avons déterminé la prévalence de la résistance aux antibiotiques sur les bactéries mésophiles (température optimale 37°C), non exigeante, neutrophile, non halophile et aérobie. C'est-à-dire que nous avons ciblé prioritairement les bactéries commensales de l'Homme et des animaux ainsi que les bactéries pathogènes grâce à l'utilisation d'un milieu non sélectif incubé à 37°C. La quantification de ces bactéries avec et sans antibiotique a démontré une forte prévalence de la résistance aux antibiotiques avec 79% dans les effluents hospitaliers, 53-57% de résistance dans les effluents communaux, 37% dans le Rhône, ainsi que 80% et 25% respectivement en l'entrée et à la sortie de STEP (Figure 1).

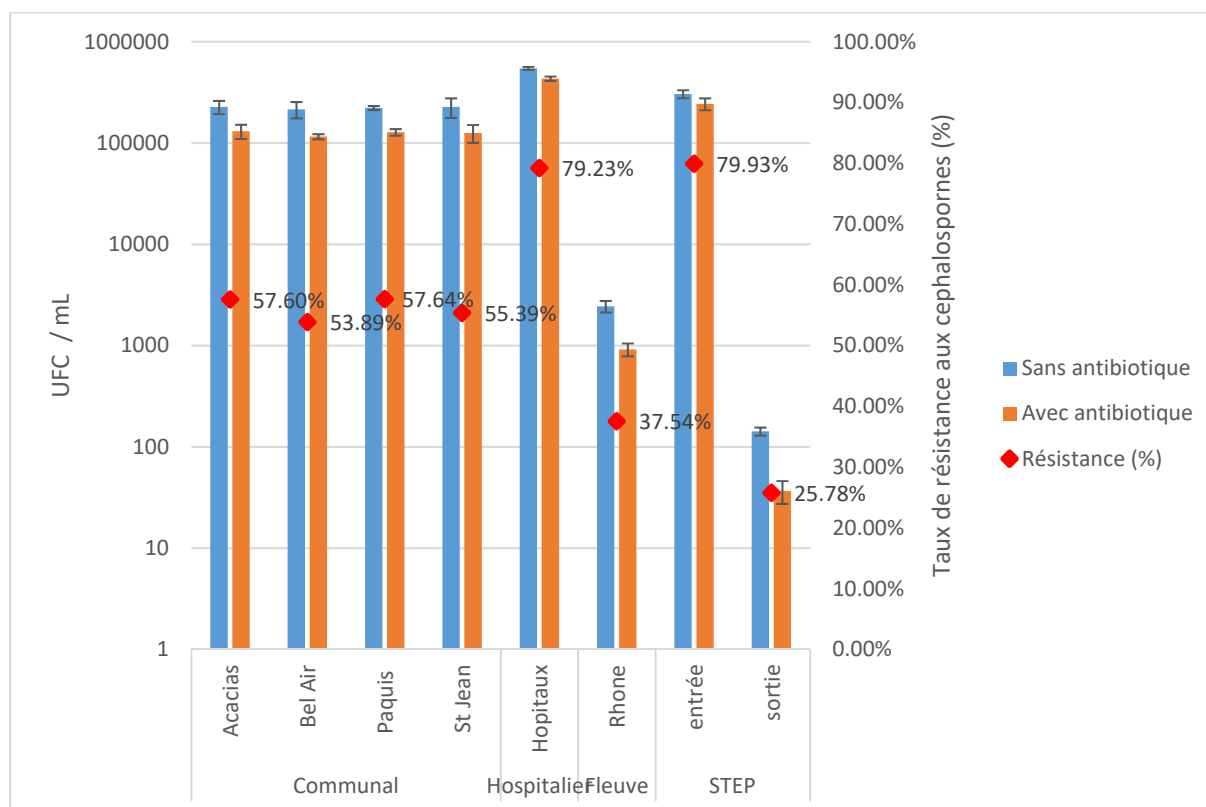


Figure 1A Quantification bactérienne de la résistance aux céphalosporines avec et sans antibiotiques dans les différents effluents testés.

De plus, l'analyse de l'affluent (entrée) et de l'effluent (sortie) de la STEP a montré la forte efficacité de traitement avec un abaissement importante de nombre des bactéries ciblées en sortie de STEP ainsi qu'une diminution de 54% du taux de résistance (Figures 2A et 2B).

