

Etude de l'antibiorésistance d'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* isolées de l'environnement aquatique dans un contexte « One Health » :  
focus sur les eaux de surface, de baignade et les effluents hospitaliers

Study of the antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from the aquatic environment in a "One Health" context:  
focus on surface water, bathing water and hospital effluents



---

**Leslie CRETTELS**

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences vétérinaires

Année académique 2023-2024





UNIVERSITE DE LIEGE  
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE  
DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES  
SERVICE DE BACTERIOLOGIE

**Etude de l'antibiorésistance d'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* isolées de l'environnement aquatique dans un contexte « One Health » : focus sur les eaux de surface, de baignade et les effluents hospitaliers**

**Study of the antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from the aquatic environment in a "One Health" context: focus on surface water, bathing water and hospital effluents**

**Leslie Crettels**

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE**

**DOCTORAT EN SCIENCES VETERINAIRES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2023-2024**

**Illustrations de couverture :**

**Photographie d'un cours d'eau :** Copyright, Photographie réalisée par L. Crettels

**Photographie d'un antibiogramme:** Copyright, Wikimedia Commons

## *Remerciements*

Je remercie très sincèrement le Professeur Damien Thiry de m'avoir offert l'opportunité de m'inscrire en thèse de doctorat. En effet, suite à un contact téléphonique que j'avais pris pour demander des renseignements sur les antibiogrammes, celui-ci a accepté de participer au comité de suivi du projet Antibiobug puis de devenir partenaire de projet. Il m'a ensuite proposé de m'inscrire en formation doctorale et je l'en remercie. J'ai ainsi pu sortir de ma zone de confort et acquérir de nouvelles connaissances et compétences. Je n'imaginai pas que les sciences vétérinaires étaient si variées.

Je remercie le Professeur Jacques Mainil de m'avoir accueillie comme doctorante dans son service et pour son implication dans le suivi de projet.

Mes remerciements vont aussi à ma ligne hiérarchique de l'Institut Scientifique de Service Public (ISSeP), mon employeur depuis 2008, qui m'a soutenu dans ce projet en m'accordant sa confiance et une totale autonomie en me permettant de suivre les cours de formation doctorale en parallèle à mon poste de chargée de projet en microbiologie.

Je remercie les membres du comité de thèse et du comité d'accompagnement des projets ainsi que le Professeur C. Saegerman pour l'aide fournie pour la réalisation de l'analyse de risque.

Un tout grand merci à l'équipe de la cellule de microbiologie de l'ISSeP pour leur enthousiasme et leur intérêt dans les projets de recherche ainsi qu'à Elisa et Anne-Françoise, techniciennes de projet.

À ma famille, mon époux Patrick que je sollicite pour les traitements statistiques, les relectures etc.... et qui se montre toujours disponible ainsi qu'à mes deux enfants Tom et Violette.

Les projets de recherche Antibiobug 1 et Antibiobug 2 font partie du plan ENVieS financé par le Service Public de Wallonie (SPW). Le projet EBLSE est un projet Moerman, financé sur fonds propres par l'ISSeP.

## *Abréviations*

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AMC</b>	Amoxicilline + Acide clavulanique
<b>AMP</b>	Ampicilline
<b>AmpC</b>	Céphalosporinases
<b>AMR</b>	<i>Antimicrobial Resistance</i> , Résistance aux antimicrobiens
<b>ARN</b>	Acide ribonucléotidique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléotidique messager
<b>ARNt</b>	Acide ribonucléotidique de transfert
<b>BLSE</b>	$\beta$ -lactamase à spectre étendu
<b><i>bla</i></b>	Gène codant pour une $\beta$ -lactamase
<b>BRA</b>	Bactérie antibiorésistante
<b>C1G</b>	Céphalosporine de 1 <sup>ère</sup> génération
<b>C2G</b>	Céphalosporine de 2 <sup>ème</sup> génération
<b>C3G</b>	Céphalosporine de 3 <sup>ème</sup> génération
<b>C4G</b>	Céphalosporine de 4 <sup>ème</sup> génération
<b>cKp</b>	<i>Classical K. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> classique
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CP</b>	Carbapénémase
<b>CPE</b>	Entérobactéries productrices de carbapénèmases
<b>CPS</b>	Polysaccharide capsulaire bactérien
<b>CRE</b>	Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes
<b>CTX-M</b>	Céfotaximase
<b>DID</b>	<i>Defined Daily Dose per 1000 inhabitants per day</i> , dose journalière définie exprimée par 1000 habitants par jour
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EBLSE</b>	Entérobactéries productrices de BLSE
<b>EcBLSE</b>	<i>Escherichia coli</i> productrice de $\beta$ -lactamase à spectre étendu
<b>ECDC</b>	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> , Agence européenne pour la prévention et le contrôle des maladies
<b>ECOFF</b>	<i>Epidemiological Cut-Off</i> , seuil épidémiologique
<b>EDTA</b>	Acide éthylènediaminetétraacétique
<b>E.H.</b>	Equivalent-habitant
<b>EUCAST</b>	Comité européen des tests de sensibilité aux antibiotiques

<b>ExPEC</b>	<i>Extra-intestinal pathogenic Escherichia coli</i> , <i>E. coli</i> pathogène extra-intestinale
<b>GRA</b>	Gène de résistance
<b>HvKP</b>	<i>K. pneumoniae</i> hypervirulente
<b>I</b>	Sensible pour un antibiotique donné sous condition d'une forte exposition
<b>IPEC</b>	<i>Intestinal pathogenic E. coli</i> , <i>E. coli</i> pathogène intestinale
<b>KESC</b>	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i>
<b><i>K. pneumoniae</i></b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight</i> , spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol
<b>MAR index</b>	<i>Multiple Antibiotic Resistance index</i>
<b>MDR</b>	<i>Multidrug-resistant</i> , Multirésistant aux antimicrobiens
<b>MDR-Kp</b>	<i>Multidrug-resistant-K. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> multirésistante aux antimicrobiens
<b>MLST</b>	<i>Multilocus-Sequence-Typing</i> , typage de séquences multilocus
<b>MPF</b>	<i>Mating pair formation</i> , formation d'un couple d'accouplement
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>OMP</b>	Protéines de la membrane externe
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , réaction de polymérisation en chaîne
<b>PBP</b>	<i>Penicillin Binding Proteins</i> , protéines de liaison à la pénicilline
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> , réaction de polymérisation en chaîne quantitative
<b>QMRA</b>	<i>Quantitative Microbial Risk Assessment</i> , évaluation quantitative du risque microbien
<b>R</b>	Résistant pour un antibiotique donné
<b>S</b>	Sensible pour un antibiotique donné à la posologie standard
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , polymorphisme nucléotidique
<b>ST</b>	<i>Sequence type</i> , types séquentiels
<b>STEP</b>	Station d'épuration
<b>SXT</b>	Sulfaméthoxazole + Triméthoprième
<b>TBX</b>	Milieu de culture Tryptone bile X-glucuronide
<b>TBX+AMX</b>	Milieu de culture Tryptone bile X-glucuronide avec ajout d'amoxicilline
<b>UFC</b>	Unités formant colonie
<b>WGS</b>	<i>Whole genome sequencing</i> , séquençage complet du génome

## **TABLE DES MATIERES**

RÉSUMÉ - ABSTRACT.....	8
PRÉAMBULE.....	13
INTRODUCTION.....	15
1. <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	16
1.1 DESCRIPTION.....	16
1.2 ORGANISATION CELLULAIRE.....	16
1.3 PATHOGÉNICITÉ.....	18
1.4 CLASSIFICATION.....	18
1.4.1 SÉROTYPES.....	19
1.4.2 PATHOTYPES.....	19
1.4.3 TYPES SÉQUENTIELS OU <i>SEQUENCE TYPES</i> (ST).....	20
1.4.4 PHYLOGROUPES.....	20
2. <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> .....	22
2.1 DESCRIPTION.....	22
2.2 ORGANISATION CELLULAIRE.....	22
2.3 PATHOGÉNICITÉ.....	22
2.4 CLASSIFICATION.....	23
2.4.1 SÉROTYPES.....	23
2.4.2 PATHOTYPES.....	23
2.4.3 TYPES SÉQUENTIELS OU <i>SEQUENCE TYPES</i> (ST).....	24
2.4.4 PHYLOGROUPES.....	24
3. LES ANTIBIOTIQUES ET LEURS MODES D'ACTION.....	25
3.1 MODES D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES.....	25
3.1.1 ACTION SUR LA PAROI OU LES MEMBRANES BACTÉRIENNES.....	25
3.1.2 ACTION SUR LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES.....	26
3.1.3 ACTION SUR LA SYNTHÈSE DE L'ADN.....	26
4. LA RÉSISTANCE AUX ANTIMICROBIENS OU ANTIBIORÉSISTANCE.....	27
4.1 PRINCIPAUX MÉCANISMES DE RÉSISTANCE.....	27
4.1.1 INACTIVATION ENZYMATIQUE DE L'ANTIBIOTIQUE.....	28
4.1.2 MODIFICATION OU REMPLACEMENT DE LA CIBLE DE L'ANTIBIOTIQUE	
28	
4.1.3 POMPES À EFFLUX.....	29
4.1.4 PERMÉABILITÉ RÉDUITE.....	29
4.1.5 PROTECTION DE LA CIBLE DE L'ANTIBIOTIQUE.....	29
4.1.6 PIÉGEAGE DE L'ANTIBIOTIQUE.....	29



4.2	ELÉMENTS GÉNÉTIQUES IMPLIQUÉS DANS LA DISPERSION DES GÈNES DE RÉSISTANCE.....	30
4.3	MODES DE DISSÉMINATION DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES .....	31
5.	LES B-LACTAMINES .....	33
5.1	MODE D’ACTION.....	33
5.2	CLASSIFICATION.....	33
5.2.1	LES DÉRIVÉS DE L’ACIDE 6-AMINO-PÉNICILLANIQUE (FIGURE 8) .....	34
5.2.2	LES DÉRIVÉS DE L’ACIDE 7-AMINO-CÉPHALOSPORANIQUE.....	35
5.2.3	LES MONOBACTAMES.....	37
6.	LES B-LACTAMASES .....	38
6.1	CLASSIFICATION DES B-LACTAMASES .....	38
6.2	LES B-LACTAMASES À SPECTRE ÉTENDU (BLSE).....	39
6.3	LES CARBAPÉNÉMASES (CP) .....	41
6.3.1	LES CARBAPÉNÉMASES DE CLASSE A - KPC .....	41
6.3.2	LES CARBAPÉNÉMASES DE CLASSE B - IMP, VIM ET NDM .....	41
6.3.3	LES CARBAPÉNÉMASES DE CLASSE D - OXA-48 .....	42
6.4	MÉTHODES DE DÉTECTION DES RÉSISTANCES.....	42
6.4.1	DÉTECTION DES B-LACTAMASES À SPECTRE ÉTENDU (BLSE).....	44
6.4.2	DÉTECTION DES CARBAPÉNÉMASES.....	45
7.	L’ÉVALUATION QUANTITATIVE DU RISQUE MICROBIEN OU <i>QUANTITATIVE MICROBIAL RISK ASSESSMENT</i> (QMRA) .....	49
8.	TEST DE PATHOGÉNICITÉ DANS LE MODÈLE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> .....	51
9.	<i>L’ANTIBIORÉSISTANCE DANS L’ENVIRONNEMENT AQUATIQUE</i> .....	52
9.1	L’ENVIRONNEMENT AQUATIQUE, PARTIE PRENANTE DU « ONE HEALTH » .....	52
9.2	L’EAU, MILIEU ET RÉSERVOIR FAVORABLE À LA PROPAGATION DES BACTÉRIES ANTIBIORÉSISTANTES ET DES GÈNES DE RÉSISTANCE .....	53
9.3	ÉTUDES RÉALISÉES DANS L’ENVIRONNEMENT AQUATIQUE.....	54
9.4	PRINCIPALES SOURCES DE CONTAMINATION DE L’ENVIRONNEMENT AQUATIQUE ...	56
9.4.1	EAUX USÉES TRAITÉES ISSUES DES STATIONS D’ÉPURATION DES EAUX USÉES (STEP).....	56
9.4.2.	PRODUITS RÉSIDUAIRES ORGANIQUES.....	57
9.4.3	EAUX DE PISCICULTURE.....	57
9.5	LES ANTIBIOTIQUES, CONTAMINANTS DU MILIEU AQUATIQUE .....	57
9.5.1	CONSOMMATION DES ANTIBIOTIQUES EN BELGIQUE .....	59
9.5.2	PRESSIION DE SÉLECTION EXERCÉE PAR LES ANTIBIOTIQUES SUR LES BACTÉRIES ANTIBIORÉSISTANTES .....	59

---

OBJECTIFS.....	61
SECTION EXPÉRIMENTALE .....	64
ETUDE 1 :.....	65
ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF <i>ESCHERICHIA COLI</i> ISOLATED FROM FRESHWATERS AND HOSPITAL EFFLUENTS IN BELGIUM.....	65
ETUDE 2 :.....	75
ANTIMICROBIAL RESISTANT <i>ESCHERICHIA COLI</i> PREVALENCE IN FRESHWATERS IN BELGIUM AND HUMAN EXPOSURE RISK ASSESSMENT ....	75
ETUDE 3:.....	87
EXPLORING THE PRESENCE, GENOMIC TRAITS, AND PATHOGENIC POTENTIAL OF EXTENDED SPECTRUM B-LACTAMASE <i>ESCHERICHIA COLI</i> IN FRESHWATER, WASTEWATER, AND HOSPITAL EFFLUENTS .....	87
ETUDE 4 :.....	123
ETUDE ET CARACTÉRISATION DES <i>ESCHERICHIA COLI</i> ET <i>KLEBSIELLA</i> <i>PNEUMONIAE</i> PRODUCTRICES DE CARBAPÉNÉMASSES ISOLÉES DE L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE .....	123
DISCUSSION - PERSPECTIVES .....	143
ANNEXES .....	156
ANNEXE 1 : CATÉGORIES D'ANTIMICROBIENS ET AGENTS ANTIMICROBIENS CRÉÉES POUR LA DÉFINITION DE RÉSISTANCE MULTIPLE (MULTIDRUG RESISTANCE) CHEZ LES ENTÉROBACTÉRIES (MAGIORAKOS <i>ET AL.</i> , 2012) .....	157
ANNEXE 2 : SCHÉMA DES POINTS ÉCHANTILLONNÉS LORS DE L'ÉTUDE 3 .....	159
BIBLIOGRAPHIE .....	160

---

# Résumé - Summary

---

## Résumé

La résistance aux antibiotiques ou antibiorésistance est une des préoccupations majeures de l'organisation mondiale de la santé (OMS) car elle constitue une menace pour la santé humaine et animale. Elle s'étudie dans le contexte « One health » à savoir qu'il n'y a qu'une santé qu'elle soit humaine, animale ou environnementale. L'environnement aquatique, qui fait l'objet de cette étude, est un milieu récepteur, notamment des déversements d'effluents communautaires et hospitaliers traités dans des stations d'épuration qui se déversent en son sein et dans lesquels se trouvent des bactéries fécales (entérobactéries) dont font partie les espèces *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. L'objectif de ce travail est de réaliser un état des lieux de l'antibiorésistance d'*E. coli* et *K. pneumoniae* dans l'environnement aquatique en Belgique.

La première étude a évalué pour la première fois en Belgique les phénotypes de résistance d'*E. coli* isolées de cours d'eau wallons et d'effluents hospitaliers dans les bassins hydrographiques de l'Ourthe, de la Vesdre, de l'Amblève et de la Meuse lors de deux campagnes de prélèvement (en hiver et été) menées en 2019. Au total, 938 souches d'*E. coli* ont été isolées et leur(s) résistance(s) caractérisées par antibiogramme. Au total, 32,7 % des souches étaient au moins résistantes à un antibiotique. Les taux de résistance les plus élevés ont été observés pour l'ampicilline (AMP), l'amoxicilline couplée à l'acide clavulanique (AMC) et le sulfaméthoxazole/triméthoprime (SXT). Un MAR (MAR, pour *Multiple Antibiotic Resistance*) index, permettant de donner un indice de la contamination du milieu, a été calculé à chaque point de prélèvement.

La seconde étude s'inscrit dans la continuité de la première, consistant à étudier les phénotypes de résistance d'*E. coli* dans 9 points de baignades wallons. Les *E. coli* résistantes sont particulièrement préoccupantes car les baigneurs peuvent être directement en contact avec celles-ci. Neuf lieux de baignade reprenant trois lacs et cinq eaux de surface (rivières) et un fleuve canalisé (canal dans la Meuse à Jambes) ont été échantillonnés mensuellement pendant la saison balnéaire en 2021. Au total, 912 souches d'*E. coli* ont été isolées et leur(s) résistance(s) caractérisées par antibiogramme, y compris la production de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) par le test de la combinaison de disque. Un MAR index a été calculé pour comparer les sites de baignade et c'est la Lesse qui présentait le MAR index le plus élevé ainsi que la concentration en *E. coli* et le nombre d'*E. coli* productrices de BLSE les plus élevés. À l'inverse, les trois lacs présentaient des niveaux de contamination faibles. Une évaluation du risque d'exposition aux *E. coli* antibiorésistantes pour la santé humaine, basée sur le calcul de la prévalence mesurée, a été réalisée en tenant compte de quatre scénarios différents de modèle dose-réponse. Les probabilités d'exposition se sont révélées faibles hormis pour le scénario 3 (*E. coli* O157:H7), qui est le plus sévère.

Une troisième étude s'est concentrée sur la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *E. coli*, plus précisément sur les *E. coli* productrices de BLSE (EcBLSE) dans le milieu aquatique. Les méthodes de détection de résistance ont été étoffées par rapport aux deux premières études en ajoutant à la détection phénotypique, la détection génotypique comprenant notamment le séquençage de génome entier (WGS, pour *whole genome sequencing*). Au total, 644 *E. coli* ont été isolées du bassin hydrographique de l'Ourthe. La technique PCR (PCR, pour *polymerase chain reaction*) a été utilisée pour mettre en évidence les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub>, et plus particulièrement les trois groupes CTX-M-1, CTX-M-2 ou CTX-M-9. Des gènes appartenant aux groupes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> et *bla*<sub>CTX-M-9</sub> ont été détectés respectivement dans 73,6 % et 14,9 % des souches isolées. Aucun gène du groupe *bla*<sub>CTX-M-2</sub> n'a été trouvé. Un panel d'isolats (n=40) a été sélectionné pour le séquençage du génome entier (WGS). Le sérotype O18:H7 d'*E. coli* avec le type séquentiel ST1463 était prédominant (n=14). Une analyse SNP (SNP, pour *single nucleotide polymorphism*) a été réalisée et a permis de démontrer qu'il devait s'agir d'un clone. Plusieurs clones ont été isolés de l'effluent hospitalier de l'hôpital A et à l'entrée/sortie de la station d'épuration (STEP) qui reçoit cet effluent, suggérant que les effluents hospitaliers sont une source de contamination de l'environnement aquatique. La souche N8, de sérotype O18:H7 présente une pathogénicité dans le modèle *Galleria mellonella* à partir de la concentration 10<sup>6</sup> UFC/10  $\mu$ l. Les gènes de  $\beta$ -lactamase identifiés dans ce panel séquencé (n=40) étaient *bla*<sub>CTX-M</sub> (n=21), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> étant le plus représenté (n=15), ainsi que *bla*<sub>TEM</sub> (n=11), *bla*<sub>OXA</sub> (n=7) et *bla*<sub>SHV</sub> (n=9). L'une des préoccupations majeures est le grand nombre de souches - certaines isolées à partir d'eaux de surface - contenant des gènes codant pour la production de carbapénémases - *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=19), *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=2) et *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=2).

La quatrième étude s'est alors consacrée aux *E. coli* et *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases (CPE) sur base d'un screening de trois continuums hospitalier (hôpital-STEP-cours d'eau récepteur), 20 eaux de surface et 29 eaux de baignade. 24 *E. coli* CRE et 27 *K. pneumoniae* CRE ont été isolées à partir des continuums et eaux de surface, caractérisées phénotypiquement (antibiogramme), génotypiquement (PCR en temps réel mettant en évidence les gènes *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>) et par des tests immunochromatographiques. Les génomes de 11 *E. coli* et 15 *K. pneumoniae* ont été séquencés (WGS) et toutes possédaient des gènes CPE - *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=14), *bla*<sub>OXA-48</sub> (n=9), *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=1) and *bla*<sub>NDM-5</sub> (n=1) - majoritairement couplés à des gènes codant pour des BLSE.

Ce travail a donc permis d'étudier l'antibiorésistance dans l'environnement sous plusieurs angles : détection phénotypique et génétique, mais aussi géographique avec plusieurs cours d'eaux échantillonnés et différents types d'échantillons (eaux de surface et de baignade, effluents hospitaliers et communautaires). Il apporte une meilleure compréhension des résistances – notamment aux  $\beta$ -lactamines, de ses origines et voies de dissémination.

## Summary

Antibiotic resistance is one of the major concern of the World Health Organization (WHO), as it constitutes a threat to human and animal health. It is studied in the context of "One health", including human, animal or environmental health. The aquatic environment, which is the subject of this study, is a receiving environment, notably for community and hospital effluent treated in wastewater treatment plants (WWTPs) and discharged into it, in which fecal bacteria (enterobacteria) such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are found.

The first study assessed, for the first time in Belgium, the resistance phenotypes of *E. coli* isolated from Walloon region and hospital effluents in the Ourthe, Vesdre, Amblève and Meuse river watersheds during two sampling campaigns (winter and summer) carried out in 2019. A total of 938 *E. coli* strains were isolated and their resistance(s) characterized by antibiogram. 32.7% of the 938 strains were resistant to at least one antibiotic. The highest rates of resistance were observed for ampicillin (AMP), amoxicillin coupled with clavulanic acid (AMC) and sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT). A MAR index was calculated at each sampling point, providing an indication of the level of contamination in the environment.

Following on from the first study, the second investigates *E. coli* resistance phenotypes in 9 Walloon bathing areas. Resistant *E. coli* are of particular concern, as bathers may come into direct contact with them. Nine bathing sites covering 3 lakes, 5 surface waters (rivers) and one canalized river (Meuse) were sampled monthly during the 2021 bathing season. A total of 912 *E. coli* strains were isolated and their resistance(s) characterized by antibiogram, including extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) production by the disk combination test. A MAR index was calculated to compare bathing sites, and Lesse had the highest index, as well as absolute *E. coli* abundance and number of ESBL-producing *E. coli*. Conversely, the 3 lakes had low levels of contamination. An assessment of the risk of exposure to antibiotic-resistant *E. coli* for human health, based on the calculation of measured prevalence, was carried out taking into account four different dose-response model scenarios. Exposure probabilities were found to be low, except for scenario 3 (*E. coli* O157:H7), which is the most severe.