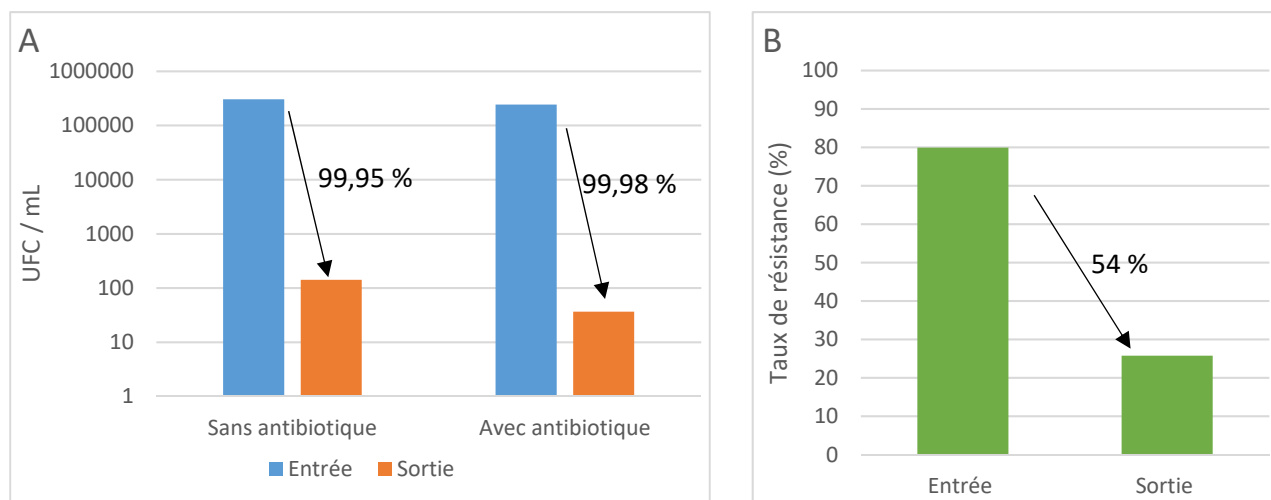


Figure 2 (A) Diminution de la population bactérienne totale et de la population bactérienne résistante aux 3^{ème} génération de céphalosporines après traitement par la STEP et (B) Evolution du taux de résistance aux 3^{ème} génération de céphalosporines entre l'entrée et la sortie de la STEP.

4.2. Constat général sur les bactéries multirésistantes isolées

Dans les isolats résistants à la 3^{ème} génération de céphalosporine (Céfotaxime), une résistance a été observée pour tous les antibiotiques (i.e. Ampicilline, Ampicilline- acide clavulanique, Céphalothine, Céfotaxime, Ciprofloxacine, Gentamicine, Tétracycline, Streptomycine, Chloramphénicol, Kanamycine, Acide Nalidixique, Triméthoprim/sulfaméthoxazole, Piperacillin-tazobactam, Imipenem, Méropenem, Céfépime) testés lors de cette étude (Figure 3) avec des patterns différents selon les souches analysées. Afin de déterminer si la résistance phénotypique BLSE et ERC est liée à la présence d'un gène de résistance spécifique aux β -lactames et aux carbapénèmes, une confirmation par PCR a été effectuée selon le phénotype observé sur l'antibiogramme. Les isolats montrant une résistance au Céfotaxime et à l'ampicilline/ acide clavulanique ont été testé pour la présence de gènes de résistance au β -lactames alors que les isolats montrant une résistance aux antibiotiques de la famille des carbapénèmes (i.e. Imipenem et Méropenem) ont été testés pour la présence de gènes de résistance aux carbapénèmes. Toutes les informations des isolats résistants aux carbapénèmes sont récapitulés dans le tableau 4.