A third study focused on  $\beta$ -lactam resistance in *E. coli*, and more specifically on ESBL-producing *E. coli* (EcBLSE) in the aquatic environment. Resistance detection methods with genotypic detection and whole genome sequencing (WGS) were used. 644 *E. coli* were isolated from the Ourthe watershed on a selective medium for EcBLSE. After phenotypic characterization by antibiogram, the PCR (*polymerase chain reaction*) technique was used to identify the frequently encountered *bla*<sub>CTX-M</sub> ESBL genes, and more specifically the 3 groups CTX-M-1, CTX-M-2 or CTX-M-9. Genes belonging to the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and

*bla*<sub>CTX-M-9</sub> groups were detected in 73.6% and 14.9% of isolated strains respectively. No genes from the *bla*<sub>CTX-M-2</sub> group were found. A panel of isolates (n=40) was selected for whole genome sequencing. *E. coli* serotype O18:H7 with sequence type ST1463 predominated (n=14). SNP analysis showed that they must be the same clone. The strain N8 with O18:H7 serotype showed pathogenicity in the *Galleria mellonella* model from 10<sup>6</sup> CFU/10 µl. The β-lactamase genes identified in this panel were *bla*<sub>CTX-M</sub> (n=21), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> being the most represented (n=15), as well as *bla*<sub>TEM</sub> (n=11), *bla*<sub>OXA</sub> (n=7) and *bla*<sub>SHV</sub> (n=9). A major concern is the large number of strains - some isolated from surface water - containing genes coding for carbapenemase production - *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=19), *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=2) and *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=2). This third study showed that hospital effluents and WWTPs contribute to the dissemination of antibiotic-resistant bacteria in the environment, and highlighted the spread of carbapenemase-producing *E. coli* (CPE) in the aquatic environment.

The fourth study focused on *E. coli* and *K. pneumoniae* CPE, based on a screening of 3 hospital continuums (hospital-WWTP-receiving river), 20 surface waters and 29 bathing waters. 24 CRE *E. coli* and 27 CRE *K. pneumoniae* were isolated from continuums and surface waters, characterized phenotypically (antibiogram), genotypically (real-time PCR highlighting the *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> genes) and by immunochromatographic tests. The genomes of 11 *E. coli* and 15 *K. pneumoniae* were sequenced, and all possessed CPE genes - *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=14), *bla*<sub>OXA-48</sub> (n=9), *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=1) and *bla*<sub>NDM-5</sub> (n=1) - mostly coupled to ESBL-encoding genes.

This work has therefore enabled us to study antibiotic resistance in the environment from several angles: phenotypic and genetic detection, as well as geographical, with several rivers sampled and different types of samples (surface and bathing waters, hospital and community effluents). It provides a better understanding of resistance - particularly to β-lactam antibiotics - and of its origins and routes of dissemination.

---

# Préambule

---



La résistance aux antimicrobiens (AMR) constitue une des dix principales menaces pour la santé mondiale selon l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2019a). Sans intervention, l'AMR pourrait causer 10 millions de décès chaque année d'ici 2050 et contraindre jusqu'à 24 millions de personnes à l'extrême pauvreté d'ici 2030 (OMS, 2019b). Le développement de résistances s'est accéléré ces dernières décennies, en particulier en raison d'un usage inapproprié et de la surconsommation des produits antimicrobiens (OMS, 2016). Sans antibiotiques efficaces pour le traitement des infections, les procédures médicales et les opérations médicales majeures deviennent des événements à très haut risque.

Les entérobactéries et plus particulièrement les espèces bactériennes *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont des bactéries intestinales de l'homme et des animaux. Ces bactéries ubiquistes peuvent circuler tant chez les hommes que chez les animaux soit directement (contact) soit indirectement (nourriture ou eau contaminée) et diffuser dans l'environnement. *E. coli* est utilisée comme indicateur de contamination fécale dans les eaux de baignade (Official Journal of the European Union, 2006). Les *E. coli* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (EcBLSE) et les *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes (CRE) sont reprises comme indicateur primaire pour la surveillance de la résistance aux antimicrobiens dans le monde (ECDC, EFSA and EMA, 2017).

L'environnement aquatique est un milieu récepteur soumis à des pressions anthropiques dans lequel les bactéries antibiorésistantes peuvent être déversées par le biais des rejets d'eaux usées hospitalières ou municipales et de l'élevage intensif (Pruden et al., 2006 ; Pereira et al., 2013). Ces eaux, si elles sont récréatives, peuvent également représenter un risque pour la santé humaine. Le principe « One Health » qui considère qu'il n'y a qu'une santé, qu'elle soit humaine, animale ou environnementale a ici tout son sens.

Aucune étude chiffrant la contamination de l'environnement aquatique par ces bactéries antibiorésistantes n'existait au préalable en Belgique et il n'y a actuellement aucun outil de surveillance réglementaire. Dans le contexte actuel du changement climatique et des évolutions des pratiques de l'eau (réutilisation des eaux usées, potabilisation des eaux de rivières et canaux), les caractérisations phénotypique, génotypique -notamment par séquençage- des *E. coli* et *K. pneumoniae* antibiorésistantes isolées de l'environnement aquatique permettent d'obtenir un état des lieux de la contamination et d'en identifier les sources ainsi que d'améliorer nos connaissances de la génétique de ces résistances.

---

# Introduction

---

## 1. *Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) a été découverte par le pédiatre allemand Theodor Escherich, qui l'a isolée d'excréments de bébés en 1885. Le genre *Escherichia* comprend 14 espèces (Parte, 2014) dont l'espèce-type est *Escherichia coli* qui est l'organisme modèle procaryote le plus étudié dans les domaines de la biotechnologie et de la microbiologie.

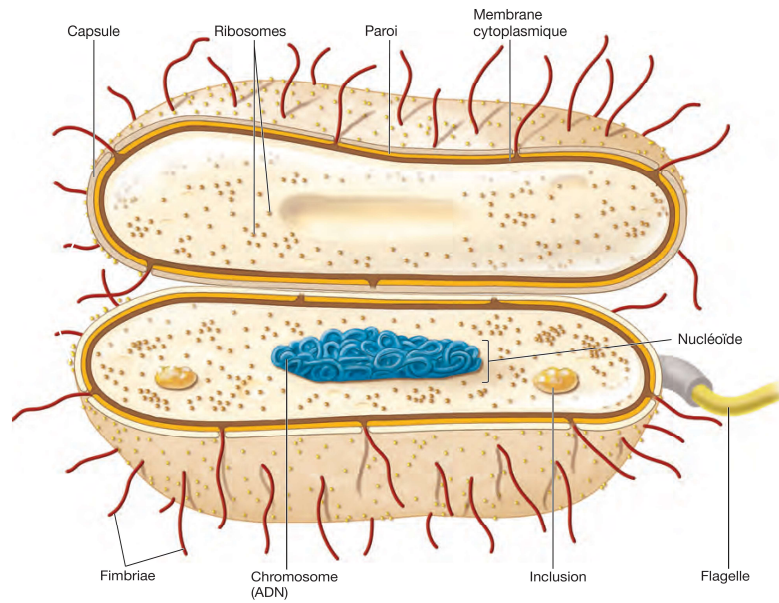
### 1.1 Description

*E. coli* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet, anaérobie facultative, non sporulante. Cette bactérie commensale vit dans l'intestin des hommes et animaux à sang chaud mais également chez certains animaux à sang froid et est excrétée dans l'environnement par les fèces. *E. coli* peut survivre durant de longues périodes dans les matières fécales, le sol et l'eau. La combinaison de facteurs abiotiques (disponibilité des sources d'énergie et de nutriments, pH, humidité et température) et biotiques (microflore indigène, y compris les protozoaires) définit les conditions dans lesquelles *E. coli* va survivre. Les valeurs extrêmes ou fluctuantes de chaque paramètre entraînent des niveaux de stress variables pour les cellules, ce qui se traduit par des temps de survie différents (Van Elsas et al., 2011). *E. coli* est fréquemment utilisée comme indicateur de contamination fécale, comme c'est le cas pour les eaux de baignade (Basavaraju and Gunashree, 2023). *E. coli* colonise le tractus gastro-intestinal d'un nouveau-né dans les heures qui suivent la naissance et plusieurs souches d'*E. coli* ont été identifiées comme probiotiques efficaces. Bien que la plupart des souches d'*E. coli* soient sans danger, certaines souches peuvent être pathogènes.

### 1.2 Organisation cellulaire

L'organisation cellulaire d'*E. coli* est celle caractéristique d'une bactérie à Gram négatif (Figure 1). Le cytoplasme contient le matériel génétique (chromosome circulaire d'ADN et des plasmides), les ribosomes et les inclusions granulaires. Il est entouré par une membrane cytoplasmique, puis d'un espace périplasmique qui contient le peptidoglycane et d'une membrane externe (deuxième membrane phospholipidique). A cette membrane externe sont attachées des molécules de lipopolysaccharide (LPS), qui sont relarguées à la mort de la bactérie et qui contiennent une endotoxine (lipide A). Des *fimbriae* (attachement aux muqueuses intestinales), des pili (conjugaison plasmidique) et des flagelles (mobilité bactérienne) peuvent également y être attachés (Quinn, 2011).

1a



1b

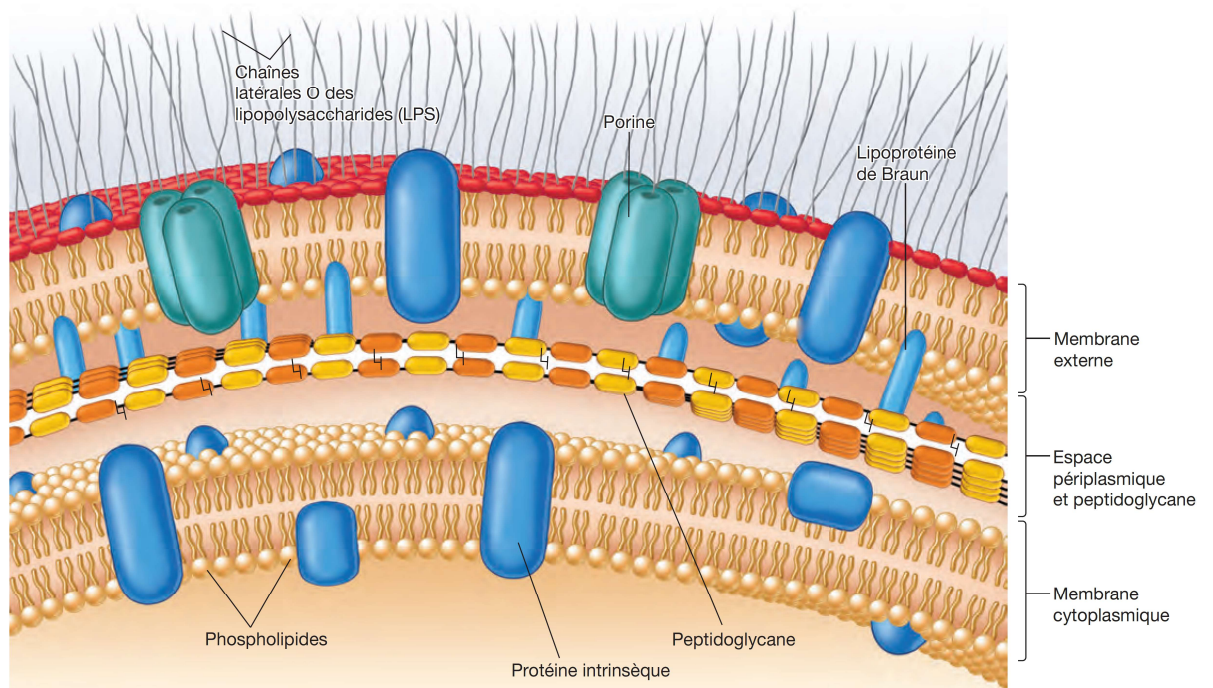


Figure 1 : Organisation cellulaire d'une bactérie (1a) et de la paroi d'une bactérie à Gram négatif (1b) (adaptée de Microbiologie de Prescott, 5<sup>ème</sup> édition).

### 1.3 Pathogénicité

La majorité des souches d'*E. coli* sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes pour l'homme et peuvent causer diverses infections spécifiques ou non, comme des diarrhées, cystites, septicémies, pyélonéphrites, méningites ou arthrites. Une grande diversité de facteurs de virulence sont responsables de ce pouvoir pathogène à savoir la capacité à coloniser les surfaces muqueuses, l'invasion de l'hôte, la production de toxines avec par exemple les toxines de Shiga, ou les endotoxines provenant du LPS. Des facteurs de virulence sont communs aux différents pathotypes d'*E. coli* tels les adhésines (fimbriae et OMP), les sidérophores, les hémolysines, le lipide A (endotoxine) du LPS tandis que d'autres sont spécifiques à certains pathotypes, comme c'est le cas pour la présence de capsule chez certaines souches invasives (Figure 2).

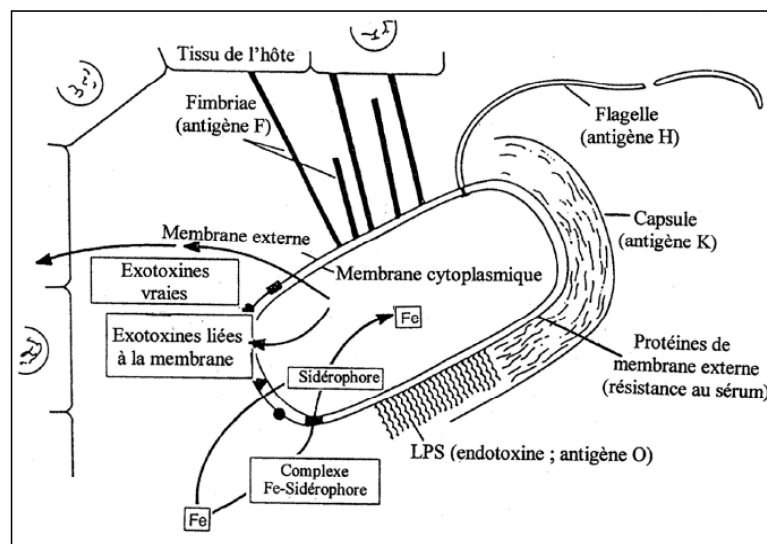


Figure 2 : Résumé schématique des propriétés potentielles de virulence des souches invasives d'*Escherichia coli* (adaptée de Mainil J. and Van Bost S., 2004).

### 1.4 Classification

Suite à la grande variabilité génétique des différentes souches d'*E. coli*, plusieurs classifications ont vu le jour. Certaines sont fondées sur le sérotype et le pathotype, qui sont des caractéristiques phénotypiques et sont déterminées à partir du matériel génétique tandis que d'autres se basent exclusivement sur le matériel génétique comme celle du type séquentiel ou du phylogroupe. Ces classifications sont succinctement décrites ci-dessous.

### 1.4.1 Sérotypes

Les sérotypes d'*E. coli* reprennent les antigènes somatiques portés par le LPS (O), les antigènes flagellaires (H), les antigènes capsulaires (K) et fimbriaux (F) (Figure 3). Il existe jusqu'à 50000 à 100000 combinaisons de sérotypes puisqu'il y a près de 173 antigènes O, environ 103 antigènes K, 75 antigènes H et quelques antigènes F (Basavaraju and Gunashree, 2023; Orskov and Orskov, 1992). Chaque combinaison de sérotype reprend les numéros des antigènes qu'il exprime (Quinn, 2011). Par exemple, O157:H7, pour l'antigène somatique O type 157 et l'antigène flagellaire type 7.

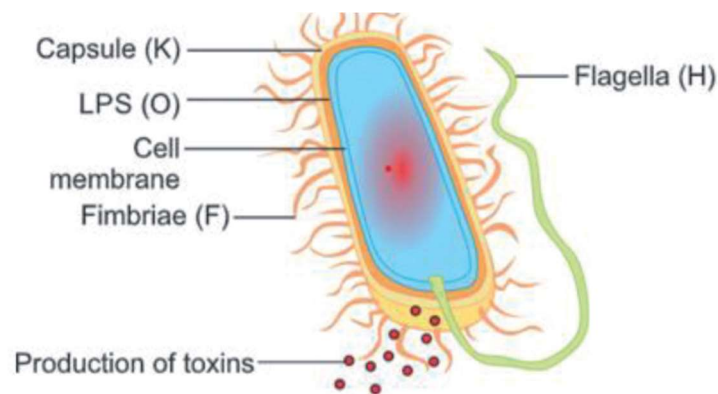


Figure 3 : Structure antigénique d'*E. coli* (Basavaraju and Gunashree, 2023).

### 1.4.2 Pathotypes

En fonction de la présence de facteurs de virulence spécifiques, des mécanismes d'infection, du tropisme tissulaire, des interactions avec les cellules de l'hôte et des symptômes cliniques, les *E. coli* peuvent être classés en différents pathotypes (tableau 1).

Globalement, les *E. coli* pathogènes sont réparties en deux groupes : les *E. coli* pathogènes intestinales (InPEC) responsables d'infections intestinales (diarrhée) et les *E. coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC) responsables par exemple de septicémie, infection urinaire ou mammaire.

Tableau 1 : Différents pathotypes de *E. coli* (Pokharel et al., 2023).

	Acronyme	Nom	Symptômes
InPEC	EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogène	diarrhée aiguë et prolongée chez les nourrissons
	EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragique	colite hémorragique et syndrome hémolytique et urémique
	ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxigène	diarrhée du voyageur
	EAEC	<i>E. coli</i> entéroagréatif	diarrhée aiguë et chronique
	DAEC	<i>E. coli</i> adhérent diffus	diarrhée aqueuse chez les jeunes enfants
	EIEC	<i>E. coli</i> entéro-invasif	diarrhée aiguë et chronique
	AIEC	<i>E. coli</i> adhérent-invasif	pathogénèse des maladies inflammatoires de l'intestin
ExPEC	UPEC	<i>E. coli</i> uropathogène	infections des voies urinaires
	NMEC	<i>E. coli</i> de la méningite néonatale	méningite néonatale
	SEPEC	<i>E. coli</i> associé à la septicémie	bactériémie et septicémie
	APEC	<i>E. coli</i> pathogène aviaire	infections respiratoires et systémiques graves chez les volailles

### 1.4.3 Types séquentiels ou *sequence types* (ST)

La technique du MLST (*multilocus-sequence-typing*) cible 7 gènes « domestiques » d'*E. coli* (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*). Les différences observées dans les séquences de ces gènes cibles permettent de classer les bactéries. Ces gènes sont identifiés soit par des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) soit *in silico* sur base des séquences génomiques. À l'heure actuelle, suite au développement du séquençage complet du génome, les analyses sont également faites sur le *core genome* (cgMLST) ou le génome complet (wgMLST) et en fonction des propriétés des gènes, un type séquentiel (ST) et un complexe clonal (CC) sont attribués à la souche étudiée (Quainoo et al., 2017).

### 1.4.4 Phylogroupes

Au départ subdivisé en quatre phylogroupes (groupes A, B1, B2 et D) basés sur la présence de certains gènes dans le génome (Clermont et al., 2000), la classification actuelle d'*E. coli* s'étend actuellement à 8 phylogroupes (A, B1, B2, C, D, E, F et G) (Clermont et al., 2013). Ces phylogroupes peuvent être déterminés par PCR multiplex ou *in silico* sur base des séquences génomiques (Beghain et al., 2018; Clermont et al., 2013). Ces phylogroupes sont associés à certains hôtes, environnement spécifique ou mode de vie. Par exemple, les souches des phylogroupes B2 et D sont impliquées dans des infections extra-intestinales (Picard et al., 1999), tandis que les souches adaptées à l'eau appartiennent au

phylogroupe B1 (Berthe et al., 2013). Les souches d'*E. coli* entérohémorragiques (EHEC) se trouvent dans les phylogroupes B1 et E, ce dernier englobant la principale lignée clonale virulente O157:H7 distribuée dans le monde entier (Dallman et al., 2021).

Cette classification est également utile d'un point de vue épidémiologique, puisque la prévalence des phylogroupes varie selon l'espèce considérée : chez les humains, les souches du groupe A (40,5%) et du groupe B2 (25,5%) sont prédominantes tandis que chez les autres mammifères, le groupe B1 prédomine (41%) suivi par le groupe A (22%) et B2 (21%) (Beghain et al., 2018).



## 2. *Klebsiella pneumoniae*

La bactérie *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) a été découverte en 1882 par Carl Friedländer qui l'avait isolée des poumons de personnes décédées de pneumonie. Le genre *Klebsiella* comprend 27 espèces (Parte, 2014) dont l'espèce-type est *Klebsiella pneumoniae* qui est celle la plus fréquemment impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales.

### 2.1 Description

Tout comme *E. coli*, *K. pneumoniae* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. *K. pneumoniae* est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet, anaérobie facultative, généralement immobile et capsulée. Ces bactéries ubiquitaires sont présentes dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des animaux (dont l'homme) en tant que bactéries commensales. Elles sont fréquentes dans les selles et peuvent être un indicateur d'une contamination fécale. Elles sont abondantes dans le sol, les eaux et sont des fixateurs de l'azote atmosphérique. Les *K. pneumoniae* ont tendance à survivre plus longtemps dans les sédiments d'eau de surface que les *E. coli* (Allen Burton et al., 1987). Ces bactéries causent jusqu'à 5 % des infections urinaires communautaires et 9 % des nosocomiales (Denis, 2007). *Klebsiella pneumoniae* peut être à l'origine de nombreuses infections invasives aiguës ou persistantes, nosocomiales ou communautaires, à différents endroits du corps.

### 2.2 Organisation cellulaire

La structure cellulaire de *K. pneumoniae* est analogue à celle d'*E. coli* (Figure 1) puisque ces deux espèces bactériennes appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*.

### 2.3 Pathogénicité

Contrairement à d'autres agents pathogènes nosocomiaux, les clones de *K. pneumoniae* les plus problématiques (en termes de gravité de la maladie) sont clairement divisés en deux groupes phénotypiquement distincts qui se caractérisent soit par une multirésistance, soit par une hypervirulence (David et al., 2019; Russo and Marr, 2019).

Les facteurs de virulence les plus étudiés chez *K. pneumoniae* comprennent le polysaccharide capsulaire bactérien (CPS), le lipopolysaccharide (LPS), les *fimbriae*, les protéines de la membrane externe (OMP) et les sidérophores liant le fer (Figure 4) (Paczosa and Mecsas, 2016). La plupart des souches de *K. pneumoniae* produisent un CPS robuste qui confère une résistance à la fois aux peptides antimicrobiens et à la phagocytose par les cellules immunitaires de l'hôte. Les LPS, les *fimbriae* de type 1 et de type 3 et les OMP contribuent à la capacité de la bactérie à résister à la phagocytose, affectent l'adhérence aux

surfaces biotiques et abiotiques et modifient la perméabilité membranaire aux antibiotiques (Gomez-Simmonds and Uhlemann, 2017).

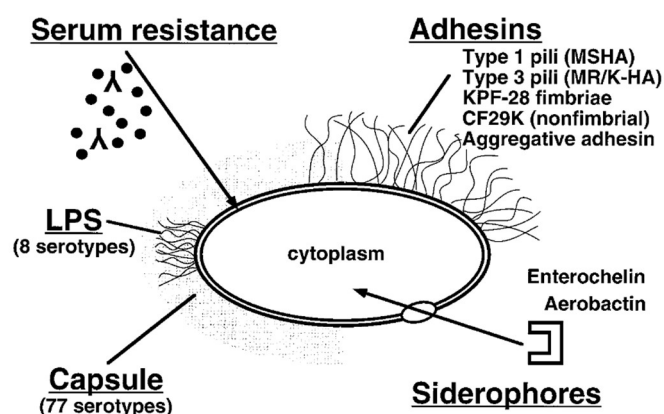


Figure 4 : Schéma reprenant les principaux facteurs de virulence chez *K. pneumoniae* (adaptée de Podschun and Ullmann, 1998).

## 2.4 Classification

Il n'existe pas de classification unique car *K. pneumoniae* présente une structure de population caractérisée à la fois par une grande diversité génétique et phénotypique (Bialek-Davenet et al., 2014; Brisse et al., 2009) mais également par la présence d'un nombre relativement faible de lignées génétiques clonales responsables des infections hypervirulentes (Wyres et al., 2020).

### 2.4.1 Sérotypes

Les *K. pneumoniae* ne sont pas caractérisés par une combinaison antigénique comme c'est le cas pour *E. coli* (par exemple, *E. coli* O157:H7). Par contre, la détermination du type de capsule (typage K) par sérotypage ou PCR multiplex (Choi et al., 2020) ou séquençage du gène *wzi* (Brisse et al., 2020) est utilisé dans la classification. Au moins 78 types K existent. Le typage K est fréquemment utilisé pour classer les *K. pneumoniae* hypervirulentes (hvKp), à l'intérieur desquelles les bactéries appartenant aux types K1 et K2 sont prévalentes (Gonzalez-Ferrer et al., 2021). Le type de LPS (typage O) est également utilisé pour classer les *K. pneumoniae*, les types O1, O2, O3 et O5 étant les plus retrouvés (Choi et al., 2020).

### 2.4.2 Pathotypes

Au cours des dernières décennies, deux pathotypes distincts ont été reconnus : les *K. pneumoniae* hypervirulentes (HvKp) qui provoquent une maladie fulgurante et les *K. pneumoniae* classiques cKp

(Russo and Marr, 2019) qui sont à priori moins pathogènes mais peuvent facilement acquérir une multirésistance aux antimicrobiens (MDR-Kp), y compris une résistance aux carbapénèmes (CR-Kp) (Gonzalez-Ferrer et al., 2021). Les *K. pneumoniae* hypervirulents (HvKp) possèdent une virulence accrue due à la présence de gènes conférant par exemple une hypermucoviscosité mais également à la présence de sidérophores tels que la salmocheline et l'aérobactine, de *peg344* (un transporteur putatif), de la colibactine, une génotoxine, et d'opérons codant pour des gènes de résistance à la tellurite et à l'argent (Russo and Marr, 2019).

### 2.4.3 Types séquentiels ou *sequence types* (ST)

La classification sur base du MLST, basée sur le typage cible de 7 gènes « domestiques » (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* et *tonB*) est utilisée comme langage commun de la classification chez *K. pneumoniae* (Diancourt et al., 2005). Elle permet la reconnaissance d'importants types séquentiels (ST) émergents, tels que le ST23, qui est associé aux abcès du foie, et le ST15, qui est associé à la multirésistance aux antimicrobiens dans le monde entier (Brisse et al., 2020).

### 2.4.4 Phylogroupes

Sur la base du séquençage d'un petit nombre de gènes (Brisse and Verhoef, 2001; Fevre et al., 2005), 3 phylogroupes distincts - KpI, KpII et KpIII – ont premièrement été définis. Le séquençage entier du génome (WGS) a ensuite permis de distinguer 7 phylogroupes différents appartenant au complexe d'espèce de *K. pneumoniae* (Wyres et al., 2020). Il a été proposé de redéfinir ces phylogroupes comme des espèces distinctes, l'espèce *K. pneumoniae* correspondant au premier phylogroupe KpI. En outre, il existe plus de 150 lignées profondément ramifiées dans ce phylogroupe KpI, y compris de nombreux clones multirésistants ou hypervirulents (Holt et al., 2015).

### 3. Les antibiotiques et leurs modes d'action

Les antibiotiques sont des substances produites par voie naturelle, semi-synthétiques ou synthétiques qui peuvent tuer (activité bactéricide) ou inhiber la croissance (activité bactériostatique) des bactéries qui y sont sensibles et qui sont utilisés pour traiter les maladies infectieuses des animaux, hommes et végétaux (Quinn, 2011).

#### 3.1 Modes d'action des antibiotiques

Les différents modes d'action des antibiotiques sont présentés succinctement dans cette section. La figure 5 montre les sites et modes d'actions ainsi que les familles d'antibiotiques qui y sont associés.

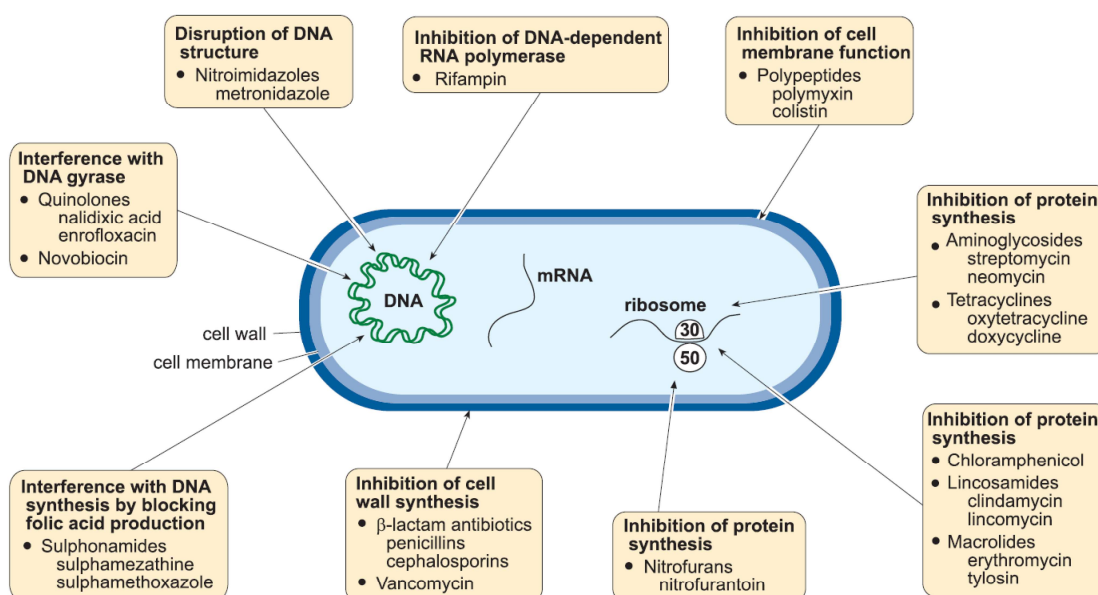


Figure 5 : Modes et sites d'actions des différentes familles d'antibiotiques (adaptée de Quinn, 2011).

#### 3.1.1 Action sur la paroi ou les membranes bactériennes

Deux types d'actions ayant un effet bactéricide sont possibles. La première concerne l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane, comme c'est le cas pour les  $\beta$ -lactamines, ou de ses liaisons avec d'autres composants de la paroi. La deuxième, plus rare, est l'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique, ce qui entraîne une incapacité de la bactérie à conserver son homéostasie (Quinn, 2011).

### **3.1.2 Action sur la synthèse des protéines**

Ces antibiotiques interagissent directement avec l'une des sous-unités du ribosome, qui traduit normalement l'ARNm en protéines, ou avec un ARNt (ARN de transfert), qui « véhicule » vers le ribosome les acides aminés qui seront ajoutés à la chaîne polypeptidique en formation. Ces interactions peuvent affecter différentes étapes de la formation des protéines. Il en résulte un effet bactéricide ou bactériostatique (Quinn, 2011).

### **3.1.3 Action sur la synthèse de l'ADN**

Plusieurs antibiotiques ont un effet direct ou indirect sur la synthèse de l'ADN. Selon le site d'action, ces antibiotiques ont un effet bactéricide ou bactériostatique. Certains antibiotiques empêchent la réplication de l'ADN en interférant avec l'activité de certaines enzymes, ne permettant plus à la bactérie de se multiplier et de se diviser. Lorsque l'antibiotique agit au niveau de la transcription, la bactérie n'est plus capable de former les ARN messagers (ARNm) et ne pourra, donc, plus synthétiser de protéines. Certains antibiotiques agissent en amont, en inhibant la synthèse de l'acide folique, précurseur des nucléotides (Quinn, 2011).

## 4. La résistance aux antimicrobiens ou antibiorésistance

Certaines bactéries possèdent une résistance innée envers des antimicrobiens spécifiques, c'est-à-dire qu'elles ont une caractéristique fonctionnelle ou structurelle qui leur confère une certaine tolérance, voire une insensibilité totale vis-à-vis de ceux-ci. D'autres sont capables d'acquérir une résistance, qualifiée de résistance acquise (Muylaert and Mainil, 2012). La résistance croisée est définie comme la résistance par un même mécanisme d'une bactérie à une substance active (métaux ou biocide antimicrobien) et/ou à un ou plusieurs antibiotiques. La co-résistance se définit, quant à elle, comme l'existence au sein d'une bactérie de plusieurs mécanismes conférant chacun une résistance à diverses familles d'antibiotiques. Les gènes correspondants sont souvent adjacents (physiquement liés) et exprimés d'une façon coordonnée comme dans les intégrons (Muylaert and Mainil, 2012). La co-résistance est régulièrement décrite pour l'association de certaines résistances, comme celle unissant les gènes *bla* de résistance aux pénicillines aux gènes *qac*, *ars*, *cad* ou *mer* codant la résistance aux antiseptiques (chlorhexidine) ou aux métaux (arsenic, cadmium, mercure, etc) (Anses, 2020).

Depuis les années 1960 ont émergé des bactéries multirésistantes (MDR, pour *multidrug resistance*) qui représentent un vrai problème de santé publique. La multirésistance est définie comme étant la résistance à au moins un agent de minimum trois catégories d'antimicrobiens (Magiorakos et al., 2012). Des catégories d'antimicrobiens pour différentes bactéries responsables d'infection ont été créées par l'ECDC. Par exemple, pour les *Enterobacteriaceae*, plusieurs catégories d'antimicrobiens faisant partie des  $\beta$ -lactamines sont définies comme les pénicillines, les pénicillines avec inhibiteur de  $\beta$ -lactamases, les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération, les céphalosporines à large spectre de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération, les céphamycines, les monobactames, les carbapénèmes (Magiorakos et al., 2012, voir Annexe 1).

### 4.1 Principaux mécanismes de résistance

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action des agents antimicrobiens, les plus répandus étant l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification ou le remplacement de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif ou encore la pénétration réduite de la molécule. D'autres mécanismes tels que la protection ou la sur-production de la cible de l'antibiotique sont également décrits. Ils sont, cependant, plus rares et surtout associés à certaines classes de composés.

La figure 6 présente une illustration de ces différents mécanismes de résistance au sein des bactéries à Gram négatif.

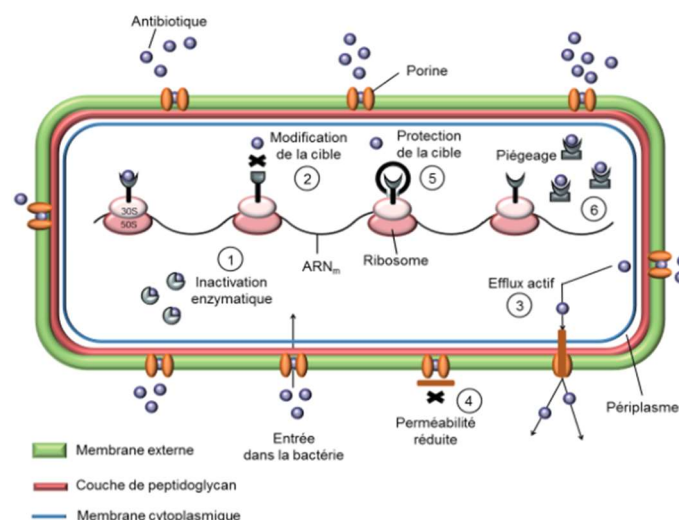


Figure 6 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie à Gram négatif (adaptée de Muylaert and Mainil, 2012).

#### 4.1.1 Inactivation enzymatique de l'antibiotique

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines via les  $\beta$ -lactamases, aux aminoglycosides et aux phénicolés. On décrit également ce type de résistance pour le groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines), pour les tétracyclines, pour la fosfomycine et plus récemment pour les fluoroquinolones, bien que cette inactivation ne représente pas le mécanisme de résistance qui prévaut pour ces molécules. L'enzyme, en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. La production de ces enzymes est généralement associée à des éléments génétiques mobiles (Aleksun and Levy, 2007; Nikaido, 2009).

#### 4.1.2 Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. La modification de la cible, mécanisme de résistance décrit pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides et aux molécules du groupe MLS chez les bactéries à Gram positif, et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries à Gram positif et Gram négatif. Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible. Le remplacement de la cible de l'antibiotique est, quant à lui, un mécanisme décrit pour les sulfamidés, les diaminopyrimidines (triméthoprime) et les  $\beta$ -lactamines (Aleksun and Levy, 2007; Nikaido, 2009).

### 4.1.3 Pompes à efflux

L'efflux actif, médié par des protéines transmembranaires connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs, est un mécanisme nécessitant de l'énergie et utilisé par les bactéries pour expulser des antimicrobiens. La résistance provient de la réduction de concentration en antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui limite son accès à sa cible (Muylaert and Mainil, 2012).

### 4.1.4 Perméabilité réduite

Chez les bactéries à Gram négatif et plus précisément chez les *Enterobacteriaceae*, les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires nommées porines. Des mutations au niveau des gènes qui codent pour ces porines et qui conduisent à leur perte, ou à la réduction de leur taille ou encore à une diminution de leur expression, se traduiront par l'acquisition de bas niveaux de résistance vis-à-vis de nombreux antimicrobiens. Citons comme exemple, la réduction de l'expression de la porine OmpF chez *E. coli* qui entraîne une réduction de sensibilité aux quinolones, aux  $\beta$ -lactamines, aux tétracyclines et au chloramphénicol (Muylaert and Mainil, 2012).

### 4.1.5 Protection de la cible de l'antibiotique

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones. Ainsi, on ne dénombre pas moins de huit protéines de protection ribosomiale qui confèrent une résistance aux tétracyclines en les déplaçant de leur site de fixation par la création d'un encombrement stérique au niveau du ribosome (Muylaert and Mainil, 2012).

### 4.1.6 Piégeage de l'antibiotique

Les bactéries sont capables de piéger un antibiotique en augmentant la production de sa cible ou en produisant une autre molécule possédant une affinité pour ce dernier. Il en résulte une diminution de l'antibiotique à l'état libre au niveau de la cible. Ainsi des mutations chromosomiques responsables d'une surproduction des cibles des sulfamidés et du triméthoprimé ont été décrites chez de nombreuses espèces bactériennes (Muylaert and Mainil, 2012).



## 4.2 Eléments génétiques impliqués dans la dispersion des gènes de résistance

Les gènes de résistance observés en clinique chez les espèces bactériennes pathogènes sont pour la plupart portés par des éléments génétiques mobiles. Il en existe un panel, pouvant être impliqués dans la dispersion des gènes de résistance aux antibiotiques. Ceux-ci sont présentés au tableau 2.

Tableau 2 : Eléments génétiques impliqués dans la dispersion des gènes de résistance (Muylaert and Mainil, 2012).

Elément génétique	Caractéristiques	Rôles
<b>Plasmide conjugatif</b>	- Circulaire - Elément de répllication autonome - Présence des gènes nécessaires au transfert par conjugaison	- Transfert de gènes de résistance - Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
<b>Plasmide mobilisable</b>	- Circulaire - Elément de répllication autonome - Présence des gènes permettant d'utiliser l'appareil de conjugaison d'un plasmide conjugatif	Transfert de gènes de résistance
<b>Transposon et ISCR</b>	Capacité de déplacement depuis un segment d'ADN vers un autre à l'intérieur d'une bactérie	Transport de gènes de résistance du chromosome vers un plasmide et vice versa
<b>Transposon conjugatif</b>	- Elément intégré pouvant s'exciser pour former un intermédiaire de transfert non répllicatif - Présence des gènes nécessaires au transfert par conjugaison	- Transfert de gènes de résistance - Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
<b>Cassette de gène</b>	- Circulaire - Segment d'ADN non répllicatif - Présence seulement d'une fenêtre de lecture ouverte - Intégration dans les intégrons	Porte des gènes de résistance
<b>Intégron</b>	- Segment d'ADN intégré - Présence d'une intégrase, d'un promoteur, et d'un site d'intégration pour la cassette de gène	Groupe de gènes de résistance dont l'expression est sous le contrôle du promoteur de l'intégron
<b>Ilot génomique et EIC</b>	- Segment d'ADN chromosomique - Présence des gènes nécessaires aux déplacements et au transfert par conjugaison	- Transfert de gènes de résistance - Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
<b>Bactériophage</b>	- Virus de bactérie - Circulaire ou non - Elément de répllication autonome	- Transfert de gènes de résistance - Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
<b>Fragment d'ADN isolé dans le milieu</b>	Transféré par transformation d'une bactérie compétente	Porte des gènes de résistance

ISCR : *insertion sequence common region*

EIC : éléments intégratifs conjugatifs (=ICE)

La classification des plasmides peut se faire sur base de leur incompatibilité : s'il est impossible pour deux plasmides de coexister de manière stable dans une lignée bactérienne, ces deux plasmides sont dits incompatibles et classés dans le même groupe d'incompatibilité *Inc* (Krebs *et al.*, 2013). Les plasmides peuvent également être classés sur base de leur mobilité : les plasmides conjugatifs portent des gènes permettant leur répllication par transfert d'ADN, ainsi que la formation d'un complexe de paires d'accouplement (MPF), associé à la membrane, qui est une forme de système de sécrétion de type 4 qui fournit le canal d'accouplement. Un plasmide qui code pour son propre ensemble de gènes MPF est dit auto-transmissible ou conjugatif. S'il utilise un MPF d'un autre élément génétique présent dans la cellule, il est dit mobilisable. Certains plasmides sont appelés non mobilisables parce qu'ils ne sont ni conjugatifs

ni mobilisables. Ils se propagent par transformation naturelle ou par transduction. Ainsi, les plasmides peuvent être classés en trois catégories selon leur mobilité : conjugatifs, mobilisables et non mobilisables (Smillie et al., 2010).

Les intégrons sont des éléments génétiques susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques, insérés sous forme d'éléments mobiles, les cassettes. Celles-ci sont en effet intégrées ou excisées par un système de recombinaison spécifique de site qui fait intervenir une intégrase. Les intégrons sont constitués de deux régions 5' et 3' conservées, entre lesquelles peuvent s'intégrer une ou plusieurs cassettes. La région 5' immobile de l'intégron contient un gène *intI*, codant pour une intégrase *intI1*. Plusieurs classes d'intégrons ont été définies en fonction de leur intégrase et trois d'entre elles (classes 1, 2 et 3), bien caractérisées, sont impliquées à ce jour dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Ploy et al., 2000). La recherche des intégrons de classe 1 est souvent proposée comme indicateur unique du fait du lien épidémiologique entre la présence d'intégrons et la multirésistance aux antimicrobiens. Ils sont facilement détectables et quantifiables par la recherche du gène codant l'intégrase *intI1* et peuvent être utilisés comme indicateur de pollution anthropogénique (Gillings et al., 2015).

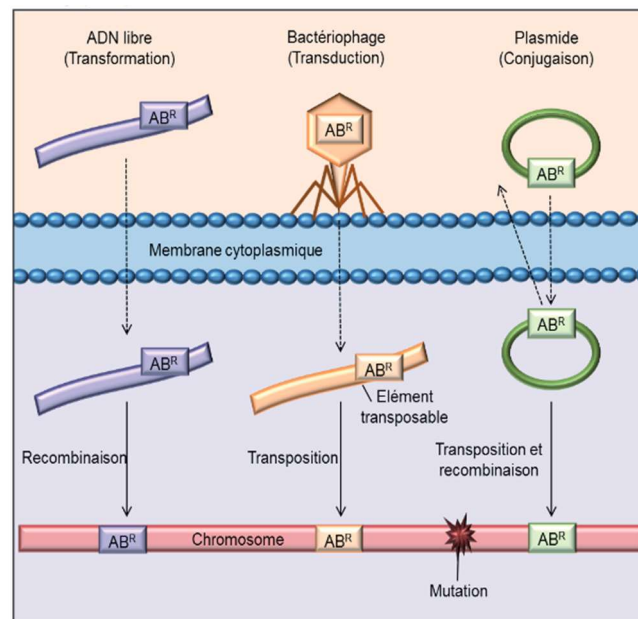
La plasticité du génome bactérien complexifie les mécanismes de dispersion des gènes de résistance. En effet, les plasmides peuvent s'intégrer dans le chromosome, les transposons peuvent sauter du chromosome à un plasmide ou inversement, et les intégrons peuvent être localisés sur le chromosome mais également sur des plasmides ou des transposons. Apparaissent ainsi des structures modulaires plus ou moins complexes (un intégron localisé sur un transposon lui-même inséré dans un plasmide, par exemple) capables de se disséminer efficacement. C'est le cas des plasmide IncHI2 qui ont acquis des transposons porteurs de gènes de résistance aux antimicrobiens (Cain and Hall, 2012). Des mutations ponctuelles peuvent modifier ces gènes acquis et élargir le spectre des enzymes produites, comme par exemple les  $\beta$ -lactamases TEM 1/2 qui ont donné naissance à plus de 150 BLSE (Anses, 2020).

### 4.3 Modes de dissémination de la résistance aux antibiotiques

Les mouvements des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent se produire à deux niveaux distincts, à savoir intra- et intercellulaire, impliquant chacun des éléments de mobilité différents.

Au niveau intracellulaire, les gènes de résistance aux antibiotiques se déplacent à l'intérieur du génome bactérien composé du chromosome et d'élément répliatif tel que les plasmides et les phages, via des recombinaisons homologues (homologie de séquences) ou non (site spécifique) des transposons et des intégrons.

Quant aux mouvements intercellulaires (transmission horizontale), trois mécanismes en sont potentiellement responsables, à savoir, les transformations, les transductions et les conjugaisons (Figure 7) (Boerlin and Reid-Smith, 2008). La conjugaison est considérée comme étant le mécanisme le plus efficace pour échanger du matériel génétique entre bactéries. La transformation, restreinte au laboratoire à certaines espèces bactériennes dites naturellement transformables, pourrait être plus répandue qu'on ne le croit dans la nature, notamment dans les sols. La transduction dépend de l'infection par un bactériophage véhiculant des éléments autres que son propre génome dans sa capsid phagique, parfois des gènes de résistance (Anses, 2020).



Le terme général élément transposable désigne une séquence d'insertion, ou un transposon qu'il soit composite, complexe ou conjugatif, ou un bactériophage transposant, ou encore un intégron.  $AB^R$  : gène de résistance à un antibiotique.

Figure 7 : voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques (adaptée de Alekshun and Levy, 2007).

## 5. Les $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines, également appelées  $\beta$ -lactames dû à la structure du noyau qui les compose, constituent la famille d'antibiotiques la plus largement utilisée. Depuis la découverte de la benzylpénicilline dans les années 1920, des centaines de nouveaux dérivés de la pénicilline et des classes de  $\beta$ -lactamines apparentées telles que les céphalosporines, céphamycines, monobactames et carbapénèmes ont été découverts. Chaque nouvelle classe de  $\beta$ -lactamines a été développée soit pour élargir le spectre d'activité à de nouvelles espèces bactériennes, soit pour s'attaquer à des mécanismes de résistance spécifiques apparus chez les espèces bactériennes ciblées.

### 5.1 Mode d'action

Les  $\beta$ -lactamines sont des agents bactéricides qui interrompent la formation de la paroi cellulaire bactérienne par liaison covalente avec des protéines liant la pénicilline (PBP pour *Penicillin Binding Proteins*), enzymes qui sont impliquées dans les étapes terminales de la réticulation du peptidoglycane chez les bactéries à Gram négatif et positif (Bush and Bradford, 2016). Grâce à l'homologie structurale du cycle  $\beta$ -lactame avec le dipeptide terminal D-Ala D-Ala du pentapeptide constituant le maillon élémentaire du peptidoglycane, les  $\beta$ -lactamines se comportent comme des « substrats suicide » (Quellec, 2015).

Les  $\beta$ -lactamines ne sont donc efficaces que sur les bactéries en croissance, lorsque cette synthèse est la plus active. Chez les bactéries à Gram positif, les  $\beta$ -lactamines peuvent atteindre directement leurs cibles, tandis que chez les bactéries à Gram négatif, elles doivent franchir la membrane externe via des porines pour atteindre leurs cibles situées dans le périplasme (Bush and Bradford, 2020; Guérin, 2021).