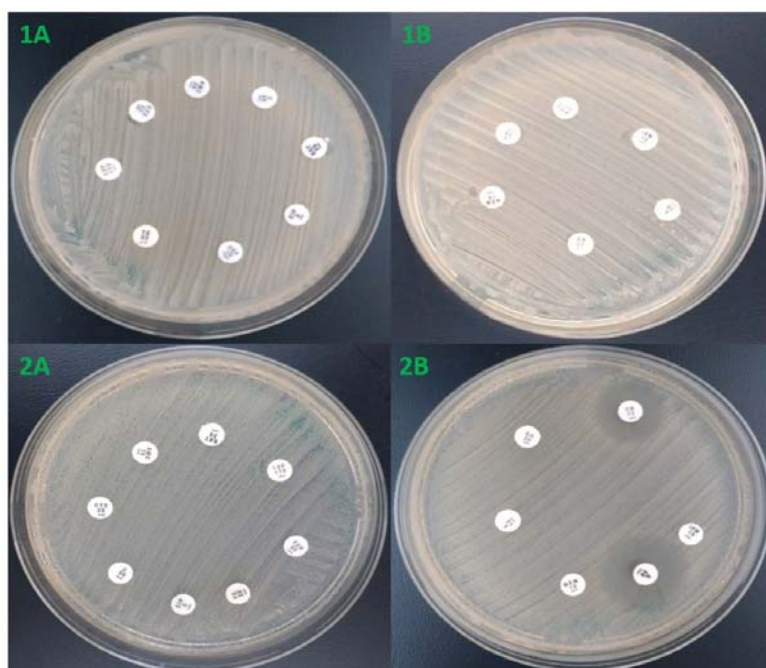


Figure 3 Antibiogrammes sur gélose Müller-Hinton ayant des phénotypes de résistance aux carbapénèmes (1AB) et aux β -lactames (2AB)

Tableau 4 Tableau récapitulatif des souches résistantes aux carbapénèmes isolées dans les effluents: date et lieu d'isolement, type de bactérie, résistance phénotypique et résistance génotypique.

Echantillonnage	Isolat	Type d'effluent							Espèce			Pattern de résistance aux antibiotiques																Gènes de résistance aux carbapénèmes					
		Hôpital	Communal				STEP		Rhône	E. coli	Pseudomonas spp.	Enterobacteriaceae	AMP	AMC	C	CIP	CTX	CN	FEP	IMP	K	KF	MEM	NA	TE	TZP	S	SXT	NDM	KPC	OXA-48	VIM	
20.12.17	Hug1 04																																
	Hug1 07																																
	Hug1 11																																
	Hug1 16																																
	Hug1 21																																
	Hug1 22																																
	Hug1 29																																
17.01.2018	Hug2 01																																
	Hug2 07																																
	Hug2 10																																
	Hug2 18																																
	Hug2 19																																
	Hug2 21																																
	Hug2 27																																
14.02.2018	Hug2 28																																
	Hug3 03																																
	Hug3 05																																
	Hug3 10																																
	Hug3 14																																
	Hug3 15																																
	Hug3 18																																
	Hug3 19																																
	Hug3 22																																
	Hug3 24																																
	Hug3 29																																
	Hug3 33																																
	Hug3 35																																
Hug3 37																																	
05.10.2017	C1 Be1																																
	C1 Paq6																																
	C1 Be4																																
	C1 Be9																																
	C1 Ac5																																
20.11.2017	C2 Be5																																
	C2 Be8																																
	C2 Sj10																																
18.12.2017	C3 Be12																																
	C3 Ac1																																
04.09.2017	En1 3																																
	En1 12																																
	En1 15																																
	So1 5																																
11.10.2017	En2 1																																
	En2 26																																
15.11.2017	En3 26																																
26.10.2017	R1 5																																
15.11.2017	R2 18																																

Phénotype de résistance à l'antibiotique testé:

Sensible

inhibé par une dose d'antibiotique cliniquement relevant

Intermédiaire

inhibé par une dose d'antibiotique supérieure à la dose clinique recommandée

Résistant

non inhibé par l'antibiotique testé

AMP: Ampicilline, AMC: Ampicilline - Acide Clavunaliq, C: Cloramphénicol, CIP: Ciprofloxacine, CTX: Céfotaxime, CN: Gentamicine, FEP: Céfépime, IMP: Imipénem, K: Kanamycine, KF: Céphalotine, MEM: Méropénem, NA: Acide Nalidixique, TE: Tétracycline, TZP: Pipéracilline-Tazobactam, S: Streptomycine, STX: Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole.

Les isolats ayant une résistance phénotypique aux β -lactames and aux carbapénèmes ont été testés pour la présence des gènes *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, and *bla*_{OXA-48}. Les résultats des confirmations par PCR du gène *bla*_{NDM-1} sont présentés Figure 4.