### 5.2 Classification

Les  $\beta$ -lactamines sont classées en trois grands groupes en fonction de leur structure qui comporte communément un cycle  $\beta$ -lactame : les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique, les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et les monobactames (tableau 3).

Tableau 3 : Classification des  $\beta$ -lactamines en fonction de leur structure (<https://microbiologie-clinique.com/beta-lactamine.html>).

Les $\beta$ -lactamines			
Les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique		Les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique	Les monobactames
Les pénames	Les pénicillines du groupe G	Les céphalosporines de 1 <sup>ère</sup> génération	
	Les pénicillines du groupe M	Les céphalosporines de 2 <sup>ème</sup> génération	
	Les pénicillines du groupe A	Les céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération	
	Les carboxypénicillines	Les céphalosporines de 4 <sup>ème</sup> génération	
	Les acyluréidopénicillines	Les nouvelles céphalosporines	
	Les amidinopénicillines	Les oxacéphèmes	
	Les pénicillines sulfones		
Les oxapénames			
Les carbapénèmes			

### 5.2.1 Les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique (Figure 8)

Ce groupe intègre les pénames, caractérisés par un noyau de base associant un cycle  $\beta$ -lactame à un cycle thiazolidine, spécifique des pénicillines. Les pénicillines sont très largement utilisées en médecine humaine et vétérinaire, notamment via l'amoxicilline, associée ou non à l'acide clavulanique (BELMAP, 2023; ECDC, 2020).

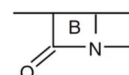
La pénicilline G ou benzylpénicilline découverte par Fleming en 1928 et la pénicilline V ou phénoxyéthylpénicilline possèdent un spectre antibactérien étroit, limité aux bactéries à Gram positif (Guérin, 2021). La synthèse de nouvelles pénicillines, dites semi-synthétiques (amino-, carboxy-, aminido- et acyluréido-pénicillines), a permis d'élargir le spectre d'action aux bactéries à Gram négatif dont certaines sont résistantes aux  $\beta$ -lactamases (Guérin, 2021).

Les oxapénames possèdent un noyau clavame dérivé du noyau péname par substitution du soufre en position 1 par un oxygène. Le seul représentant actuellement utilisé est l'acide clavulanique, qui inhibe la plupart des  $\beta$ -lactamases de la classe A d'Amber en se fixant sur leurs sites actifs. L'acide clavulanique est utilisé en association avec une autre  $\beta$ -lactamine comme l'amoxicilline ou la ticarcilline, ce qui permet de conserver, au moins partiellement, leur activité en présence de souches bactériennes productrices de  $\beta$ -lactamases (Cavallo et al., 2004).

Ce groupe comprend également les carbapénèmes qui sont dérivés de la thiénamycine, produite naturellement par *Streptomyces*. L'atome de soufre du pentacycle péname est remplacé par un atome de carbone pour donner un noyau pénème. Cette introduction du carbone dans le noyau pentagonal, à l'origine du terme de carbapénème, renforce le pouvoir de fixation aux protéines cibles (PBP). Les carbapénèmes possèdent en position 6 un groupement hydroxyéthyle en position trans à la place des groupes amino-acyl en cis portés par les autres  $\beta$ -lactamines. Ce groupement assure une stabilité

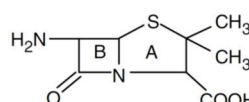
importante vis-à-vis de l'action d'une grande variété de  $\beta$ -lactamases, ce qui leur confère un spectre antibactérien extrêmement large (Cavallo et al., 2004). Cependant, les carbapénèmes peuvent être inhibés par des carbapénémases (CP) (CBIP, 2023). Ces antibiotiques sont actifs vis-à-vis de très nombreuses espèces de bacilles à Gram négatif dont les entérobactéries, *Pseudomonas* et *Acinetobacter baumannii* (Grall et al., 2011). Les carbapénèmes sont limités à un usage hospitalier, prescrits majoritairement dans le cadre du traitement d'infections nosocomiales (Nordmann and Carrer, 2010).

#### Cycle commun $\beta$ -lactame (B)



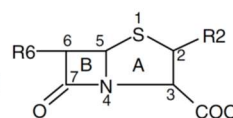
#### Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique

Cycle  $\beta$ -lactame (B) + cycle thiazolidine (A)

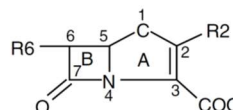


#### • Pénames (pénicillines)

- Pénicillines G et V sensibles aux pénicillinases
- Pénicillines antistaphylococciques résistantes aux pénicillinases : pénicillines M semi-synthétiques
- Pénicillines à large spectre (ampicilline et apparentés) et pénicillines actives sur *Pseudomonas aeruginosa* (carboxypénicillines et uréidopénicillines)
- Amidinopénicillines (pivmécillinam)
- Pénicillines sulfones (sulbactam et tazobactam)



#### • Carbapénèmes



#### • Clavames ou oxapénames

- Acide clavulanique

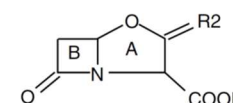


Figure 8 : Classification des  $\beta$ -lactamines : dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique (adaptée de Cavallo et al., 2004).

### 5.2.2 Les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique

Leur noyau de base associe un cycle  $\beta$ -lactame à un cycle dihydrothiazine pour former l'acide 7-amino-céphalosporanique (noyau céphème) (Figure 9). La classification des céphalosporines, basée sur leur chronologie de commercialisation, se fait par génération. Les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération (C1G) ont un spectre semblable à celui des pénicillines naturelles tandis que celles de 2<sup>ème</sup> génération (C2G) se rapprochent des amino-pénicillines, avec un spectre étendu à de nombreuses bactéries à Gram négatif. Les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) ont aussi un spectre étendu et certaines possèdent une activité contre *Pseudomonas aeruginosa* et les céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération (C4G) possèdent un spectre renforcé. Les C4G sont, en effet, moins sensibles à un certain nombre de  $\beta$ -lactamases et possèdent une meilleure activité sur les staphylocoques (CBIP, 2023; Guérin, 2021). Les C5G ont des effets plus forts sur les bactéries à Gram positif que les quatre générations précédentes, en particulier sur les *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. En plus d'une forte bactéricidie et d'un profil

de tolérance satisfaisant, ces C5G se sont montrées intéressantes pour le traitement des pneumonies communautaires (ceftaroline), des pneumonies liées aux soins (ceftobiprole) et des infections de la peau et des tissus mous (Charles et al., 2017). Les C3G, C4G et C5G sont repris comme antibiotique d'importance critique pour la médecine humaine et sont associés à une priorité majeure par l'OMS.

Les céphamycines comme la céfoxitine et le céfotétan sont rattachées aux C2G du fait de leur spectre très proche, étendu à certaines entérobactéries productrices de BLSE et aux anaérobies à Gram négatif. Elles sont caractérisées par un radical  $\alpha$ -méthoxy en position 7. Ce radical protège le noyau  $\beta$ -lactame de l'hydrolyse par les  $\beta$ -lactamases, mais est responsable d'un effet inducteur intense sur les céphalosporinases chromosomiques de type AmpC (Cavallo et al., 2004).

Les oxacéphèmes comme le moxalactam ont un noyau céphème dont l'atome de soufre en position 1 est remplacé par un atome d'oxygène qui permet une meilleure pénétration à travers la paroi des bacilles à Gram négatif, en raison de la plus grande hydrophilie de la molécule, et une activité inhibitrice de certaines  $\beta$ -lactamases par une analogie de structure avec les clavames (acide clavulanique). En revanche, il en résulte une diminution de l'activité vis-à-vis des cocci à Gram positif par diminution de l'affinité pour leurs PBP.

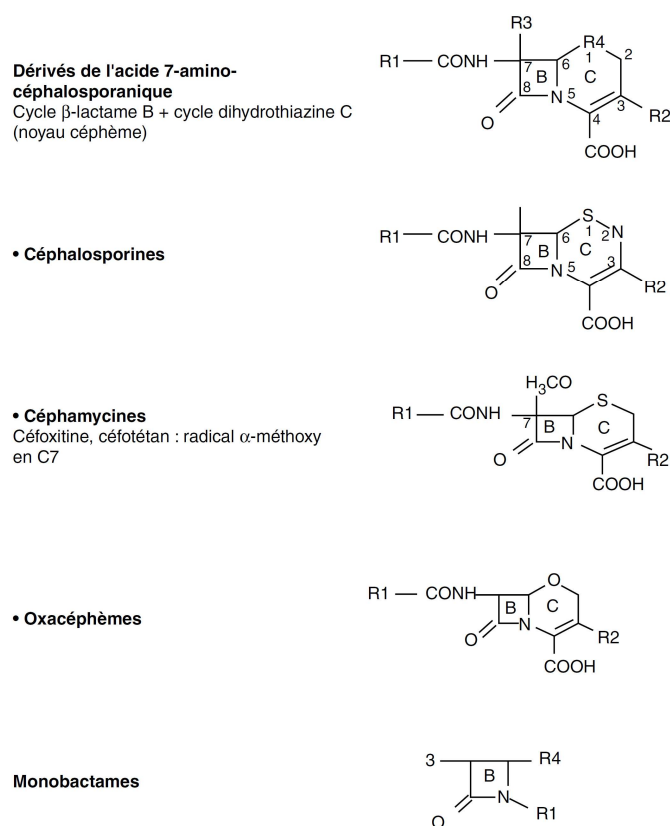


Figure 9 : Classification des  $\beta$ -lactamines : dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et monobactames (adaptée de Cavallo et al., 2004).

### 5.2.3 Les monobactames

Il n'existe qu'une molécule à ce jour, l'aztréonam (Figure 9), qui est un antibiotique  $\beta$ -lactame monocyclique. Cette particularité le rend très résistant à l'hydrolyse par les  $\beta$ -lactamases (Azactam, RCP), mais il reste hydrolysable par les BLSE et CP (Cayston, RCP). Il n'est actif que contre les bactéries aérobies à Gram négatif (CBIP, 2023). Tout comme les carbapénèmes, cette classe n'est pas disponible pour un usage vétérinaire (Guérin, 2021).



## 6. Les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont un groupe hétérogène d'enzymes d'origine bactérienne capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines par ouverture du cycle  $\beta$ -lactame. Elles constituent de loin le mécanisme le plus répandu de résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines (Livermore, 2003). D'autres mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines existent en moindre mesure tels que la modification de la cible (c'est-à-dire les PBP), la modification de la perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et/ou à des pompes à efflux générales ou spécifiques. Ils ne sont pas détaillés dans ce travail.

### 6.1 Classification des $\beta$ -lactamases

Il existe un grand nombre de  $\beta$ -lactamases et de leurs variants, c'est pourquoi leur classification est complexe. Les deux classifications les plus connues sont celles d'Ambler (1980) qui est fondée sur l'homologie de séquence des acides aminés et celle de Bush-Jacoby-Medeiros (1989) qui se base sur les propriétés fonctionnelles des enzymes telles que leur point isoélectrique, leur poids moléculaire, leur substrat d'activité et leur profil d'inhibition. Les BLSE appartiennent à la catégorie 2be et 2d de cette classification (Rodriguez-villalobos and Struelens, 2006).

La classification d'Ambler divise les  $\beta$ -lactamases en quatre classes (A à D) (Figure 10). Les classes A, C et D contiennent des  $\beta$ -lactamases avec la sérine dans leur site actif.

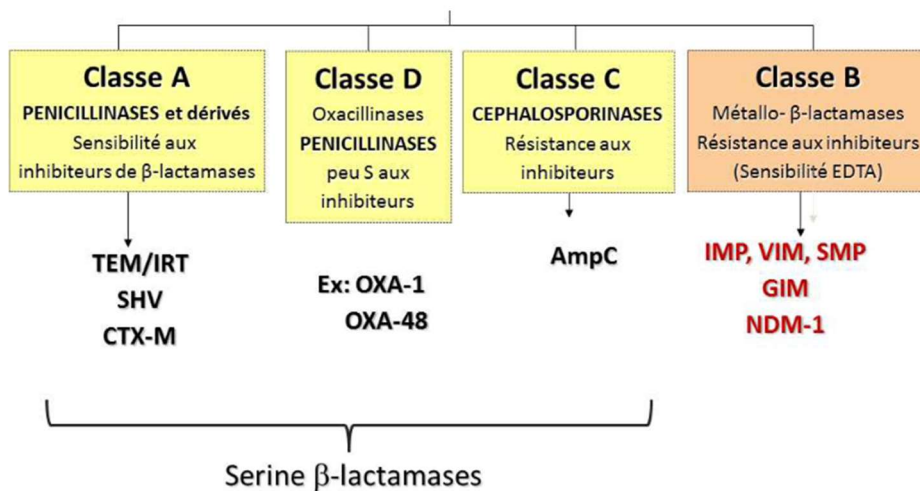


Figure 10 : Classification des  $\beta$ -lactamases : Classe A, B, C et D d'Ambler (adaptée de Quellec, 2015).

La classe A contient les  $\beta$ -lactamases qui restent habituellement sensibles aux inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases, tandis que les trois autres classes ne sont pas ou peu inhibées par ceux-ci.

La classe B contient des enzymes comportant un ou deux ions  $Zn^{2+}$  au site actif. Elles peuvent être inhibées par les chélateurs d'ions, tel que l'EDTA, via la perte du  $Zn^{2+}$ . Elles sont désignées comme métallo- $\beta$ -lactamases et peuvent hydrolyser les carbapénèmes. Ces  $\beta$ -lactamases hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines, à l'exception des monobactames. De plus, elles résistent aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Les  $\beta$ -lactamases de la classe C sont des céphalosporinases (type AmpC) car elles confèrent une résistance aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> à 3<sup>ème</sup> génération ainsi qu'aux céphamycines (céfoxitine) et pénicillines, mais pas au céfépime (C4G). Ces  $\beta$ -lactamases sont résistantes aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Elles sont codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques.

La classe D contient des  $\beta$ -lactamases actives principalement sur l'oxacilline et la méticilline. Beaucoup de ces  $\beta$ -lactamases sont d'origine plasmidique, bien que ce critère ne soit pas pris en compte dans la catégorisation. Les  $\beta$ -lactamases majeures de cette classe sont les différents variants d'OXA, dont la CP OXA-48 (Tooke et al., 2019).

## 6.2 Les $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Il n'y a pas de consensus concernant la définition des BLSE. Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, les C1G-C2G-C3G-C4G et l'aztréonam. Elles n'hydrolysent pas les carbapénèmes ni les céphamycines (céfoxitine) et sont inhibées *in vitro* par les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) (Rodriguez-villalobos and Struelens, 2006).

La majorité des BLSE peuvent être divisées en trois groupes : il s'agit des gènes TEM, SHV et CTX-M (tableau 4) (Pitout and Laupland, 2008).

Tableau 4 : Principaux gènes de BLSE (adapté de Castanheira et al., 2021).

Gènes	Nomenclature	Caractéristiques
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<u>Tem</u> oneira, nom du patient infecté avec le 1 <sup>er</sup> isolat TEM-1	Variant par mutation de TEM-1 ou TEM-2
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<u>Sul</u> fhydryl reagent <u>var</u> iable	Variant par mutation de SHV-1
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	$\beta$ -lactamase hydrolysant le <u>Cefotax</u> ime isolé à <u>Munich</u>	Dérivée de la $\beta$ -lactamase chromosomique de <i>Kluyvera</i> spp.

Jusqu'à la fin des années 1990, la majorité des BLSE détectées étaient de type TEM ou SHV. Un grand nombre de BLSE dérivent de TEM-1 et SHV-1 par mutations ponctuelles dans la séquence génétique

codant pour leur site actif. A l'heure actuelle, il existe plus de 183 variants de type TEM et plus de 178 de type SHV (Bush and Bradford, 2020).

A partir de 1995, de « nouvelles » BLSE ont émergé de façon explosive chez les entérobactéries. Il s'agit notamment du cluster CTX-M qui confère une résistance marquée au céfotaxime (d'où son nom) et au céfépime, responsables d'infections communautaires, notamment urinaires (Pitout et al., 2005).

Contrairement aux BLSE de type TEM/SHV, les mécanismes de diffusion de CTX-M semblent plus complexes, mettant en jeu la diffusion de plasmides (épidémies de plasmides) et/ou d'autres éléments génétiques mobiles (comme les intégrons et les séquences d'insertion) plutôt que la diffusion unique d'un clone bactérien (Poirel et al., 2008). *E. coli* ST 131 a été identifié comme la lignée prédominante causant des infections extra-intestinales, et la dissémination de CTX-M-15, gène BLSE le plus répandu dans le monde, est en partie due à la propagation de ce clone efficace (Peirano and Pitout, 2010). Sa dissémination a entraîné une augmentation des infections par *E. coli* résistant aux fluoroquinolones et produisant des  $\beta$ -lactamases de type CTX-M dans le monde entier (Bush and Bradford, 2020; Peirano and Pitout, 2019, 2010; Pitout and DeVinney, 2017).

A l'origine, le déterminant génétique de l'enzyme CTX-M était localisé sur le chromosome d'un type de bactéries de l'environnement, *Kluyvera* spp, qui est une bactérie retrouvée en eaux douces (Pitout and Laupland, 2008). Sur base phylogénétique, le cluster CTX-M est divisé en 5 groupes (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25) (Figure 11). Les groupes 1, 9 et 2 sont actuellement prédominants.

	CTX-M cluster				
	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
<b>Year (enzyme, country)<sup>a</sup></b>	1989 (CTX-M-1, Germany)	1986 (FEC-1, Japan)	1996 (CTX-M-8, Brazil)	1994 (CTX-M-9, Spain)	2000 (CTX-M-25, Canada)
<b>Enzymes</b>	CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -29, -30, -32, -33, -28, -36, -54, UOE-1	CTX-M-2, -4, -6, -7, -20, -31, -44 (previously TOHO-1), FEC-1	CTX-M-40	CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -24, -27, -45 (previously TOHO-2), -46, -47, -48, -49, -50,	CTX-M, -26, -25, -39, -41
<b>Origin</b>	<i>K. ascorbata</i>	<i>K. ascorbata</i>	<i>K. georgiana</i>	<i>K. georgiana</i>	ND

<sup>a</sup> Year of first isolation or description (first enzyme described and country of isolation); CTX-M-14 and CTX-M-18 are identical; ND: not defined.

Figure 11 : Différents groupes CTX-M et origine des gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> (adaptée de Cantón and Coque, 2006).

### 6.3 Les carbapénémases (CP)

L'augmentation de la prévalence des bactéries productrices de BLSE a entraîné la prescription de carbapénèmes, qui a favorisé la propagation d'entérobactéries productrices de carbapénémases (CPE) potentiellement incurables (Bevan et al., 2017). Leur augmentation spectaculaire ainsi que l'impact clinique de leur infection représentent un problème de santé mondial. La production de CP est particulièrement problématique chez les membres de la famille des entérobactéries, *K. pneumoniae* étant l'espèce chez laquelle la plupart de ces CP ont été identifiées (Bonomo et al., 2018).

#### 6.3.1 Les carbapénémases de classe A - KPC

Les carbapénémases de classe A, les plus fréquentes et les plus menaçantes, sont les carbapénémases de type KPC. La première souche exprimant KPC (KPC-1 = KPC-2 ; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) fut identifiée dans une souche de *K. pneumoniae* en 1996, en Caroline du Nord aux États-Unis. KPC-2 hydrolyse toutes les  $\beta$ -lactamines bien que les céphamycines et la ceftazidime soient de mauvais substrats. Son activité est partiellement inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. Le plus souvent, les souches qui produisent KPC expriment également d'autres  $\beta$ -lactamases dont de nombreux types de BLSE (TEM, SHV, CTX-M) et possèdent un certain degré de résistance par imperméabilité (Nordmann and Carrer, 2010). Les *K. pneumoniae* producteurs de KPC sont largement répandues aux États-Unis, mais elles sont également endémiques dans certains pays européens tels que la Grèce et l'Italie (Munoz-Price et al., 2013) ce qui n'est pas le cas en Belgique dans les hôpitaux où les carbapénémases KPC sont retrouvées en seconde position (37%) après les OXA-48 (54%) (De Laveleye et al., 2017).

#### 6.3.2 Les carbapénémases de classe B - IMP, VIM et NDM

Les premières carbapénémases de classe B ou métallo- $\beta$ -lactamases ont été identifiées dans des espèces d'entérobactéries typiquement hospitalières (*Serratia*, *Citrobacter* et *Enterobacter*) au Japon. Il s'agit des nombreuses variétés de  $\beta$ -lactamases de type IMP et VIM, GIM-1, KHM-1 et NDM-1, isolées dans le monde entier. En 2009, une nouvelle CP a été découverte chez un patient suisse revenu d'Inde, l'enzyme New-Delhi-Métallo- $\beta$ -lactamase de type 1 (NDM-1), encodée par le gène du même nom ( $bla_{NDM-1}$ ) (Yong et al., 2009). Ces enzymes hydrolysent fortement toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'aztréonam. Leur activité n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam. Les niveaux de résistance aux carbapénèmes sont assez variables. Dans de nombreux cas, les souches productrices de métallo- $\beta$ -lactamases produisent aussi des BLSE. Les gènes de ces métallo- $\beta$ -lactamases sont, le plus souvent, plasmidiques et associés au sein d'intégrons et de transposons, structures qui assurent la mobilité de ces gènes de résistance et la multirésistance aux antibiotiques des souches (Nordmann and Carrer, 2010).

### 6.3.3 Les carbapénémases de classe D - OXA-48

En 2001, la CP OXA-48, encodée par le gène *bla<sub>OXA-48</sub>* dérivé des gènes *bla<sub>OXA</sub>*, a été décrite pour la première fois dans un isolat de *K. pneumoniae*, provenant d'un homme de 54 ans présentant une infection urinaire et des brûlures cutanées, en Turquie (Poirel et al., 2004). Elle hydrolyse fortement les carbapénèmes et n'hydrolyse pas les C3G. Son activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique. OXA-48 est souvent associée à d'autres  $\beta$ -lactamases, en particulier des BLSE, ce qui contribue à la multirésistance des souches. En l'absence d'autres  $\beta$ -lactamases, les souches qui ne produisent que OXA-48 peuvent ne présenter qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes. Le gène OXA-48 est localisé au sein d'un transposon comportant deux séquences d'insertion identiques assurant mobilité et expression (Nordmann and Carrer, 2010).

Les principaux gènes de CP sont détaillés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Principaux gènes de CP (adapté de Wilson and Török, 2018).

Gènes	Espèce d'origine	Origine géographique	Site actif	Classe d'Ambler	Localisation	Plasmide
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caroline du Nord, USA (1996)	Sérine	A	Tn4401	multiple
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Turquie, Istanbul (2001)	Sérine	D	Tn1999	IncL/M
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	<i>Serratia marcescens</i>	Préfecture d'Aichi, Japon (1991)	Zinc	B	Variable – chromosomique, intégron classe I	IncA/C, IncH, IncL/M
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	New Delhi, Inde (2008)	Zinc	B	Tn125	multiple
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vérone, Italie (1997)	Zinc	B	intégron classe I, In2-Tn402	IncHI2, IncI1, IncN

### 6.4 Méthodes de détection des résistances

Plusieurs méthodes permettent de détecter les résistances, à savoir des méthodes phénotypiques ou génotypiques. Les tests phénotypiques permettent de déduire le type de résistance exprimé par la bactérie, tandis que les tests génotypiques, souvent plus coûteux, permettent de mettre en évidence le(s) gène(s) de résistance présent(s). La combinaison de ces deux méthodes permet de connaître ce qui est inscrit dans les gènes mais également ce qui est exprimé.

Les tests phénotypiques regroupent des méthodes telles que la diffusion en gélose à partir de disques imprégnés de l'antibiotique (antibiogramme), la méthode par dilution en bouillon, et des bandelettes imprégnées d'un gradient de concentration d'antibiotique à déposer sur une gélose ensemencée (bandelette E-test) (Guérin, 2021).

La CMI (concentration minimale inhibitrice) est définie comme la concentration la plus faible d'un agent antibactérien exprimée en mg/L ( $\mu\text{g/mL}$ ) qui, dans des conditions *in vitro* strictement contrôlées, empêche complètement la croissance visible de la souche testée d'un organisme (Kowalska-Krochmal and Dudek-Wicher, 2021). La relation entre la concentration d'un antibiotique et la résistance est définie par la CMI.

La méthode par diffusion, dite des « disques », repose sur la diffusion d'un antibiotique dans une gélose (en surface et en profondeur). L'effet d'un antibiotique est visualisé par un diamètre d'inhibition de la bactérie autour de ce disque, corrélé de manière directe et quasi linéaire à la CMI. Lorsque la CMI est déterminée, cette valeur « brute » n'est d'aucune utilité pour un praticien. Il faut catégoriser la souche en sensible/intermédiaire, actuellement renommée « sensible à haute dose » /résistante via des seuils appelés « breakpoints ». Une CMI inférieure à la concentration critique inférieure (concentration obtenue dans le plasma d'un homme/animal sains après administration d'une dose « normale » d'antibiotique), se traduit par une souche dite sensible. Inversement, si la CMI est supérieure à la concentration critique supérieure, définie comme la concentration à partir de laquelle la toxicité/effets indésirables l'emporte sur les bénéfices, alors la souche est dite résistante (G. Lequeux, 2016).

Les diamètres d'inhibition mesurés sont comparés à ceux fournis par différents référentiels en fonction des types de bactéries, comme ceux fournis par le comité européen de l'antibiogramme (EUCAST, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) afin de permettre une harmonisation des pratiques et une comparaison des résultats. La comparaison des diamètres peut être réalisée par rapport aux valeurs cliniques ou *clinical breakpoints*, axées sur le patient infecté par la bactérie, ou par rapport aux valeurs épidémiologiques (ECOFF, *epidemiological cut-off value*) qui permet la comparaison par rapport à une population sauvage (non résistante) (Guérin, 2021).

Les tests génotypiques peuvent être réalisés selon quatre méthodes : la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), le séquençage du génome complet (WGS), les micro-puces à ADN et les analyses métagénomiques. Ces tests ne sont pas détaillés dans ce travail.

Le séquençage complet du génome (chromosome et plasmides) permet d'obtenir un grand nombre d'informations en un seul test, comme l'identification de la bactérie, son typage, ses gènes de résistance (Quainoo et al., 2017). Son principal avantage est la possibilité de couvrir de nombreuses cibles différentes en même temps et de sous-typier des variantes génétiques spécifiques.

Les méthodes de détection des BLSE et CP, deux  $\beta$ -lactamases étudiées dans ce travail, sont détaillées ci-dessous.

#### 6.4.1 Détection des $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)

L'EUCAST (Comité européen des tests de sensibilité aux antibiotiques) définit les lignes directrices pour identifier les mécanismes de résistance et notamment la présence d'entérobactéries productrices de BLSE. Le logigramme présenté à la figure 12 explique la détection phénotypique des EBLSE.

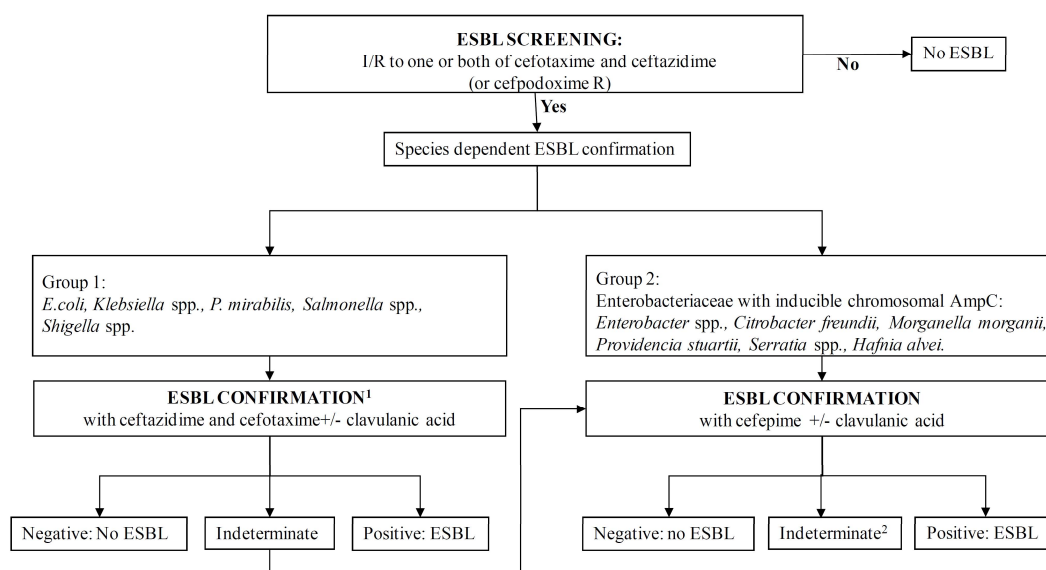


Figure 12 : Algorithme pour la détection phénotypique des EBLSE (EUCAST, 2017).

Un test de screening, qui consiste à identifier une résistance (R ou I) par rapport aux antibiotiques céfotaxime et ceftazidime, est d'abord réalisé. Ensuite, un test de confirmation est réalisé en fonction du groupe auquel appartient l'espèce bactérienne étudiée (*E. coli* appartient au groupe 1 des *Enterobacteriaceae*).

Il existe plusieurs tests de confirmation (EUCAST, 2017) :

##### I. Test de la combinaison de disques

Pour chaque test, on applique des disques contenant la céphalosporine seule (céfotaxime, ceftazidime, céfépime) à côté d'un disque combiné avec l'acide clavulanique. La zone d'inhibition autour du disque de céphalosporine associée à l'acide clavulanique est comparée à la zone autour du disque avec la céphalosporine seule. Le test est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est 5 mm plus grand avec l'acide clavulanique que sans.

## **II. Test de synergie à double disque**

Des disques contenant des céphalosporines (céfotaxime, ceftazidime, céfépime) sont appliqués sur des plaques à côté d'un disque avec de l'acide clavulanique (amoxicilline-acide clavulanique). Un résultat positif est indiqué lorsque les zones d'inhibition autour de l'un des disques de céphalosporine augmentent en direction du disque contenant l'acide clavulanique. La forme que prend la synergie entre l'acide clavulanique et les céphalosporines est en « bouchon de champagne ».

## **III. Méthode de test par gradient**

Les tests de gradient sont mis en place, lus et interprétés selon les instructions du fabricant. Le test est positif si l'on observe une réduction d'un facteur 8 de la CMI de la céphalosporine associée à l'acide clavulanique par rapport à la CMI de la céphalosporine.

## **IV. Microdilution en bouillon**

La microdilution en bouillon est réalisée avec un bouillon Mueller-Hinton contenant des dilutions de céfotaxime, de ceftazidime et de céfépime à des concentrations allant de 0,25 à 512 mg/L, avec et sans acide clavulanique à une concentration fixe de 4 mg/L. Le test est positif si l'on observe une réduction d'un facteur 8 de la CMI de la céphalosporine combinée à l'acide clavulanique comparée à la CMI de la céphalosporine seule.

### **6.4.2 Détection des carbapénémases**

L'EUCAST définit la méthodologie à appliquer pour détecter les carbapénémases (EUCAST, 2017). Un screening est proposé ainsi que différentes méthodologies permettant de déduire à quelle classe de la classification d'Ambler la CP appartient.



Le screening est réalisé avec des disques de méropénème et d'ertapénème (tableau 6).

Tableau 6 : Screening pour la production de carbapénémase (EUCAST, 2017).

Carbapenem	MIC (mg/L)		Disk diffusion zone diameter (mm) with 10 µg disks	
	S/I breakpoint	Screening cut-off	S/I breakpoint	Screening cut-off
Meropenem <sup>1</sup>	≤2	>0.125	≥22	<28 <sup>2</sup>
Ertapenem <sup>3</sup>	≤0.5	>0.125	≥25	<25

<sup>1</sup>meilleur équilibre entre sensibilité et spécificité

<sup>2</sup>les isolats de 25-27 mm de diamètre ne doivent être examinés pour la production de carbapénémase que s'ils sont résistants à la pipéracilline-tazobactam et/ou témocilline. La recherche de carbapénémases est toujours justifiée si le diamètre de la zone du méropénème est < 25 mm

<sup>3</sup>Haute sensibilité mais faible spécificité. Peut être utilisé comme agent de sélection alternatif, mais les isolats avec BLSE et AmpC peuvent être résistants sans produire de carbapénémases

Il existe plusieurs tests de confirmation (EUCAST, 2017) :

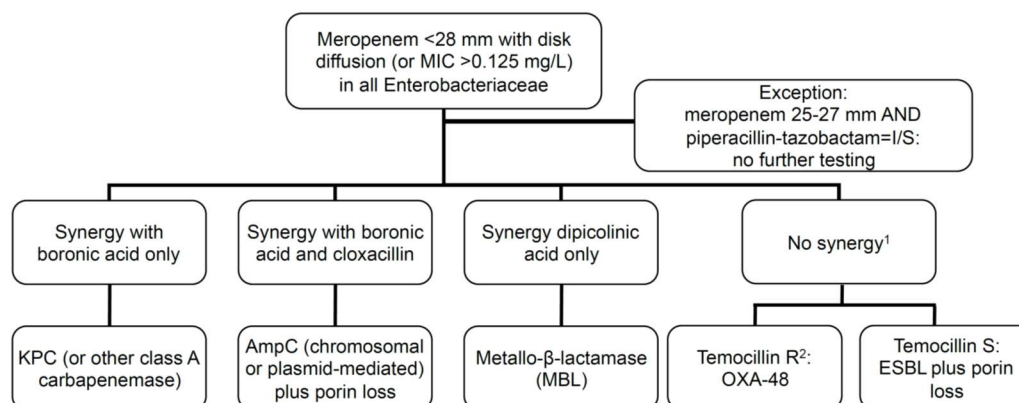
### I. Test de la combinaison de disque

Les diamètres d'inhibition du méropénème seul par rapport au méropénème combiné avec une substance inhibitrice sont comparés afin de mettre en évidence la présence d'une synergie (Figure 13).

Les substances inhibitrices peuvent être :

- L'acide boronique qui inhibe les carbapénémases de la classe A (KPC),
- L'acide dipicolinique ainsi que l'EDTA qui inhibe les métallob-β-lactamases de la classe B,
- La cloxacilline qui inhibe les céphalosporinases AmpC de la classe C.

Puisqu'il n'y a pas de substances inhibitrices de la classe D (OXA-48), la témocilline est utilisée comme marqueur car la majorité des OXA-48-type y sont résistantes. Des kits commerciaux (par ex. KPC&MBL&OXA-48 disk kit) fournissent les disques et la grille d'interprétation des lectures.



<sup>1</sup>La combinaison de plusieurs carbapénémases peut également contribuer à l'absence de synergie, par ex. l'association de métallob-lactamase et de KPC. Des tests moléculaires sont souvent nécessaires dans de tels cas

<sup>2</sup>La résistance élevée à la témocilline (>128 mg/L, diamètre <11 mm) est un marqueur phénotypique d'OXA-48

Figure 13 : test de combinaison de disque pour la détection des carbapénémases (EUCAST, 2017).

Le désavantage de cette méthode est qu'elle nécessite un délai de 18 heures (incubation).

## II. Test colorimétrique

Le test CarbaNP est un test rapide (<2 h) de détection de l'hydrolyse des carbapénèmes, qui donne lieu à un changement de pH entraînant un changement de couleur du rouge au jaune avec une solution de rouge de phénol.

## III. Méthode d'inactivation des carbapénèmes

Le principe de cette méthode est de détecter l'hydrolyse enzymatique en incubant un carbapénème avec une suspension bactérienne.

## IV. Détection de l'hydrolyse des carbapénèmes par MALDI-TOF

Le principe est de détecter dans un spectromètre de masse (MALDI-TOF) la diminution ou la disparition de certains pics spécifiques de carbapénèmes dans un spectre de masse lorsqu'une suspension bactérienne est préalablement incubée avec le carbapénème.

## V. Test immunochromatographique

Ce test est basé sur la capture immunologique d'épitopes d'OXA-48, en utilisant des nanoparticules d'or colloïdal liées à une membrane de nitrocellulose dans un dispositif à flux latéral. Le principe du test est que les anticorps monoclonaux anti-OXA-48 sont sélectionnés comme réactifs de capture spécifiques,

pour une identification directe des enzymes. Le test prend environ quatre minutes et a été évalué à la fois à partir de colonies et de cultures sanguines dopées. Il existe également un test rapide *in vitro* (O. K. N. V. I. RESIST-5, Coris Bioconcept) pour la détection des carbapénémases OXA-48, KPC, NDM, VIM et IMP à partir de cultures bactériennes.

## 7. L'évaluation quantitative du risque microbien ou *Quantitative Microbial Risk Assessment* (QMRA)

Au début des années 1990, l'évaluation quantitative du risque microbien (QMRA) a été développée comme outil pour comprendre les résultats probables des expositions microbiennes dans les aliments. Cette approche innovante a été largement acceptée comme une avancée majeure dans la protection de la santé publique (Bentham and Whiley, 2018).

L'approche QMRA comprend l'identification du danger, sa caractérisation (relation dose-réponse), l'évaluation de l'exposition et la caractérisation et gestion des risques (Haas et al., 2014). La figure 14 reprend les étapes du QMRA et les évaluations de risque humain d'exposition aux bactéries antibiorésistantes et aux gènes de résistance dans l'environnement aquatique déjà publiées.

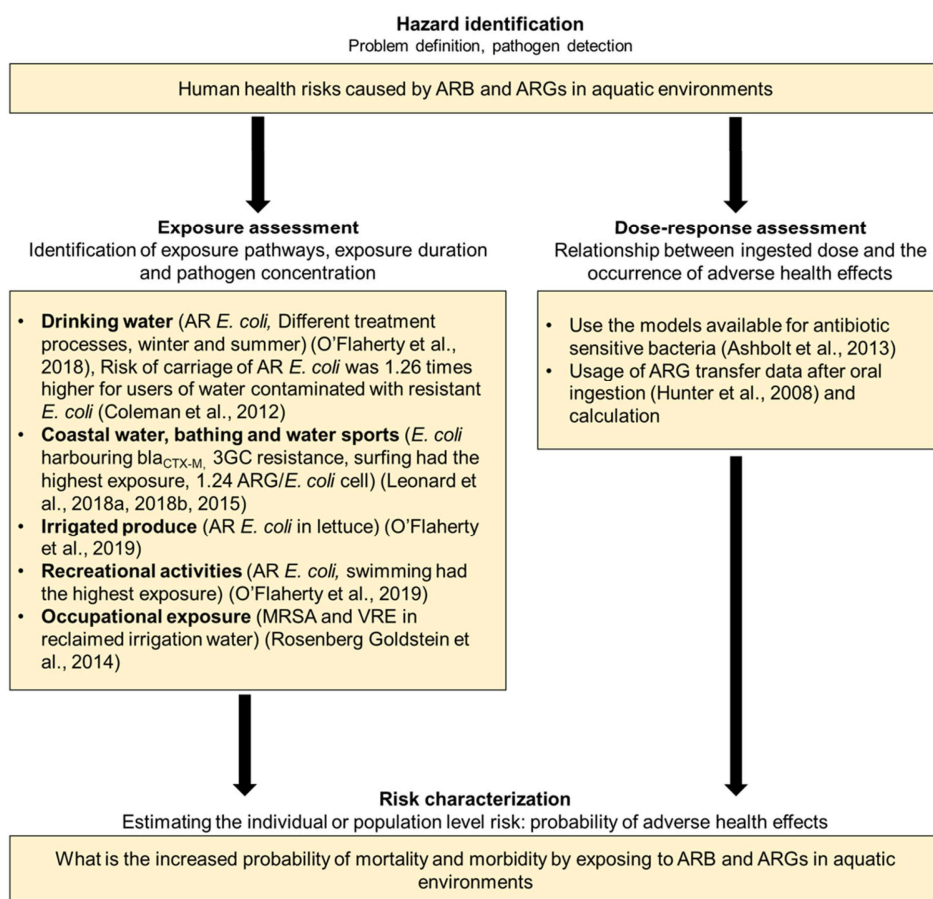


Figure 14 : l'évaluation quantitative du risque microbien (QMRA) combine les informations sur l'occurrence, l'exposition et la relation dose-réponse pour évaluer les risques potentiels pour la santé humaine causée par une bactérie antibiorésistante (BRA) ou des gènes de résistance (GRAs) dans l'environnement aquatique (adaptée de Amarasiri et al., 2020).

Plus récemment, les principes du QMRA ont été appliqués à l'approvisionnement en eau potable pour une série de bactéries entériques et protozoaires dans les réseaux de distribution d'eau. Ces évaluations étaient axées sur l'ingestion et la voie orale/fécale comme principal mode de transmission (Westrell et al., 2004; World Health Organization, 2016).

Les eaux de loisirs présentent également un risque d'exposition humaine lié à la présence de bactéries antibiorésistantes. Plusieurs études ont estimé la probabilité d'une exposition humaine aux bactéries antibiorésistantes en utilisant leur prévalence mesurée dans ces eaux et en prenant en compte des estimations de volume d'eau ingéré sur base d'expérimentation en piscine ce qui constituait une première étape importante du QMRA (Leonard et al., 2015; O'Flaherty et al., 2019; Schijven et al., 2015).

Il subsiste cependant des limitations pour pouvoir appliquer le principe du QMRA à l'estimation du risque d'exposition humain aux bactéries antibiorésistantes dans les milieux aquatiques, à savoir le manque de données sur les voies d'exposition - d'autres voies que l'ingestion doivent être envisagées telles que les voies cutanée et l'inhalation - et l'absence de modèles dose-réponse formels concernant des bactéries antibiorésistantes pathogènes spécifiques (Amarasiri et al., 2020; Ben et al., 2019; Nappier et al., 2020; Pepper et al., 2018; Schijven et al., 2015).

## 8. Test de pathogénicité dans le modèle *Galleria mellonella*

L'utilisation de modèles animaux invertébrés pour les études *in vivo* de la pathogénicité microbienne est aujourd'hui bien établie dans la communauté scientifique. L'utilisation de la larve de *Galleria mellonella*, également appelée fausse teigne de la cire (papillon de la famille des Pyralidae) comme hôte modèle, s'est considérablement accrue ces dernières années. Ce modèle invertébré permet d'effectuer des études à grande échelle car son cycle de vie est court, constituant une alternative à l'utilisation d'animaux vertébrés tels que les souris et les rats pour lesquels se heurtent des obstacles éthiques, budgétaires et logistiques (Rossoni et al., 2019). Ces larves sont utilisées comme organisme modèle pour étudier de nombreux pathogènes humains, notamment des bactéries, des champignons et des protozoaires (Chen et al., 2016). La pathogénicité d'*E. coli* productrices de BLSE d'origine ovine a d'ailleurs été testée dans ce modèle et le taux de mortalité des larves était très proche du modèle d'infection de la souris lorsque le taux d'infection augmentait ( $1 \times 10^5$  UFC par larve) (Zhao et al., 2022).

Le principe de la manipulation est d'injecter des inoculum bactériens préalablement lavés dans l'hémocœle (cavité corporelle contenant l'hémolymphe) par inoculation dans la dernière « proleg » gauche de la région abdominale de la larve (Figure 15). Après injection, les larves sont mises à incuber ( $37^\circ\text{C}$  pour *E. coli*) et leur mortalité suivie toutes les 24h durant 4 jours (Serrano et al., 2023).

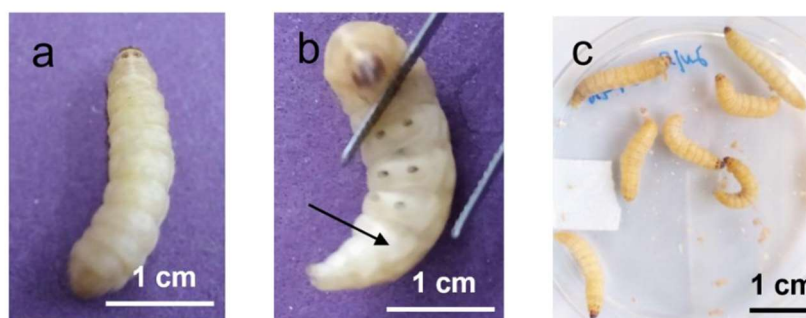


Figure 15 : Vue dorsale (A) et ventrale (B) d'une larve de *Galleria mellonella* au dernier stade larvaire. La larve est divisée en tête, en thorax avec 3 segments et en abdomen avec 10 segments. Le segment avec la dernière « proleg » (voir flèche) est le 4<sup>ème</sup> à partir du segment anal. (C) : larves dans une boîte de pétri (adaptée de Serrano et al., 2023).

Le système immunitaire du modèle *G. mellonella* présente des similitudes avec l'immunité innée des mammifères. La mélanisation, qui comprend la synthèse et le dépôt de mélanine pour encapsuler les agents pathogènes au niveau de la plaie, suivie de la coagulation de l'hémolymphe et de l'opsonisation, commence généralement par des taches noires distinctes sur les larves de couleur crème. La mélanisation complète (larves noires) correspond à la mort des larves (Tsai et al., 2016)

## 9. L'antibiorésistance dans l'environnement aquatique

### 9.1 L'environnement aquatique, partie prenante du « One health »

Le concept « Une seule santé, *One health* » est utilisé pour décrire le principe selon lequel la santé humaine, la santé animale et l'environnement sont liés entre eux (Figure 16). En effet, l'homme peut transmettre des maladies aux animaux et inversement, et l'environnement est un milieu récepteur qui peut aussi être une source de nouveaux micro-organismes pathogènes et/ou résistants aux antimicrobiens.

Une approche multisectorielle intégrée et holistique est donc nécessaire pour lutter contre l'AMR intégrant des questions environnementales, aquatiques et faunistiques (White and Hughes, 2019).