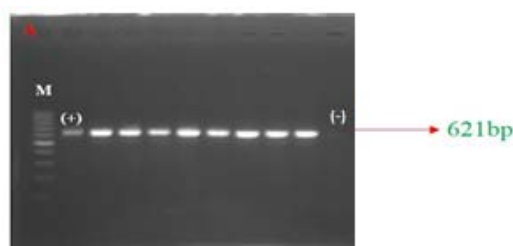


Figure 4 Confirmation par PCR du gène *bla*_{NDM-1} avec une taille de produit d'amplification à 621 pb. M : Gene ruler 100pb ; (+) Contrôle positif et (-) contrôle négatif.

Comme le montre le Tableau 5, les isolats des effluents communaux et hospitaliers sont caractérisés par des taux élevés de multi-résistances aux BLSE et ERC. Les effluents hospitaliers constituent toutefois la source la plus importante des bactéries et gènes de résistances aux antibiotiques. Pour la résistance aux antibiotiques de la famille de carbapénèmes, les tests de résistance sur souche ont démontré 20-33% de résistance dans les isolats issus des effluents hospitaliers (4 souches d'*Escherichia coli*, 7 de *Pseudomonas* spp., et 17 des Enterobacteries), 5-12.5% dans les isolats issus des effluents communaux (3 souches d'*Escherichia coli*, 1 de *Pseudomonas* spp., et 6 des Entérobactéries), 3-10 % dans les isolats de l'entrée de la STEP, 1-3% dans les isolats de la sortie de la STEP et 4-5% dans les isolats du Rhône.

Tableau 5 Les souches bactériennes de résistances aux carbapénèmes isolées des différents sites d'étude

Location	Date	Nombre d'isolats testés	Nombre (%) de résistance aux carbapenemases	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i> spp	<i>Klebsiella</i> spp.*
HUG	20.12.2017	35	7 (20)	1	1	5
HUG	17.01.2018	30	8 (26)	1	2	5
HUG	14.02.2018	39	13 (33)	2	4	7
STEP (Input)	4.09.2017	30	3 (10)	2	0	1
STEP (output)	4.09.2017	23	1 (4.3)	1	0	0
STEP (Input)	18.10.2017	30	2 (6.6)	0	0	2
STEP (output)	18.10.2017	25	0	0	0	0
STEP (Input)	15.11.2017	30	1 (3.3)	0	0	1
STEP (output)	15.11.2017	20	0	0	0	0
Rhône	26.10.2017	17	1 (5)	0	0	1
Rhône	15.11.2017	25	1 (4)	0	1	0
Communal	05.10.2017	40	5 (12.5)	1	1	3
Communal	20.11.2017	38	3 (7.89)	1	0	2
Communal	18.12.2017	40	2 (5)	1	0	1

* Les souches seront confirmées par l'approche MALDI-TOF ou par séquençage

4.2.1. Prévalence des ERC dans les effluents de l'unités 6A Lina Stern des HUG

La présence de gènes codant pour les carbapénèmases a été détecté dans 7 des 35 isolats testés en Décembre 2017, 8 des 30 isolats de Janvier 2018 et 13 des 39 isolats de Février 2018 ayant montré une résistance phénotypique aux BLSE et/ou ERC (Tableau 5). Selon les résultats de cette étude, les effluents de l'unité 6A des HUG présente une résistance de 16% à 26.7% aux carbapénèmes (Figure 5).

En Décembre, 3 des 35 isolats résistant (8.5%) portaient le gène *bla*_{NDM-1}, et 4 des 35 isolats résistant (11.4%) portaient le gène *bla*_{VIM}, ce qui correspond à une résistance globale dans l'eau testée de 6.8% pour *bla*_{NDM-1} et 9.1% pour *bla*_{VIM}. En Janvier 2018, Les résultats indiquaient que 3 des 30 isolats résistant (10%) portaient le gène *bla*_{NDM-1}, et 5 des 30 isolats résistant (16%) portaient le gène *bla*_{VIM}, ce qui correspond à une résistance globale dans l'eau de 7.7% pour *bla*_{NDM-1} et 12.9% pour *bla*_{VIM}. Une légère augmentation de la résistance à été détectée en Février 2018 avec 12.8%, 17.9% et 2.5% des isolats portant respectivement les gènes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM}, et *bla*_{OXA}. Globalement, les résultats de cette étude ont montré que les effluents hospitaliers avaient un portage de **7.7-10.3% de NDM**, **9.1-14.4% de VIM** et **2.1% de OXA-48**. Ces résultats mettent en évidence que **le gène *bla*_{NDM-1} est particulièrement à risque** dans les effluents hospitaliers même si le gène *bla*_{OXA-48} est connu comme le déterminant génétique le plus à risque en Europe en raison de son haut potentiel de dissémination.