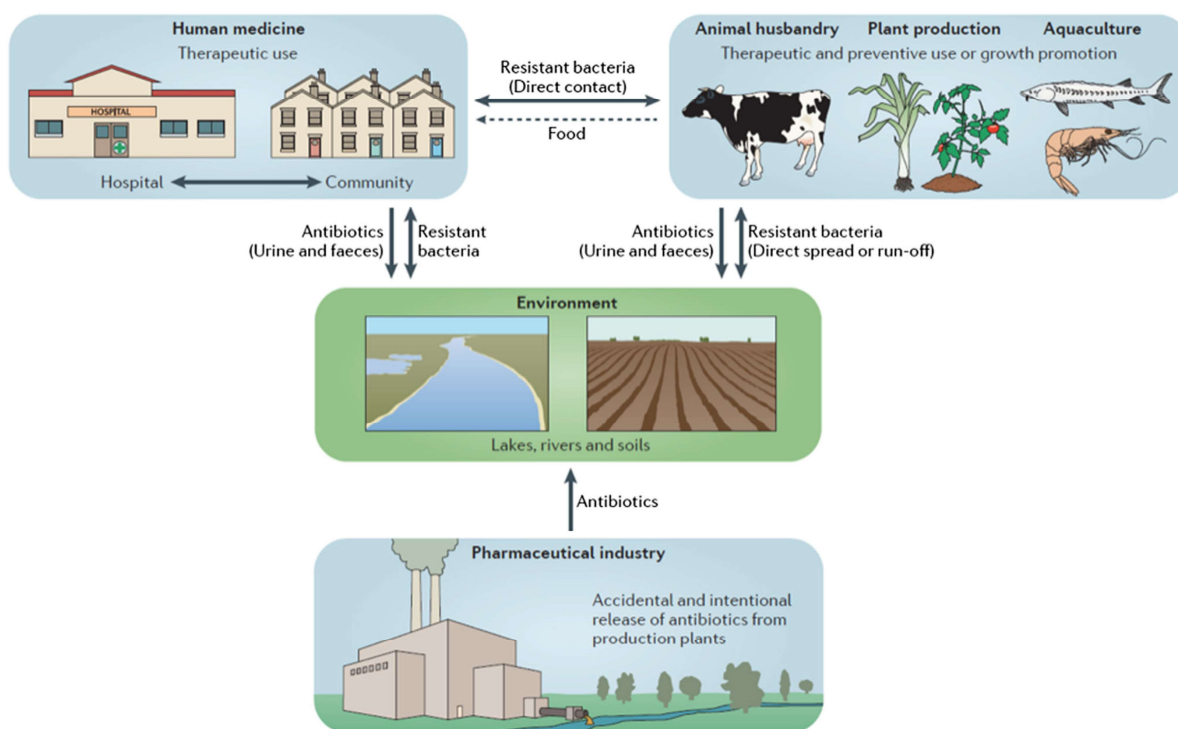


Figure 16 : L'écosystème intégré du transfert et de la propagation de l'antibiorésistance illustre l'importance cruciale de l'approche « One Health » (adaptée de White and Hughes, 2019). A noter que l'usage d'antibiotiques comme promoteur de croissance est interdit en Europe depuis 2006.

L'environnement aquatique est central à cette approche « One Health » car l'eau est utilisée comme boisson, ainsi que pour l'alimentation, l'irrigation des sols, l'entretien du bétail, le transport maritime et les loisirs. L'infection par des bactéries antibiorésistantes peut se produire soit par contact direct avec des bactéries pathogènes des systèmes aquatiques soit par contact avec des bactéries pathogènes humaines ou animales qui ont acquis des gènes de résistance provenant de bactéries environnementales

(Taylor et al., 2011). Dans les pays où le traitement des eaux usées laisse à désirer, l'eau potable est susceptible de jouer un rôle très important dans la transmission de bactéries et/ou de gènes de résistance à partir des animaux (Aubertheau et al., 2017; Finley et al., 2013; Kennedy and Collignon, 2010). Les mauvaises conditions sanitaires facilitent également la transmission indirecte de bactéries entériques par l'eau entre autochtones et voyageurs qui rentrent chez eux colonisés (entre autres dans le tractus gastro-intestinal) par des bactéries résistantes acquises localement (Collignon and Kennedy, 2015; Walsh et al., 2011).

## **9.2 L'eau, milieu et réservoir favorable à la propagation des bactéries antibiorésistantes et des gènes de résistance**

Une grande partie des bactéries de la biomasse mondiale se trouvent dans les mers, les lacs et les rivières (Whitman et al., 1998). Leur diversité génétique et leur potentiel métabolique sont immenses. L'eau est un milieu idéal pour la vie bactérienne, car elle offre un accès à des nutriments dissous facilement accessibles, ainsi qu'une protection contre la dessiccation et les rayons UV (Taylor et al., 2011). Les souches d'*E. coli* peuvent persister de quelques jours à plusieurs mois dans l'eau du fait de leur grande flexibilité catabolique et de la possibilité d'entrer dans un état « dormant ». Dans cet état, les cellules sont « viables mais non cultivables » c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas être facilement récupérées sur des milieux de laboratoire standard, mais sont toujours présentes en tant que cellules viables (Van Elsas et al., 2011).

Les gènes de résistance peuvent persister plus longtemps dans l'environnement que les bactéries antibiorésistantes. En effet, ils peuvent d'une part persister hors des cellules bactériennes et d'autre part être hébergés par un panel d'espèces bactériennes plus large que celles ciblées dans les études (majoritairement *E. coli* productrice de BLSE) (Anses, 2020).

Les biofilms sont des structures hétérogènes constituées par des populations bactériennes englobées dans une matrice extracellulaire, fixées sur des surfaces naturelles ou artificielles (Roux and Ghigo, 2006). Les biofilms qui se forment couramment sur les substrats et les roches dans de nombreux environnements aquatiques, appelés périphytons, forment une matrice protectrice à partir de laquelle les communautés bactériennes sessiles peuvent se répliquer dans une proximité spatiale étroite et, par la suite, échanger des gènes et ainsi devenir des réservoirs à long terme de gènes de résistance (Taylor et al., 2011). Le plus souvent inoffensifs, les biofilms jouent un rôle écologique capital et contribuent très largement au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes. Ils représentent également une importante source de nuisance en médecine humaine ou vétérinaire, ainsi que dans l'industrie et les environnements humains industriels, où, particulièrement tolérants à toutes sortes de stress (dessiccation, carence en nutriments, exposition aux acides, agents antibactériens, etc.), ils sont très difficiles à éliminer (Roux and Ghigo, 2006).



Lorsque des bactéries antibiorésistantes d'origine fécale sont rejetées dans les milieux aquatiques, leur devenir dépend non seulement de leur capacité à surmonter les stress, la prédation et la lyse virale, mais aussi de la dynamique particulière c'est-à-dire la capacité à s'associer aux particules de tailles supérieures à 5 µm (sédiment) (Anses, 2020). La distribution spatiale des bactéries antibiorésistantes dans les cours d'eaux ou lacs montre qu'elles sont retrouvées dans les sédiments proches de leur lieu d'émission (STEP,...) et que leur quantité décroît avec la distance par rapport au rejet (Chu et al., 2018). Les sédiments aquatiques, en raison de la densité et de la diversité des bactéries qu'ils hébergent et leur capacité à les retenir représentent une matrice au sein de laquelle le transfert horizontal de gènes peut se produire (Taylor et al., 2011). L'abondance des bactéries antibiorésistantes dans l'environnement aquatique est également fonction du niveau d'anthropisation du milieu (Servais and Passerat, 2009).

### 9.3 Etudes réalisées dans l'environnement aquatique

En Belgique, la seule étude réalisée dans l'environnement aquatique qui a été publiée a concerné le dosage de gènes de carbapénémases (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* et *bla<sub>OXA-48</sub>*) dans des échantillons d'eau de surface prélevés sur une période d'un an dans un continuum hôpital – STEP – rivière Zenne (Bruxelles), montrant que ces gènes sont largement répandus dans la Zenne en raison des rejets chroniques de STEP, recevant des effluents hospitaliers (Proia et al., 2018).

Dans les pays limitrophes à la Belgique, plusieurs études ont été réalisées concernant les BRA et GRA en eaux de surface, de baignade et souterraines.

L'étude de Servais and Passerat (2009) a été réalisée dans le bassin hydrographique de la Seine (Paris) de 2005 à 2007. Ils ont trouvé, à l'aide de la technique de l'antibiogramme, que 42% des 214 *E. coli* isolées étaient résistantes à un antibiotique et que 35% l'étaient à 2 antibiotiques. Ils ont démontré que l'abondance des BRA et des GRA est fonction du niveau d'anthropisation du milieu. Dans ce même bassin, les gènes codant pour les intégrons de classe 1 et 2 (*IntI1* et *intI2*) ont été identifiés dans 11% des isolats (Laroche et al., 2009).

Les études de Stalder et collaborateurs (2014) dans la Vienne ou de Buelow et collaborateurs (2020) dans l'Arve, rivière torrentielle, ont montré l'impact de l'effet de dilution des rejets de STEP sur les concentrations et l'occurrence d'intégrons et de GRA, l'effet amont et aval d'un point de rejet étant qualitativement marqué. Ces résultats ont montré que les rejets urbains sont une source majeure d'apport en BRA et GRA dans les eaux, y compris en milieu rural sans exploitation animale intensive.

Toujours en France, Bollache et collaborateurs (2018) ont étudié l'occurrence des EcBLSE dans un petit bassin versant (rivière Ouche, Bourgogne, France), en ciblant les matrices environnementales et les poissons. Au total, 36 EcBLSE ont été isolées de l'eau (n=14), de biofilm (n=10) et de viscères de

poissons (n=12). Les BLSE produites par les isolats de cette étude appartenait à la famille CTX-M (CTX-M groupe 1 et 9). Dans ce bassin hydrographique de l'Ouche également, des *E. coli* productrices de CTX-M ont été retrouvées dans les eaux souterraines en secteur karstique mais pas dans les eaux de la nappe alluviale (Lions et al., 2018).

Dans les zones humides jurassiennes mesurées mensuellement sur un an, les EcBLSE ont moins bien survécu que les *E. coli* et *K. pneumoniae* totaux (Henriot et al., 2019). Ces zones peu anthropisées et distantes des sources de contamination peuvent toutefois contenir des EcBLSE, suggérant que ces isolats sont capables de survivre dans ces environnements très différents des intestins des mammifères (Martak et al., 2020). Sur les 179 *E. coli* isolées, les phylogroupes B1 et B2 étaient dominants dans la population d'*E. coli*, tandis que le phylogroupe A était dominant dans les isolats résistants aux C3G, qui hébergeaient les gènes codant pour la BLSE *bla<sub>CTX-M-15</sub>* et *bla<sub>CTX-M-27</sub>* dans la moitié des cas (Martak et al., 2020).

Au Pays-bas, Blaak et collaborateurs (2011) ont étudié la prévalence de plusieurs BRA dont *E. coli* dans la Meuse (à Eijsden, à la frontière avec la Belgique), la nouvelle Meuse et le Rhin en 2008-2009 en utilisant les techniques de microdilution en bouillon et l'Etest. Pour chaque rivière, les résistances les plus fréquemment détectées parmi les *E. coli* étaient la résistance à l'ampicilline, à la streptomycine, à la tétracycline, au triméthoprim ou au sulfaméthoxazole, tandis que la résistance au chloramphénicol, à la ciprofloxacine et au céfotaxime était moins fréquente. Les *E. coli* résistantes à la céfotaxime - et donc suspectées d'être des souches productrices de BLSE - n'ont été détectées que dans la Meuse. Près de la moitié (48%) de toutes les souches d'*E. coli* isolées de la Meuse étaient résistantes à au moins un antibiotique. Dans le Rhin et la Nouvelle Meuse, environ un tiers de toutes les *E. coli* étaient résistantes à au moins un antibiotique (32% et 34% respectivement). Dans une autre étude concernant 113 échantillons d'eau de surface prélevées entre 2006 et 2013 dans 30 bassins hydrographiques néerlandais, Blaak et collaborateurs (2015) ont trouvé que 26% des *E. coli* étaient résistantes à au moins un antibiotique et 11% étaient multirésistantes (MDR).

Blaak et collaborateurs (2014) ont également réalisé une étude sur les eaux de baignade néerlandaises, montrant que des EcBLSE étaient détectées dans 62 % des échantillons prélevés dans 4 zones récréatives (une rivière/2 lacs/la mer du nord), avec une concentration moyenne en EcBLSE de 1,3 UFC/100 ml.

En Allemagne, Herrig et collaborateurs (2020) ont quantifié les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* de manière hebdomadaire sur une période de 12 mois dans les eaux de surface de la rivière Lahn. Ils ont démontré que les concentrations en gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* pouvaient être largement expliquées par la pollution fécale. Ces gènes sont omniprésents dans cette rivière, les participants à des sports nautiques avec ou sans baignade risquent d'y être exposés. Döhla et collaborateurs (2020) ont suivi, au cours de la saison balnéaire de 2018, 16 eaux de baignade en Rhénanie-du-Nord-Westphalie. Toutes les eaux de baignade étaient

conformes à la directive européenne sur les eaux de baignade. Trois échantillons contenaient de très faibles quantités de BRA. De faibles quantités de résidus d'antibiotiques ont été détectées dans trois eaux de baignade. Un seul échantillon contenait un gène de résistance. Au total, deux eaux de baignade ont été considérées comme systématiquement contaminées par des résidus de BRA, d'antibiotiques ou de gènes de résistance. Quatre eaux de baignade ont indiqué des événements de contamination ponctuelle et les 10 autres n'étaient pas contaminées.

Au niveau européen, plusieurs études ont été également réalisées, notamment au Portugal (Bessa et al., 2014; Teixeira et al., 2020), en Suède (Khan et al., 2018), en Norvège (Jørgensen et al., 2017), en Pologne (Lenart-Boroń, 2017), en Irlande (Hooban et al., 2021, 2020), en Suisse, etc...

Une étude européenne a suivi neuf GRA et le gène *intI1* dans 16 effluents de STEP provenant de dix pays européens différents. Six des neuf GRA analysés ont été détectés dans tous les échantillons d'effluents et d'eau de rivière. Parmi les gènes quantifiés, *intI1* et *sulI* étaient les plus abondants. Les résultats démontrent que les STEP européennes contribuent à l'enrichissement du résistome dans les masses d'eau réceptrices, l'impact particulier dépendant de la charge d'effluents et des conditions hydrologiques locales (Cacace et al., 2019).

Au niveau mondial, il existe de nombreuses études concernant les *E. coli* antibiorésistantes, les EcBLSE et les CPE, tant en eau de surface (Chen et al., 2016; Cherak et al., 2021; Ghaderpour et al., 2015; Guo et al., 2023; Guyomard-Rabenirina et al., 2017; Haberecht et al., 2019; Hassen et al., 2020; Hu et al., 2008; Liu et al., 2018; Montero et al., 2021; Ramírez Castillo et al., 2013) qu'en eau de baignade (Hooban et al., 2021; Kadykalo et al., 2020; Nascimento et al., 2017) sur les quatre continents.

#### **9.4 Principales sources de contamination de l'environnement aquatique**

Les principales sources de contamination de l'environnement aquatique sont les déjections humaines et animales, en particulier des individus ayant été traités aux antibiotiques (urines et fèces pour les antibiotiques et fèces pour les bactéries et gènes de résistance).

Ces déjections peuvent contaminer l'environnement aquatique par diverses voies, présentées ci-dessous.

##### **9.4.1 Eaux usées traitées issues des stations d'épuration des eaux usées (STEP)**

Les réseaux d'assainissement collectent les eaux usées issues des activités humaines (domestiques, industrielles et hospitalières) et une partie des eaux pluviales pour les diriger vers des STEP dont le principal objectif est de limiter la contamination organique et particulaire. Les STEP réduisent les concentrations de bactéries résistantes ou sensibles aux antibiotiques, mais souvent sans les supprimer totalement. Sans traitements spécifiques, les STEP permettent d'atteindre des taux d'abattelements sur les

concentrations en *E. coli* BLSE de l'ordre de 1,5 log (Anses, 2020). Au Pays-Bas, l'analyse des taux d'abattement en GRA dans un grand nombre de STEP a montré que les traitements conventionnels ont réduit de manière significative le nombre absolu de bactéries totales et les GRA étudiés (*ermB*, *sul1*, *sul2*, *tetM*, *qnrS*, *bla<sub>CTX-M</sub>*) de 1,76 à 2,65 log. Malgré tout, ces STEP rejettent encore en moyenne 10<sup>6</sup> copies de GRA/litre d'effluent dans les masses d'eau réceptrices. Les paramètres de conception de la STEP tels que la taille, la présence d'une clarification primaire, le type d'élimination du phosphore et les paramètres opérationnels tels que les temps de rétention des boues et hydrauliques, le temps de contact anaérobie et les matières en suspension de l'effluent n'ont pas eu d'incidence sur la qualité de l'eau de la STEP (Pallares-Vega et al., 2019). Les eaux usées traitées sont majoritairement rejetées dans les eaux de surface, entraînant une contamination localisée et continue.

#### 9.4.2. Produits résiduaires organiques

Ils regroupent notamment les effluents d'élevage (fumiers, lisiers) et les boues issues du traitement des eaux usées urbaines. Après stockage et/ou traitement, ils sont généralement épandus sur les sols agricoles dans un contexte de valorisation des déchets pour fertiliser les sols. Le ruissellement, consécutif à des événements pluvieux intenses, contribue à la contamination des milieux à partir de ces zones agricoles amendées entraînant une contamination intermittente et diffuse de l'environnement aquatique (Oberlé, 2012; Taylor et al., 2011).

#### 9.4.3 Eaux de pisciculture

L'aquaculture est une filière d'élevage qui présente la particularité d'être directement connectée à l'environnement aquatique (rivières, étangs ou eaux littorales), avec un temps de résidence des eaux dans les bassins d'environ deux heures. Dès lors, les traitements antibiotiques appliqués ainsi que les bactéries et gènes de résistance présents dans les bassins peuvent être disséminés rapidement vers le milieu aquatique adjacent (Anses, 2020).

### 9.5 Les antibiotiques, contaminants du milieu aquatique

Les antibiotiques utilisés en médecine humaine ou animale atteignent l'environnement par le biais de l'urine et des excréments. Entre 40 et 90 % de la dose d'antibiotique administrée est excrétée sous forme de composé parent (forme active), contaminant l'environnement aquatique, les sols, les plantes, etc (Polianciuc et al., 2020).

Outre le risque de favoriser la résistance microbienne aux antibiotiques, les résidus d'antibiotiques peuvent être absorbés par les plantes, interférer avec les processus physiologiques et provoquer des effets écotoxicologiques potentiels. Des tests de toxicité chronique et aiguë ont révélé leur impact négatif

sur la photosynthèse et les mitochondries (plantes), sur le retard de la germination ou la réduction de la biomasse (sols), sur l'altération du microbiome humain et la perturbation des fonctions du système digestif (Polianciuc et al., 2020).

Les eaux usées contaminées par des antibiotiques sont traitées dans des STEP, mais il est impossible d'éliminer 100 % des antibiotiques dans les STEP conventionnelles. Leur persistance dans l'environnement joue donc un rôle majeur : les plus persistants tels que les quinolones, les fluoroquinolones, les macrolides et les sulfamidés sont les plus fréquemment détectés/quantifiés tandis que les  $\beta$ -lactamines le sont rarement en raison de leur forte dégradabilité par hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactame (Anses, 2020).

La pollution des eaux de surface par les antibiotiques est ubiquiste et les concentrations mesurées sont importantes (Danner et al., 2019). En Wallonie, des résidus de médicament dont sept antibiotiques (clarithromycine, sulfaméthoxazole, triméthoprim, sulfadiazine, lincomycine, sulfaméthazine, florfenicol) ont été analysés dans des rejets de STEP, en eaux de surface et souterraines (projet IMHOTEP). La clarithromycine (médiane de 469 ng/l), le sulfaméthoxazole (médiane de 109 ng/l) et le triméthoprim (médiane de 65 ng/l) ont été détectés dans tous les effluents sortants des 73 STEP  $\geq$  10000 E. H. La sulfadiazine qui est majoritairement à usage vétérinaire a été détectée/quantifiée dans 44% des effluents étudiés (Nott et al., 2018).

Pour les eaux de surface, cinq des sept antibiotiques recherchés ont été retrouvés au niveau de la quasi-totalité des 55 sites d'eau de surface analysés à des concentrations très faibles, à l'exception du florfenicol et de la sulfaméthazine qui ont été moins détectés. Seule la clarithromycine présentait, pour l'ensemble des 55 sites, une médiane des concentrations moyennes supérieure à 10 ng/l (11 ng/l) (Nott et al., 2018).

Pour les eaux souterraines, le sulfaméthoxazole a été détecté dans 35% des 195 sites d'eaux souterraines analysés (Nott et al., 2018).

Dans une autre étude en Wallonie (projet ISEMA), le triméthoprim, le sulfaméthoxazole et la clarithromycine ont été quantifiés dans  $\pm$  90 % des échantillons prélevés en aval des différents types de rejets étudiés (hôpitaux et STEP publiques traitant leurs rejets ; entreprises pharmaceutiques et STEP publiques traitant leurs rejets ; maisons de repos ; déversoirs d'orage). L'azithromycine a été quantifiée dans environ 80 % des échantillons en aval des rejets. Les concentrations moyennes sont inférieures à 100 ng/l, mais ponctuellement, les concentrations maximales peuvent dépasser les 100 ng/l, en particulier pour le sulfaméthoxazole, la clarithromycine et l'azithromycine. Les tendances à l'augmentation des concentrations en aval des rejets sont variables d'un rejet à l'autre et principalement observées en aval des STEP qui traitent notamment les rejets des entreprises pharmaceutiques, en aval

de certaines STEP à l'arrêt suite aux inondations et en aval de certains déversoirs d'orage (Chalon et al., 2022).

### 9.5.1 Consommation des antibiotiques en Belgique

Cette dernière décennie (de 2012 à 2021), en Belgique, la consommation humaine communautaire a diminué de 33 % DID (DID, pour *Defined Daily Dose per 1000 inhabitants per day* ou dose journalière définie exprimée par 1000 habitants par jour) pour les antibiotiques faisant l'objet d'un remboursement. De 2021 à 2022, une hausse de la consommation humaine communautaire a été observée suite à l'assouplissement des mesures du COVID-19 et le retour à un scénario de soins de santé plus typique. En comparant les données de 2022 avec l'année de référence pré-COVID de 2019, on constate que la consommation en 2022 reste inférieure à celle de cette période (BELMAP, 2023).

Cependant, dans le domaine hospitalier, entre 2012 et 2022, l'augmentation la plus importante de la consommation a été détectée pour les classes de pénicillines résistantes aux  $\beta$ -lactamases, tandis que la plus forte diminution a été observée pour les fluoroquinolones (BELMAP, 2023).

En santé animale, les ventes totales (mg/kg de biomasse) ont diminué de manière significative, avec une réduction cumulée de 58,2 % de 2011 à 2022. Les antibiotiques d'importance critique que sont les (fluoro)quinolones et les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération ont connu une réduction cumulée de 82,7 % en 2022 par rapport à 2011. Les prémélanges antibactériens ont connu une réduction cumulative significative de 83,5 % en 2022 par rapport à 2011 (BELMAP, 2023).

### 9.5.2 Pression de sélection exercée par les antibiotiques sur les bactéries antibiorésistantes

Par leurs actions bactéricide ou bactériostatique, la contamination des eaux et des sédiments par les antibiotiques peut inhiber l'activité des communautés bactériennes fonctionnelles et/ou sélectionner des souches antibiorésistantes (Costanzo et al., 2005; Goh et al., 2002). Il a été démontré que tous les antibiotiques, quels que soient leur récepteur et leur mode d'action, provoquent une activation considérable de la transcription d'une variété de gènes dépendant de l'antibiotique et de l'espèce bactérienne étudiée (Davies et al., 2006). Gullberg et collaborateurs (2011) ont montré que des concentrations en antibiotique 100 fois inférieures à leur CMI favorisent le maintien et l'émergence de souches d'*E. coli* et de *Salmonella* antibiorésistantes à bas niveau. Ces concentrations en antibiotiques favorisent en effet la sélection des mutations permettant à la bactérie de présenter des résistances de bas niveau à différentes classes d'antibiotiques et peuvent favoriser le transfert horizontal des gènes de résistance au sein de microbiotes environnementaux par des mécanismes de transduction ou de conjugaison. Elles peuvent également modifier la physiologie des espèces bactériennes (par exemple la

formation de biofilms et l'expression du *quorum sensing*) et indirectement leur résistance aux antibiotiques (Anses, 2020).

---

# Objectifs

---



La résistance aux antimicrobiens constitue une menace pour la santé mondiale selon l'OMS et l'environnement aquatique est central à l'approche « One health ».