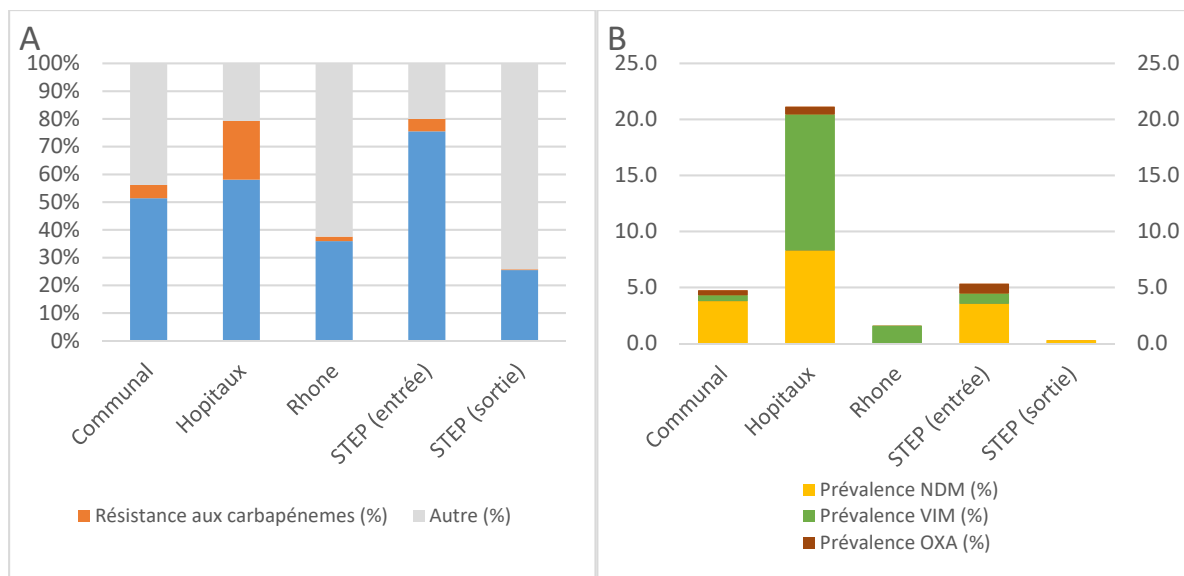


Figure 5 (A) Répartition de la résistance aux carbapénèmes et aux céphalosporines et (B) Prévalence des gènes liés à la résistance aux carbapénèmes dans les eaux usées communales, hospitalières et dans la STEP

4.2.2. Prévalence des ERC dans les effluents communaux

La recherche des ERC a été effectuée sur des échantillons d'eau collectées dans les effluents communaux entre Octobre 2017 et Décembre 2017. La présence de gènes encodant les carbapénémases a été détectée dans 5 des 40 isolats testés en Octobre 2017, 3 des 38 isolats testés en Novembre 2017 et 2 des 40 isolats testés en Décembre 2017 ayant exprimé une résistance phénotypique aux BLSE et/ou ERC (4 et 5). Ces résultats indiquent que la résistance aux carbapénèmes dans les isolats issus des effluents communaux atteint les 5-12% ; ce qui correspond à une résistance globale de **2.7-6.8% dans les effluents communaux** entre Octobre et Décembre 2017. Ces résultats suggèrent que les effluents communaux, sont aussi receveurs et source de dissémination des ERC dans l'environnement.

En Octobre 2017, 4 des 40 isolats résistants (10%) portaient le gène *bla*_{NDM-1}, et 1 isolat (2.5%) portait le gène *bla*_{OXA-48}. En Novembre 2017, les résultats montraient que 2 des 38 isolats (5.2%) et 1 des 38 isolats (5.2%) portaient respectivement les gènes *bla*_{NDM-1}, et *bla*_{VIM}. En Décembre 2017, 2 des 40 isolats testés (5%) portaient le gène *bla*_{NDM-1}. Ce qui correspond à **un portage de 2.7-5.4% du gène NDM-1, 1.6% du gène VIM et 1.3% du gène OXA-48 dans les effluents communaux**. Ainsi, une forte prévalence de portage NDM (6/118 isolats) a été détecté dans les effluents communaux.

4.2.3. Prévalence des ERC dans les effluents de la STEP du canton de Genève

*La présence de gènes encodant les carbapénémases a été détectée à l'entrée de STEP dans 3 des 30 isolats (Septembre 2017), 1 des 30 isolats (Octobre 2017) et 1 des 30 isolats (Novembre 2017) montrant une résistance phénotypique aux BLSE et/ou ERC. Après traitement, les résultats ont montré qu'un isolat résistant sur 30 était résistant aux carbapénèmes (Tableau 4 et 5). Les résultats obtenus dans cette étude montrent que **l'affluents (input) de la STEP présente une prévalence de la résistance aux carbapénèmes de 2.6-7.9%** chez les bactéries ciblées et, qu'après traitement de l'eau, ce niveau de **résistance diminue drastiquement entre d'environ 1.6%**. Ces résultats démontrent l'efficacité du processus de traitement en ce qui concerne la suppression des bactéries résistantes aux antibiotiques avec une diminution observée de 93.3% des bactéries résistantes aux carbapénèmes. *Toutefois avec un débit continu d'environ 2.5 m³/s, les effluents de la STEP constituent une source importante de la dissémination des bactéries et gènes de résistances aux antibiotiques dans l'environnement.**

Les résultats des effluents de la STEP montrent qu'en Septembre 2017, 2 sur 30 isolats résistants (6.6%) étaient porteur du gène *bla_{NDM-1}* et 1 sur 30 isolats (3.3%) étaient porteurs du gène *bla_{OXA-48}*. En Octobre 2017, les résultats ont montré que les isolats testés portaient 3.3% de gène *bla_{NDM-1}* et *bla_{VIM}*. En Novembre, 1 sur 30 isolat (3.3%) portait le gène *bla_{NDM-1}*. Parmi les isolats résistant, **le gène de carbapénémase le plus détecté est le gène *bla_{NDM-1}*** avec 3 isolat sur 90 isolats testés porteurs de ce gène.

4.2.4. Prévalence des ERC dans le fleuve Rhône, receveur terminal des effluents.

Contrairement aux autres sites d'étude, une faible quantité de bactéries résistantes a été isolée dans les échantillons en provenance du Rhône. Ce résultat est probablement dû à l'effet de dilution des effluents dans le système receveur, ce qui suggère une qualité de l'eau acceptable en ce qui concerne la prévalence de la résistance aux carbapénèmes. *Un isolat sur 17 et 1 isolat sur 25 ont été détectés comme résistant aux carbapénèmes en octobre et en novembre 2017, respectivement (Tableau 4Tableau 5 et 5). Ces deux isolats étaient porteurs du gène *bla_{VIM}*.*

Selon les résultats de cette étude, les échantillons d'eau provenant du fleuve montraient environ **1.6% de résistance aux carbapénèmes.**

Partie 5 Conclusion

Les résultats de cette étude montrent que les différents effluents communaux de la ville de Genève, des HUG, de la STEP sont des réservoirs des bactéries de résistance aux antibiotiques et plus particulièrement de résistance aux carbapénèmes.

Les effluents hospitaliers sont caractérisés par le portage le plus important avec 16-20.6% de résistance aux carbapénèmes observée chez les bactéries ciblées (flore mésotrophe aérobie liée à l'activité humaine). Dans les effluents communaux, le niveau de résistance moins élevée que celle de la STEP (2.7-6.8% de résistance aux carbapénèmes). Cette résistance dépend des quartiers prélevés. Elle est plus élevée dans les quartiers touristiques que dans les quartiers résidentiels. Après mélange des divers effluents, l'entrée de la STEP présente une prévalence moins élevée, de 2.6-7.9% de résistance aux carbapénèmes. Ce niveau de résistance va diminuer après traitement pour aboutir à un taux d'environ 1% de bactéries résistantes dans les eaux évacuées de la STEP. Toutefois avec son débit en continue (en moyenne 2.5 m³/s, lors de cette étude) et une augmentation jusqu'à 30% du taux de résistance après la décharge des eaux traitées dans le fleuve, la STEP reste une source importante de relargage de bactéries BLSE et des ERC dans le Rhône. L'eau du fleuve Rhône, milieu receveur des effluents de la STEP, présente un taux de résistance aux carbapénèmes de ~1.6%. L'analyse génétique des isolats phénotypiquement résistants aux carbapénèmes ont montré que tous les isolats étaient porteurs d'au moins un gène de résistance aux carbapénèmes. L'analyse de l'eau du Rhône en amont de la STEP a montré la présence de bactéries BLSE et ERC, ce qui démontre que la STEP d'Aire n'est pas l'unique responsable de la dissémination des BLSE et ERC dans le Rhône. Cette étude a d'ailleurs démontré une augmentation de 27% (en amont) à 58% de BLSE après la décharge des eaux de la STEP. En dépit de l'effet de l'effluent de la STEP d'Aire dans le Rhône, le cumul de la décharge des différents effluents peut être un de facteurs explicatifs de la dissémination des BLSEs et ERC détectées lors de cette étude. Il faudrait cependant noter que plusieurs autres STEPs déversent dans le lac Léman (Rhône), avec toutefois, l'influence de la dilution.