L'hypothèse que des *E. coli* et *K. pneumoniae* antibiorésistantes sont présentes dans l'environnement aquatique en Belgique a été émise, c'est pourquoi l'objectif général de ce travail a été d'analyser, pour la première fois en Belgique, les résistances aux antibiotiques présentes chez ces bactéries.

L'hypothèse que les STEP et les effluents hospitaliers contribuent à la contamination de l'environnement aquatique par des bactéries antibiorésistantes a également été étudiée via l'analyse d'effluents hospitaliers, d'entrée/sortie de STEP et de continuums hospitaliers (effluent hospitalier – STEP qui reçoit ces effluents – eau de surface réceptrice).

Les objectifs spécifiques consistent en : (i) l'étude des phénotypes de résistance, notamment aux  $\beta$ -lactamines, d'*E. coli* et *K. pneumoniae* et l'identification des gènes *bla* associés à ces résistances en ciblant particulièrement les gènes producteurs de BLSE et de CP ; (ii) l'établissement de relations phylogénétiques entre *E. coli* isolées de l'environnement aquatique permettant de réaliser des hypothèses sur leurs origines et voies de dissémination ; (iii) l'évaluation de la pathogénicité d'*E. coli* isolées de l'environnement aquatique dans le modèle *Galleria mellonella*.

Afin de répondre à ces objectifs, quatre études ont été réalisées.

La première étude consiste en la caractérisation phénotypique d'*E. coli* isolées d'eaux de surface et d'effluents hospitaliers.

Une deuxième étude porte sur la caractérisation phénotypique d'*E. coli* isolées d'eaux de baignade où le risque d'exposition pour l'homme est potentiellement plus élevé. Une analyse de risque pour la santé humaine a été réalisée pour évaluer le risque d'exposition sur base de la prévalence mesurée et en prenant 4 scénarios de modèle dose-réponse.

La troisième étude consiste en l'identification des mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, plus particulièrement la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu chez les *E. coli* isolées d'eaux de surface, de station d'épuration et d'effluents hospitaliers. Ce mécanisme de résistance est important car les  $\beta$ -lactamines représentent une large classe d'antibiotiques qui renferme 2/3 des antibiotiques prescrits en Belgique (Meeus et al., 2024). En plus d'une caractérisation phénotypique, une caractérisation génotypique ciblant les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* et du séquençage génomique ont été réalisés. Les relations phylogénétiques entre EcBLSE isolées de l'environnement aquatique ont été étudiées. La pathogénicité de trois souches d'EcBLSE a été testée dans le modèle *Galleria mellonella*.

Un autre mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines, celui de la production de carbapénémases (CP) par *E. coli* et *K. pneumoniae*, a ensuite été étudié. Les carbapénèmes sont des antibiotiques de derniers recours, la production de CP est inquiétante et peut mener à des impasses thérapeutiques. Un screening a été réalisé dans des eaux de surface, de baignade et dans trois continuums hospitalier (hôpital-STEP-cours d'eau) et une caractérisation phénotypique et géotypique des isolats a été réalisée.

---

# Section expérimentale

---

---

# Section expérimentale

## Etude 1 :

Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from freshwaters and hospital effluents in Belgium

---

Letters of Applied microbiology ISSN 0266-8254, Vol. 74 (3), 411-418, 2022
---

L. Crettels, N. Burlion, R. Breyer, J. Mainil, P. Servais, J. Korfer and D. Thiry

## ***Préambule***

L'objectif de cette première étude était d'évaluer la présence d'*E. coli* antibiorésistantes dans les eaux de surface et les effluents hospitaliers en Belgique.

Vingt quatre stations ont été prélevées le long de l'Ourthe, de la Vesdre, de l'Amblève et de la Meuse. Deux campagnes de prélèvement ont été réalisées à des périodes différentes (mai et octobre 2019) afin de mettre en évidence un potentiel impact de la saison. En effet, l'hypothèse que la consommation en antibiotique est plus élevée durant la saison hivernale peut être émise tout en tenant compte de l'influence des conditions climatiques. La concentration des indicateurs fécaux et l'antibiorésistance ont tendance à augmenter pendant les précipitations, les concentrations étant plus importantes lorsque l'intensité des précipitations est plus élevée (Cho et al., 2010; Kubera, 2021).

Au total, 938 souches d'*Escherichia coli* ont été isolées. Un test par diffusion en gélose (antibiogramme) a été réalisé en suivant les recommandations de l'EUCAST pour mettre en évidence les résistances aux antibiotiques. Les résistances d'*E. coli* vis-à-vis de 12 antibiotiques, sélectionnés selon des critères tels que le volume de leur vente, leur usage (vétérinaire, humain ou mixte) et la famille d'antibiotiques à laquelle ils appartiennent, ont été étudiées.


Des bactéries antibiorésistantes ont été observées à tous les points de prélèvements étudiés, ce qui montre bien l'ampleur du phénomène dans l'environnement. Cependant, un effet lié à la saison n'a pu être mis en évidence car les taux de résistance mesurés lors des deux campagnes étaient fort proches.

Sur le milieu TBX (milieu spécifique à la détection de *E. coli*), 32,7% des souches sont au moins résistantes à un antibiotique et 24,6% sont résistantes à au moins deux antibiotiques.

Les taux de résistance les plus élevés, tant pour le milieu TBX que le TBX+AMX, sont rencontrés pour l'ampicilline (AMP : 28,8% - TBX), l'amoxicilline couplée à l'acide clavulanique (AMC : 15,1% - TBX) et le sulfaméthoxazole et triméthoprim (SXT : 16,4% - TBX). Les taux de résistance les plus faibles sont mesurés pour les deux antibiotiques de la famille des carbapénèmes, le mérépénème et l'ertapénème.

Un MAR index, reflétant le degré de contamination du milieu, a été calculé pour chaque station. Le MAR index correspond, pour un échantillon d'eau, à la proportion de résistances (somme pour tous les isolats du nombre d'antibiotiques auquel chaque isolat est résistant) sur le nombre total de tests de susceptibilité réalisés (nombre d'antibiotique testé multiplié par le nombre d'isolats) (Krumperman, 1983). Le MAR index varie de 0 à 1. Malgré un MAR index élevé mesuré dans les effluents hospitaliers, leur impact n'a pas été mis en évidence dans l'Ourthe en aval de la station d'épuration (STEP).

## ORIGINAL ARTICLE

**Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from freshwaters and hospital effluents in Belgium**L. Crettels<sup>1</sup>, N. Burlion<sup>1</sup>, R. Breyer<sup>1</sup>, J. Mainil<sup>2</sup>, P. Servais<sup>3</sup>, J. Korfer<sup>1</sup> and D. Thiry<sup>2</sup> <sup>1</sup> Department of Microbiology, ISSeP, Scientific Institute of Public Service, Liège, Belgium<sup>2</sup> Bacteriology, Department of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Centre for Fundamental and Applied Research for Animals and Health (FARAH), University of Liège (ULiège), Liège, Belgium<sup>3</sup> Ecology of Aquatic Systems, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

**Significance and Impact of the Study:** This study evaluated for the first time the level of antimicrobial resistant (AR) and multiple antimicrobial resistant (MAR) *Escherichia coli* isolated from freshwaters and hospital effluents in Belgium during two sampling campaigns conducted in 2019. *E. coli* isolates resistant to amoxicillin were detected everywhere. The MAR index was calculated for each station. Despite the high MAR index in hospital effluents, their impact was not highlighted in the Ourthe river downstream from the wastewater treatment plant (WWTP) outfall. The resistance rate to antibiotics measured during both campaigns does not show any significant difference and thus no seasonal impact could be demonstrated.

**Keywords**

antimicrobial resistance, Belgium, *Escherichia coli*, freshwater, hospital wastewaters, Walloon region, water quality.

**Correspondence**

Leslie Crettels, Department of Microbiology, ISSeP, Scientific Institute of Public Service, Rue du Chéra 200, 4000 Liège, Belgium.  
E-mail: l.crettels@issep.be

2021/1206: received 5 February 2021, revised 29 November 2021 and accepted 29 November 2021

doi:10.1111/lam.13625

**Abstract**

The purpose of this work was to evaluate the level of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in freshwaters and hospital effluents in Belgium. The samples were collected from 24 locations along the Ourthe, Vesdre, Amblève and Meuse rivers and in the wastewater effluents of several hospitals. The sampling stations in rivers were classified according to the dominant land covers of the rivers (rural, urban and forest areas). Two sampling campaigns were organized in May and October 2019 to highlight a possible seasonal effect. A total of 938 *E. coli* strains were isolated on Chromogenic Selective Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) and TBX supplemented with amoxicillin (TBX+AMX) media. Disk diffusion assays were performed following the EUCAST's recommendations to assess the antimicrobial resistance against 12 antibiotics. A total of 32.7% of strains were at least resistant to one antibiotic and 24.6% were multiple antimicrobial resistant strains on TBX. The highest resistance rates were found for ampicillin (AMP), amoxicillin coupled with clavulanic acid (AMC) and sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT). The lowest resistance rates were observed for meropenem (MEM) and ertapenem (ETP), which are last resort antibiotics. No significant difference was observed between both campaigns for the resistance rate to antibiotics.

**Introduction**

*Escherichia coli*, a member of the common intestinal microbiota in humans and warm-blooded animals, is an important indicator of faecal contamination of aquatic systems and foodstuffs because of their release in the environment (Ghaderpour *et al.* 2015). Moreover, the release of pathogenic or antimicrobial resistant (AR) *E.*

*coli* in the environment is a global public health concern, especially in aquatic systems used for human activities (Koczura *et al.* 2013; Pereira *et al.* 2013). AR *E. coli* can indeed enter aquatic systems through discharge from hospital or municipal wastewaters and from intensive livestock production (Pruden *et al.* 2006; Pereira *et al.* 2013). Therefore, the river waters, that are used for recreational activities, irrigation and other purposes, can represent

efficient vehicles disseminating these AR bacteria (Pruden *et al.* 2006; Su *et al.* 2012; Pereira *et al.* 2013). Such AR bacteria can subsequently be positively selected as a consequence of the antimicrobial accumulations and the abundance of other pollutants in these aquatic systems but also horizontally transfer to other bacterial strains and species their resistance genes that can be located on mobile genetic elements (Taylor *et al.* 2011).

Several studies have already been conducted on AR bacterial release and their occurrence in sewage and natural environments in different countries but never in Belgium (Sayah *et al.* 2005; Oberlé *et al.* 2012; Ramírez Castillo *et al.* 2013; O'Dwyer *et al.* 2017).

Resistance to beta-lactams, the broadest antibiotic family, is the focus of a number of studies, particularly concerning the presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* (ESBL) in rivers and streams (Zurfluh *et al.* 2013; Küreki *et al.* 2017; Lenart-Boron 2017). The prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub> antibiotic resistance genes in the lower Lahn River in Germany has already demonstrated the importance of monitoring microbial water quality with a focus on antibiotic resistance, not only in the designated swimming waters. Moreover, *E. coli* might serve as a suitable estimate for the presence of respective antibiotic resistant strains (Herrig *et al.* 2020).

The objective of this study was therefore to assess the levels of AR and MAR *E. coli* isolated from the Meuse river and three tributaries, the Ourthe, the Vesdre and the Amblève, in Belgium with a particular interest given to beta-lactam antibiotic resistance by adding amoxicillin to the Chromogenic Selective Tryptone Bile X-glucuronide (TBX+AMX) culture medium.

## Results and discussion

The Ourthe river flows for 180 km in Southeast Belgium to the Meuse river. This river was selected because its sources are located in a rural and forest area and then it is submitted to demographic pressure and urbanization (Fig. 1). The samples were collected from 24 locations along the Ourthe, Vesdre, Amblève and Meuse rivers and in the wastewater effluents of four hospitals. Two sampling campaigns were organized in May and October 2019 to highlight a possible seasonal effect.

### *Escherichia coli* enumeration

All the samples were positive for *E. coli* on TBX and (TBX+AMX). The number of *E. coli* enumerated in the freshwaters ranged from 68.0 to  $9.5 \times 10^4$  colony forming units (CFU)  $\times$  (100 ml)<sup>-1</sup> on TBX and from 3.0 to  $1.6 \times 10^4$  CFU  $\times$  (100 ml)<sup>-1</sup> on (TBX+AMX) for the two sampling campaigns. In the four hospital effluents that

were directly sampled into hospital pipes, the number ranged between  $7.5 \times 10^5$  and  $1.1 \times 10^7$  CFU  $\times$  (100 ml)<sup>-1</sup> on TBX, which is close to the values found for the 17 samples of hospital wastewaters with a range from  $2.7 \times 10^4$  to  $3.6 \times 10^7$  CFU  $\times$  (100 ml)<sup>-1</sup> on chromocult coliform agar (Servais and Passerat 2009).

### AR *E. coli* per sampling station

The antimicrobial susceptibility to 12 antibiotics was measured for 938 *E. coli* strains (473 strains for the first campaign; 465 for the second) isolated from the Ourthe watershed, the Meuse, Amblève and Vesdre freshwaters (Fig. 1).

For the majority of the sampling stations, 10 strains were isolated per medium. In some rare cases, it was not possible to isolate this number (Table S1). Even though this is only a certain sampling of the present colonies, it gives a picture of the overall population and especially of the multiple antimicrobial resistances (MAR) of these isolates.

For the first campaign, at least one AR *E. coli* isolate was identified at each sampling station on (TBX+AMX). For TBX, AR *E. coli* were found in all sampling stations except in one location (Bomal) where no AR isolate could be identified. For the second campaign, AR isolates from (TBX+AMX) were identified at each sampling station, as for the first campaign. However, at two sampling stations—Mabompré and upstream from Tilff's wastewater treatment plant (WWTP)—no AR isolates were identified on TBX, suggesting the interest of supplementing TBX with AMX.

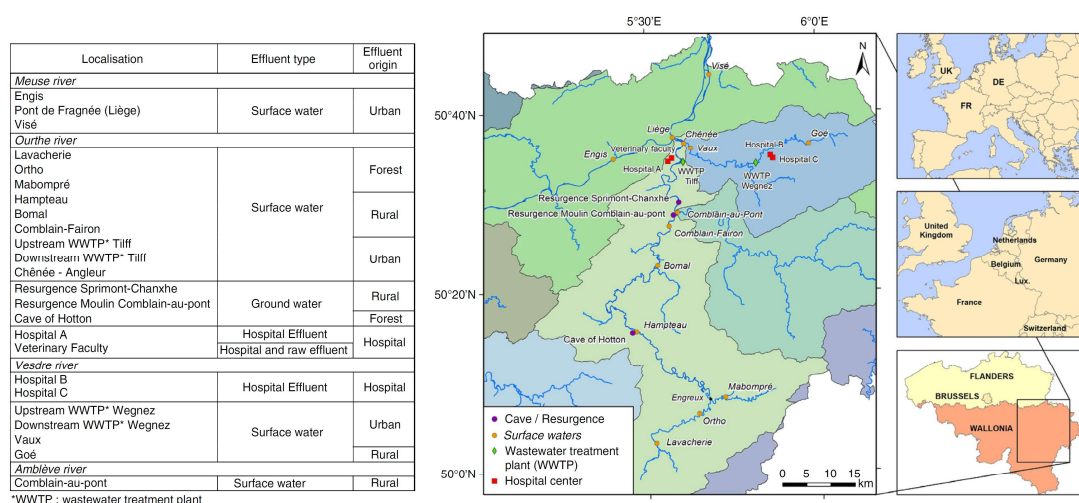
Samples from three resurgences were analysed and, although it could be assumed that the water was fairly pure and uncontaminated, these sites each contained AR isolates.

### Resistance rates by antibiotics

Resistance rates to all antibiotics tested were measured. For both TBX and (TBX+AMX) media, the highest resistance rates were observed for ampicillin (AMP), amoxicillin/clavulanic acid (AMC) and sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT). These three antibiotics are suitable for hospital, domestic and veterinary use. The AMC is the most sold antibiotic in Belgium, both in hospitals and in pharmacies (National Institute of Health and Disability Insurance of Belgium). The lowest resistance rates were measured for meropenem (MEM) and ertapenem (ETP), which are antibiotics of last resort and are only used in hospitals in Belgium. No MEM resistant was observed on the (TBX+AMX) medium during both campaigns (Table 1). Strains resistant to enrofloxacin and florfenicol, which are antibiotics for strictly veterinary use, have been detected at various sampling points. This can be

L. Crettels *et al.*

Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in water



**Figure 1** Sampling localisations along the Meuse, Ourthe, Vesdre and Amblève rivers and classification by type and area of origin. (●) Cave/Resurgence; (○) Surface waters; (◇) Wastewater treatment plant (WWTP); (■) Hospital center.

**Table 1** Comparison of resistance rates measured for each antibiotic on Tryptone Bile X-glucuronide agar (TBX) and TBX-amoxicillin (TBX+AMX) media

Antibiotic	Resistance rate (%)					
	TBX			(TBX+AMX)		
	C1*	C2†	P value‡	C1*	C2†	P value‡
FFC	2.5	4.1	0.30	12.4	13.8	0.82
ENR	4.6	7.3	0.17	14.5	14.23	0.76
CAZ	4.2	5.7	0.38	9	11.3	0.40
TZP	1.3	2.4	0.30	6.8	8.4	0.55
CN	5.4	4.1	0.54	7.7	10.9	0.23
MEM	0.4	0.4	0.99	0.0	0.0	–
AMC	15.9	14.2	0.75	50.9	51.0	0.96
ETP	1.3	0.4	0.32	1.3	1.7	0.68
AMP	26.4	31.3	0.19	99.1	97.1	0.09
SXT	14.6	18.3	0.24	41.9	47.3	0.18
CIP	4.6	7.7	0.12	15.4	14.2	0.57
CXM	7.5	8.5	0.59	17.9	20.1	0.64

FFC = florfenicol; ENR = enrofloxacin; TZP = piperacillin/tazobactam; CAZ = ceftazidim; MEM = meropenem; ETP = ertapenem; CXM = cefuroxime; CIP = ciprofloxacin; CN = gentamicin; AMP = ampicillin; AMC = amoxicillin/clavulanic acid; SXT = sulfamethoxazole/trimethoprim.

\*First campaign.

†Second campaign.

‡Obtained by chi-squared tests with SAS software 9.4 program.

explained by the fact that there are grazing areas along the Ourthe.

The average of resistant rate to AMX for the freshwater sampling stations for the both campaign was 26%. For

hospital effluents, it was 54%. Individually, the resistance rate reached 88 and 84% in Hospital A for the first and second campaigns, respectively, 32 and 78% in veterinary faculty, 31 and 18% in Hospital B and 26 and 77% in Hospital C (Table S1).

**Resistance and MAR rates on TBX and (TBX+AMX)**

On the TBX medium, 32.7% of strains were at least resistant to one antibiotic and 24.6% of strains were multiple antimicrobial resistant (MAR). This is less than the rate obtained in the Seine watershed in France (Passerat *et al.* 2010) where 42% of the *E. coli* strains were resistant to at least one antibiotic and 35% were MAR. This higher resistance in the Seine watershed is probably due to the fact that most of the samples collected in the Seine watershed were collected in the Parisian area where the density of population is very high. On the other hand, the antibiotic with the highest resistance rate was amoxicillin and the highest resistance rates were observed in hospital effluents, which was also the case in this study.

On the (TBX+AMX) medium, 99.8% of the strains were resistant to at least one antimicrobial agent and 75.7% were MAR (Table 2). The addition of AMX to the TBX medium therefore seems to increase the detection of AR *E. coli* among others due to the same mechanisms used by *E. coli* for amoxicillin and ampicillin resistance.

A total of 42.8% of strains isolated from the (TBX+AMX) medium were resistant to at least three antibiotics (multi-resistant), while only 15.7% were multi-resistant on TBX. This is also less than what was measured



**Table 2** Percentage of *Escherichia coli* strains resistant to at least one, two or three antibiotics on Tryptone Bile X-glucuronide agar (TBX) and TBX-amoxicillin (TBX+AMX) media for both campaigns (C1 or C2) and on average (X)

	Resistance rate (%)							
	TBX				(TBX+AMX)			
	C1*	C2 <sup>†</sup>	X <sup>‡</sup>	SD*	C1*	C2 <sup>†</sup>	X <sup>‡</sup>	SD*
≥1 antibiotic (AR)	32.2	33.3	32.7	0.78	100	99.6	99.8	0.28
≥2 antibiotics (MAR)	23.8	25.5	24.6	1.20	74.8	76.6	75.7	1.27
≥3 antibiotics (multi-resistant)	13.8	17.6	15.7	2.69	39.7	46.0	42.8	4.45

\*First campaign.

<sup>†</sup>Second campaign.<sup>‡</sup>Average resistance rates for both campaigns.

§Standard deviation of resistance rates for both campaigns.

on the San Pedro River (Mexico City) where 52% of *E. coli* were resistant to at least one antibiotic and 31% were multi-resistant (Ramírez Castillo *et al.* 2013). In the Ave River (Portugal), around three-quarters of the isolated *E. coli* were multi-resistant and most of them showed high resistance to ampicillin (85%) (Bessa *et al.* 2014) whereas in this study, the AMP resistance rate reached 26.4 and 31.3% for the first and the second campaigns, respectively, on TBX and 99.1 and 97.1% for the first and the second campaigns, respectively, on (TBX+AMX) (Table 1).

#### Statistical comparison of resistance rates between the two campaigns

The chi-squared test did not show any significant difference ( $P > 0.05$  for each antibiotic) between the two campaigns for each antimicrobial resistance rate by antibiotic (Table 1). As expected, the resistance rate to enrofloxacin (ENR) was similar to ciprofloxacin (CIP).

MAR index was calculated for both campaigns and by effluent type. As expected, the MAR index for hospital effluent is the highest. It varies between 0.16 and 0.22 on TBX and between 0.33 and 0.38 on (TBX+AMX) for hospital effluents. For freshwater station, it varies from 0.03 to 0.07 on TBX and from 0.20 to 0.25 on (TBX+AMX). Servais and Passerat (2009) studied the antimicrobial resistance of faecal bacteria in waters of the Seine river watershed in France. They found a MAR index of 0.075 for rivers and 0.250 for hospital effluents, which is close to the results obtained in our study on the TBX medium.

The MAR index calculated according to the location of the sampling stations in the river is very close between forest (0.06–0.03), rural (0.06–0.04) and urban (0.05–0.07) areas for the first and second campaigns, respectively (Fig. 2). This can be explained by the fact that the Ourthe is a river in the district of Liege, which is not a megalopolis. It is therefore difficult to discriminate between forest, rural and urban areas.

The difference in MAR index for hospital effluents between the first and second campaigns can be explained by the sampling variability. Indeed, the sampling was performed early in the morning, in the same place but consisted in a one-time collection (grab samples) implying that the amount and the origin of faeces present in the pipes could not be verified.