Ces résultats attestent de la dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les effluents et dans l'environnement et de la nécessité d'un suivi régulier de l'évolution de la dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques dans le canton de Genève.

Partie 6 Les perspectives

6.1. Impact des variations saisonnières sur la dissémination des bactéries résistantes aux carbapénèmes.

Afin de déterminer l'impact des variations saisonnières, nous suggérons que les différents effluents testés lors de cette étude soit analysés en période d'été. La période de Juin à Août correspond à une période de sécheresse ainsi qu'à une période où le tourisme augmente dans le canton de Genève. L'analyse des effluents pendant cette période permettrait d'estimer l'impact de la saisonnalité sur la prévalence de l'antibiorésistance.

6.2. Identification des isolats bactériens de cette étude

Notre étude a ciblé l'espèce *Escherichia coli* ainsi que les genres *Pseudomonas* et *Enterobacteriaceae*. Une identification au niveau espèces des isolats obtenus lors de cette étude par la technique MALDI-TOF est fortement recommandée.

6.3. Détermination des groupes phylogénétiques de *Escherichia coli*

Nous proposons une détermination des phylogroupes de *E. coli* (A, B1, B2, and D) afin de déterminer la proportion de portage de l'antibiorésistance dans les isolats commensaux (groupes A et B1) et dans les isolats appartenant à des pathogènes extra-intestinaux opportunistes (groupes B2 et D).

6.4. Mise en évidence du transfert horizontal des gènes liés à la résistance aux carbapénèmes

Des expériences de conjugaisons sont proposés pour les isolats porteurs des gènes *bla*_{CTX-M} et *bla*_{NDM-1} afin de mettre en évidence le potentiel disséminatif des souches isolées.

6.5. Multilocus sequence typing (MLST) des souches *K. pneumoniae*

K. pneumoniae est à la fois une bactérie commensale de l'organisme et un agent pathogène responsable d'infections communautaires variées. De plus, cette bactérie est l'hôte privilégié de certains plasmides à l'origine de multi-résistances aux aminosides, céphalosporines de 3^{ème} génération et aux carbapénèmes. Nous proposons une analyse MLST des isolats de *K. pneumoniae* afin d'identifier la présence de groupes clonaux ayant une origine clinique et/ou ayant un fort potentiel de dissémination.

Bibliographie

- Amos GCGCA, Hawkey PMGCA, Gaze WHGCA, Wellington EMGCA (2014) Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *J Antimicrob Chemother* 69:1785-1791.
- Brechet C et al. (2014) Wastewater Treatment Plants Release Large Amounts of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Into the Environment. *Clinical Infectious Diseases* 58:1658-1665. DOI:10.1093/cid/ciu190
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th ed. CLSI supplement M100 edn. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018.
- Devarajan N et al. (2017) Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions. *Water Res* 115:256-265. DOI:10.1016/j.watres.2017.02.058
- Lu S-Y et al. (2010) High Diversity of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria in an Urban River Sediment Habitat. 76:5972-5976. DOI:10.1128/AEM.00711-10 %J Applied and Environmental Microbiology
- Mesa RJ et al. (2006) Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* 58:211-215. DOI:10.1093/jac/dkl211
- Su H-C, Ying G-G, Tao R, Zhang R-Q, Zhao J-L, Liu Y-S (2012) Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. *Environmental Pollution* 169:42-49. DOI:10.1016/j.envpol.2012.05.007
- Zurfluh K et al. (2017) Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16s rRNA methylase-producing Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 50:436-440. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2017.04.017