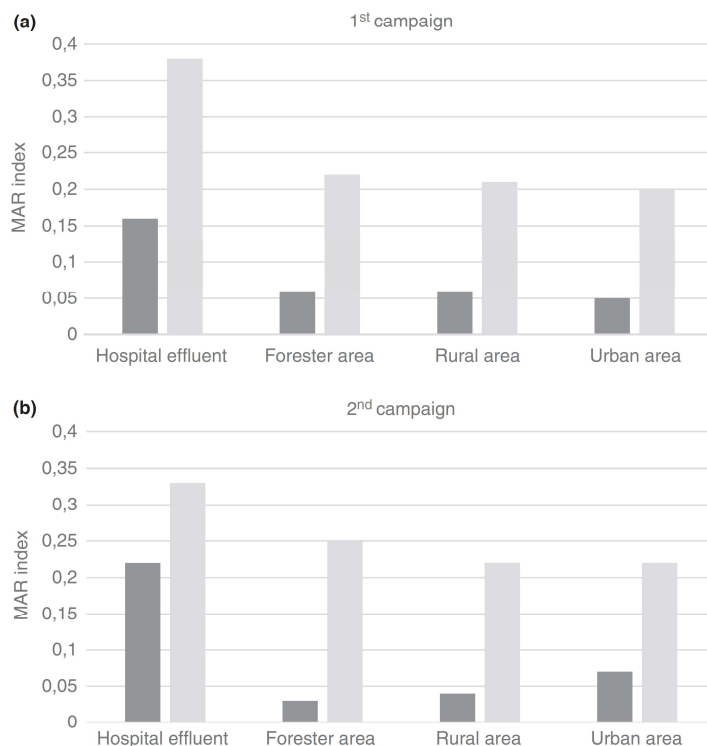
#### Assessment of the MAR index along the Ourthe river

In order to compare the fluctuation of the multiple resistance along the Ourthe river, a longitudinal profile of the MAR index was performed (Fig. 3). This river was studied from its sources to the confluence with the Meuse river in Liège and included more than nine sampling stations along it.

One sampling in the Ourthe river was performed upstream and downstream from the Tilff WWTP which has a nominal capacity of 27 000 inhabitant-equivalents. The MAR index fluctuated greatly from the first campaign to the second for the veterinary Faculty effluent, which partly included effluents from a veterinary clinic.

Despite the high load of MAR *E. coli* from Hospital A, no increase in the MAR index associated with this intake between downstream and upstream of the WWTP was observed. This evolution can be explained either by the fact that the WWTP has a good removal efficiency and makes it possible to reduce the bacterial load entering it, but also by the dilution of its discharge into the Ourthe, which induces a dilution effect.

As conclusion, we found AR *E. coli* in all sampling stations, even those closest to the Ourthe sources. Hospital effluents contained a large number of MAR *E. coli* suggesting that they can play an important role for the spread of antimicrobial resistance in the environment. Indeed, Hassoun-Kheir *et al.* (2020) showed that hospital wastewaters contain much more antimicrobial resistant bacteria than community wastewaters in 30/37 (81%) of the reviewed studies (Hassoun-Kheir *et al.* 2020).



**Figure 2** MAR index by effluents for (a) first campaign and (b) second campaign on TBX (dark grey) and (TBX+AMX) (light grey).

Two analysis campaigns were carried out, in different seasons, to highlight the impact of the season on antibiotic consumption. Statistical tests were used and showed that there was no difference between the resistance rates per antibiotic for the two campaigns. According to their geographical location and the type of effluent to which they belong, the sampling stations were classified into four types (freshwater in forest areas, rural, urban and hospital effluent). A difference was found between hospital effluent and freshwater samples, but not between forest, rural and urban areas along the Ourthe river.

As a perspective to this study, it would be interesting to study the genetic content by performing genotypic tests or whole genome sequencing of our isolates.

## Materials and methods

### Description of the rivers and water sampling

Two sampling campaigns were performed in May and October 2019 to assess the seasonal effect, linked to antibiotic use, on the level of AR and MAR bacteria observed. Liège, a city of ca. 200 000 inhabitants, is located at the

confluence of the river Meuse and its tributary, the Ourthe that receives the waters of the Vesdre and of the Amblève a few miles upstream (Fig. 1).

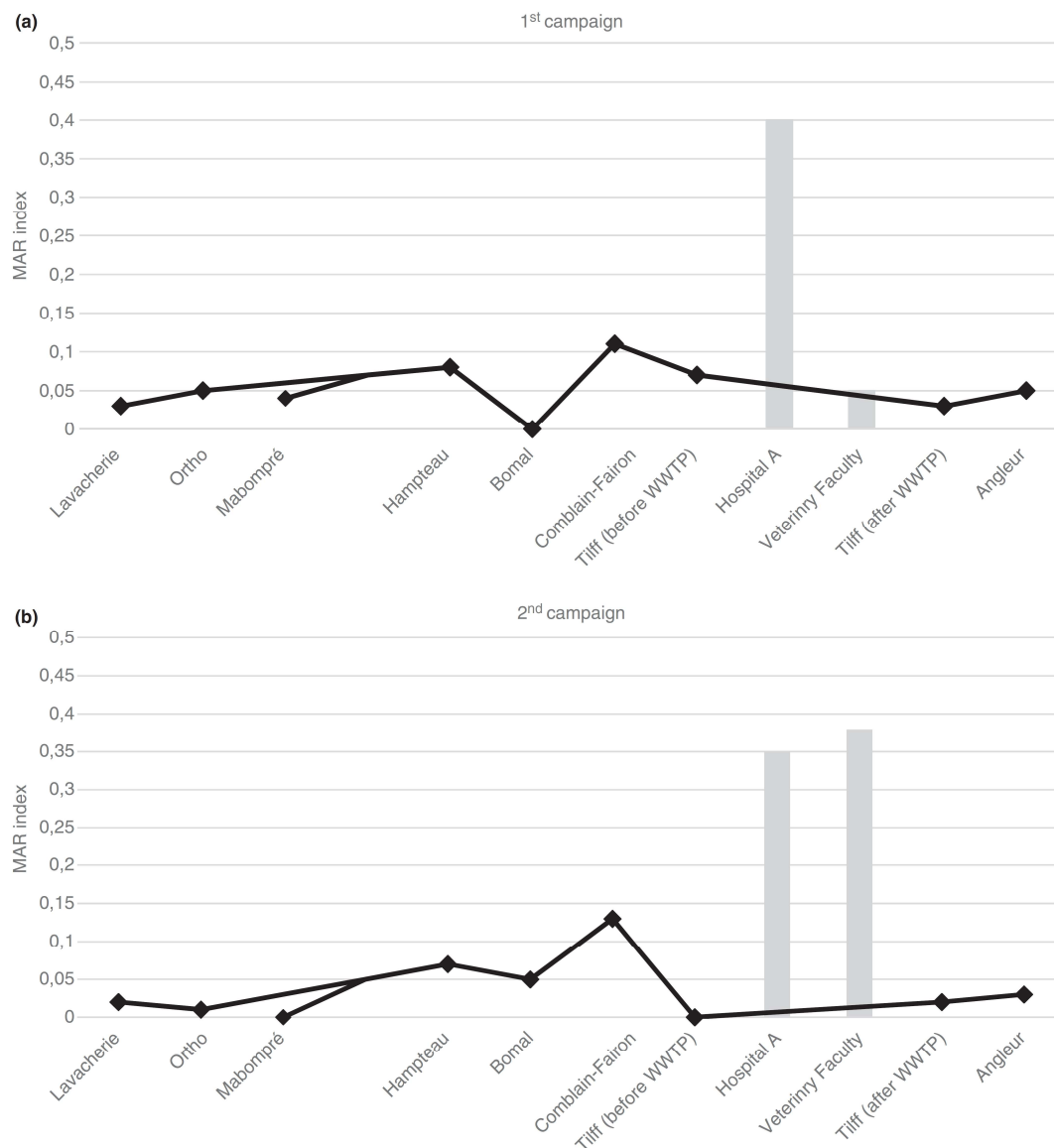
Samples were collected from four rivers. In addition, four hospital effluents were sampled. The 20 sampling stations from freshwaters were classified according to the dominant land covers of river watersheds (rural (7), urban (9) and forest (4) areas).

Water samples were collected in 1-L sterile polyethylene bottles without any preservative, transported at 4°C and stored at  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  and analysed within 24 h.

### Enumeration and *E. coli* isolation

At first 10-fold dilutions of each sample were membrane filtered through 0.45- $\mu\text{m}$  pore size filters (Millipore Corporation, USA) which were placed on TBX (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and incubated overnight at 37°C to select the optimal two dilutions for colony forming unit (CFU) counts, according to the ISO 8199:2018 norm (International Organization for Standardization, Switzerland).

The optimal two dilutions were membrane filtered a second time and the filters were placed on TBX and on

Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in waterL. Crettels *et al.*

**Figure 3** Evolution of the MAR index along the Ourthe (black line) (a) for the first campaign and (b) for the second campaign. Two histograms show the MAR index obtained in Hospital A and veterinary Faculty effluents (grey bar) which flows directly in the Tilff wastewater plant (WWTP).

TBX supplemented with AMX ( $8 \text{ mg l}^{-1}$  corresponding to the minimum inhibitory concentration of AMX) (Acros Organics, Morristown, NJ, USA) to select beta-lactam resistant *E. coli*, and incubated overnight at  $37^\circ\text{C}$  (Bessa *et al.* 2014). For each water sample, 10 colonies of *E. coli* were randomly picked up from TBX and 10 from (TBX+AMX), inoculated on TBX medium to check the

purity (Bessa *et al.* 2014) and stored at  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  until further used.

#### Antimicrobial susceptibility testing

For all the isolates from TBX and (TBX+AMX) media, a susceptibility testing was performed on Mueller–Hinton

(MH) agar (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the disk diffusion test and plates were incubated for  $18 \pm 2$  h at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  according to the European Committee on Antimicrobials (EUCAST, 2019 and CASFM-VET 2018) (Matuschek *et al.* 2014). *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was included in each assay as negative control. Antimicrobial agents were distributed on MH agar with a six-disk dispenser (Oxoid, Thermo Fisher Diagnostics, France).

A total of 12 antibiotics were chosen based on sale volumes in human medicine (National Institute of Health and Disability Insurance of Belgium) and on their use (veterinary, human or mixed): florfenicol (FFC, 30  $\mu\text{g}$ ), enrofloxacin (ENR, 5  $\mu\text{g}$ ), piperacillin/tazobactam (TZP, 30/6  $\mu\text{g}$ ), ceftazidim (CAZ, 10  $\mu\text{g}$ ), meropenem (MEM, 10  $\mu\text{g}$ ), ertapenem (ETP, 10  $\mu\text{g}$ ), cefuroxime (CXM, 30  $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacin (CIP, 5  $\mu\text{g}$ ), gentamicin (CN, 10  $\mu\text{g}$ ), ampicillin (AMP, 10  $\mu\text{g}$ ), amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10  $\mu\text{g}$ ) and sulfamethoxazole/trimethoprim (co-trimoxazole) (SXT, 23.75/1.25  $\mu\text{g}$ ).

#### Resistance rates

An isolate was considered as antimicrobial resistant (AR) if it was resistant to at least one of the antimicrobials tested and MAR if it was resistant to at least two antibiotics.

As we had *E. coli* counts on TBX and (TBX+AMX), the AMX resistance rate was calculated by making the ratio between the numbers of CFU on TBX and on (TBX+AMX). For the other antibiotics, the percentages of *E. coli* resistant to at least one, two or three antibiotics on TBX and (TBX+AMX) were calculated by making the ratio between the number of isolates, respectively, resistant to at least one, two or three antibiotics and the total of isolates tested by antimicrobial susceptibility testing.

A MAR index was calculated by sampling station as described by Krumperman (1983). The MAR index of a sample was calculated by  $a/(b*c)$  where  $a$  is the aggregate antibiotic resistance score of all isolates from the sample (sum over all isolates of the number of antimicrobials to which each isolate is resistant),  $b$  the number of antibiotics and  $c$  the number of isolates from the sample.

#### Statistical analysis

Chi-squared tests were performed to compare the resistance rates per antibiotic and per sample type during the two campaigns with the procedure freq of SAS software 9.4 program (SAS Institute, Cary, NC, USA). A  $P$ -value of  $<0.05$  was defined as a statistically significant difference between the resistance rates of either campaign.

#### Acknowledgements

The authors thank the Public Service of Wallonia (SPW) for financing of this study ('Antibiobug' project, ENVIeS plan (Action I-4-4)).

#### Conflict of Interest

There is no conflict of interest to declare.

#### Author contributions

L. Crettels was the project manager, performed the interpretation of the results and wrote the manuscript. R. Breyer and J. Korfer performed the laboratory analysis. N. Burlion and D. Thiry supervised the work. N. Burlion, J. Mainil, P. Servais and D. Thiry wrote parts of the manuscript. All authors reviewed the final manuscript.

#### References

- Bessa, L.J., Barbosa-Vasconcelos, A., Mendes, A., Vaz-Pires, P. and Martins da Costa, P. (2014) High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* in river water, upstream and downstream of a wastewater treatment plant. *J Water Health* **12**, 426–435.
- Ghaderpour, A., Ho, W.S., Chew, L.-L., Bong, C.W., Chong, V.C., Thong, K.-L. and Chai, L.C. (2015) Diverse and abundant multi-drug resistant *E. coli* in Matang mangrove estuaries, Malaysia. *Front Microbiol* **6**, 977.
- Hassoun-Kheir, N., Stabholz, Y., Kreft, J.-U., de la Cruz, R., Romalde, J.L., Nesme, J., Sorensen, S.J., Smets, B.F. *et al.* (2020) Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: a systematic review. *Sci Total Environ* **743**, 140804.
- Herrig, I., Fleischmann, S., Regnery, J., Wesp, J., Reifferscheid, G. and Manz, W. (2020) Prevalence and seasonal dynamics of blaCTX-M antibiotic resistance genes and fecal indicator organisms in the lower Lahn River, Germany. *PLoS One* **15**, e0232289.
- Koczura, R., Mokracka, J., Barczak, A., Krysiak, N. and Kaznowski, A. (2013) Association between the presence of class 1 integrons, virulence genes, and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. *Microb Ecol* **65**, 84–90.
- Krumperman, P.II. (1983) Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol* **46**, 165–170.
- Kürekci, C., Aydin, M., Yipel, M., Katouli, M. and Gündoğdu, A. (2017) Characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Asi (Orontes) River in Turkey. *J Water Health* **15**, 788–798.

Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in water

L. Crettels et al.

- Lenart-Boroń, A. (2017) Antimicrobial resistance and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* from major rivers in Podhale, southern Poland. *Int J Environ Sci Technol* **14**, 241–250.
- Matuschek, E., Brown, D.F.J. and Kahlmeter, G. (2014) Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* **20**, O255–O266.
- O'Dwyer, J., Hynds, P., Pot, M., Adley, C.C. and Ryan, M.P. (2017) Evaluation of levels of antibiotic resistance in groundwater-derived *E. coli* isolates in the Midwest of Ireland and elucidation of potential predictors of resistance. *Hydrogeol J* **25**, 939–951.
- Oberlé, K., Capdeville, M.-J., Berthe, T., Budzinski, H. and Petit, F. (2012) Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from medical center patients to a receiving environment. *Environ Sci Technol* **46**, 1859–1868.
- Passerat, J., Tamtam, F., Le Bot, B., Eurin, J., Chevreuil, M. and Servais, P. (2010) Rejets hospitaliers d'antibiotiques et de bactéries fécales antibiorésistantes dans les rivières du bassin de la Seine. *Eur J Water Qual* **41**, 1–13.
- Pereira, A., Santos, A., Tacão, M., Alves, A., Henriques, I. and Correia, A. (2013) Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Sci Total Environ* **461–462**, 65–71.
- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H. and Carlson, K.H. (2006) Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in Northern Colorado. *Environ Sci Technol* **40**, 7445–7450.
- Ramírez Castillo, F.Y., Avelar González, F.J., Garneau, P., Márquez Díaz, F., Guerrero Barrera, A.L. and Harel, J. (2013) Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Front Microbiol* **4**, 147.
- Sayah, R.S., Kaneene, J.B., Johnson, Y. and Miller, R. (2005) Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1394–1404.
- Servais, P. and Passerat, J. (2009) Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Sci Total Environ* **408**, 365–372.
- Su, H.-C., Ying, G.-G., Tao, R., Zhang, R.-Q., Zhao, J.-L. and Liu, Y.-S. (2012) Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. *Environ Pollut* **169**, 42–49.
- Taylor, N.G.H., Verner-Jeffreys, D.W. and Baker-Austin, C. (2011) Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends Ecol Evol* **26**, 278–284.
- Zurfluh, K., Hächler, H., Nüesch-Inderbinen, M. and Stephan, R. (2013) Characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates from rivers and lakes in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* **79**, 3021–3026.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1** Number of isolates, *Escherichia coli* count and MAR index calculated per sampling station.

---

# Section expérimentale

Etude 2 :

Antimicrobial resistant *Escherichia coli* prevalence in freshwaters in Belgium and human exposure risk assessment

---

Heliyon 9 (2023) e16538
-------------------------

L. Crettels, L. Champon, N. Burlion, E. Delrée, C. Saegerman, D. Thiry

## ***Préambule***

L'objectif de cette seconde étude était de poursuivre l'évaluation de la présence d'*E. coli* antibiorésistantes réalisée lors de la première étude, mais en ciblant les eaux de baignade : 9 stations (5 en rivière, 3 lacs et 1 fleuve canalisé) ont été échantillonnées pendant la saison de baignade, d'avril à septembre 2021. En effet, dans le contexte « One Health », les eaux de baignade sont des lieux potentiellement dangereux pour la santé humaine puisque les baigneurs sont plus aisément en contact avec les bactéries antibiorésistantes présentes dans l'eau.

Au total, 912 souches d'*E. coli* ont été isolées sur les milieux TBX et TBX+AMX. Un test par diffusion en gélose (antibiogramme), comprenant le test de la combinaison de disques pour la détection de BLSE, a été réalisé en suivant les recommandations de l'EUCAST pour mettre en évidence les résistances à 16 antibiotiques préalablement sélectionnés.

Sur le milieu TBX, environ 24% des souches sont au moins résistantes à un antibiotique et environ 6% sont résistantes à au moins 3 antibiotiques. Les plus hauts taux de résistance, tant pour le milieu TBX que le TBX+AMX, ont été rencontrés pour l'ampicilline (AMP : 22,1%), l'amoxicilline couplée à l'acide clavulanique (AMC : 8,9%) et le sulfaméthoxazole et triméthoprim (SXT : 8,2%). Sur le milieu TBX, les taux de résistance les plus faibles sont observés pour la tigécycline (0,2%) et la ceftazidime (0,4%). Pour les deux carbapénèmes de derniers recours testés, aucune souche résistante au mérépénème n'a été trouvée alors que 2,5% de souches étaient résistantes à l'ertapénème.

Les deux stations sur la Lesse (Pont à Lesse et Houyet) sont celles qui présentaient les MAR index, les concentrations en *E. coli* ainsi que le nombre d'*E. coli* productrices de BLSE les plus élevés. À l'inverse, les 3 lacs ont montré globalement des niveaux de contamination en *E. coli* et des taux d'antibiorésistance plus faibles.

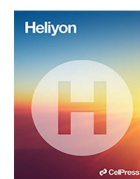
Des *E. coli* productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (EcBLSE) ont été retrouvées au moins une fois à chaque point de baignade. Ces souches EcBLSE représentent 3% des souches isolées et ont été détectées dans un tiers des 54 échantillons.

Une évaluation du risque d'exposition humaine aux *E. coli* antibiorésistantes a été réalisée à partir des données mesurées lors de cette étude en tenant compte de 4 scénarios de modèle dose-réponse. Les probabilités d'infection obtenues montrent des probabilités d'infection faible dépendant fortement du scénario choisi.



Contents lists available at ScienceDirect

Heliyon

journal homepage: [www.cell.com/heliyon](http://www.cell.com/heliyon)

## Research article

Antimicrobial resistant *Escherichia coli* prevalence in freshwaters in Belgium and human exposure risk assessmentL. Crettels<sup>a,c,1,\*</sup>, L. Champon<sup>a,1</sup>, N. Burlion<sup>a</sup>, E. Delrée<sup>a</sup>, C. Saegerman<sup>b</sup>, D. Thiry<sup>c</sup><sup>a</sup> Department of Microbiology, Scientific Institute of Public Service (ISSEP), Liège, Belgium<sup>b</sup> Research Unit in Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences, Centre for Fundamental and Applied Research for Animal Health (FARAH), University of Liège, Liège, Belgium<sup>c</sup> Veterinary Bacteriology and Bacterial Animal Diseases, Department of Parasitic and Infectious Diseases, Centre for Fundamental and Applied Research for Animals and Health (FARAH), University of Liège, Liège, Belgium

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Antibiotic resistance  
Recreational water  
Bathing water  
Water quality  
Wallonia  
Human health exposure risk assessment

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the antimicrobial resistant (AR) *E. coli* prevalence in recreational waters in Belgium and to assess the exposure risk for bathers. Nine stations were sampled during the 2021 bathing season. A total of 912 *E. coli* strains were isolated and tested by the disk diffusion method in accordance with EUCAST recommendations, including Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) production. AR *E. coli* were counted at each bathing sites, 24% of strains were resistant to at least one antibiotic and 6% were Multi-Drug Resistant (MDR). A Multiple Antibiotic Resistance (MAR) index was calculated to compare the bathing sites. The Lesse river had the highest MAR index as well as the highest *E. coli* absolute abundance and the largest number of ESBL-producing *E. coli*. Conversely, the 3 lakes showed lower *E. coli* contamination levels and AR rates. A human health risk assessment of exposure to AR *E. coli*, based on the calculation of measured prevalence, was performed considering four different dose-response model scenarios. The human health risk (Pd) ranged from  $10^{-9}$  to 0.183 (children). The exposure probabilities were low, except for scenario 3 (*E. coli* O157:H7), which is the most severe.

## 1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is one of the greatest threats to health care in the world [1]. In the recent years, the “One Health” concept, recognizing, among others, the link between human, animal and environmental health, has become critically important [2]. The effect of clinically relevant antimicrobial resistance genes (ARGs) and antimicrobial resistant bacteria (ARB) that are released from anthropogenic sources, together with the excessive use of antibiotics in human or veterinary medicine and agriculture, is currently considered to be a critical environmental issue [3].

Bathing waters are monitored in Europe by the European Water Framework Directive (2006/7/EC), which classifies it as excellent, good, sufficient or poor based on thresholds for two fecal indicator organisms: *Escherichia coli* and intestinal enterococci. Although it is currently being revised, it is not intended to include an ARB monitoring despite the studies demonstrating the importance to monitor them [4,5].

\* Corresponding author. Department of Microbiology, Scientific Institute of Public Service (ISSEP), Rue du Chéra 200, 4000 Liège, Belgium.

E-mail address: [l.crettels@issep.be](mailto:l.crettels@issep.be) (L. Crettels).

<sup>1</sup> The two authors have equally contributed to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16538>

Received 22 September 2022; Received in revised form 12 May 2023; Accepted 18 May 2023

Available online 24 May 2023

2405-8440/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Bathing waters are part of the environment that can be affected by the release of ARB through hospital or community wastewaters discharges and from intensive livestock production [6]. While conventional wastewater treatment plants (WWTPs) reduce the bacterial absolute abundance in water, they do not appreciably reduce the proportion of ARB [7] and pollute receiving waters with high levels of fecal indicator bacteria and ARGs [8]. Bathing waters contribute to the transmission of pathogenic agents including New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM) producing *Enterobacteriaceae* and ESBL-EC [9,10] and represent a putative reservoir and pathway for AR organisms spread [11,12]. Previous studies suggested that people with community-acquired urinary tract infection are more likely to be infected with an ESBL-EC if they bathed in freshwater within the last 12 months [13]. Furthermore, human intestinal colonization by AR commensal bacteria can persist for several months [14], and horizontal gene transfer of ARG on mobile genetic element can take place in vivo between ARB and transient or resident intestinal bacteria [15].

Though limited in number, previous epidemiological studies assessed the association between potential exposure to ARB through recreational aquatic activities and health endpoints such as gastrointestinal disease [16] and intestinal colonization with ESBL-EC bacteria [12]. For instance, higher rates of *E. coli* carrying Beta-lactamase encoding gene (*bla*CTX-M) colonization were observed in surfers (6.3%) than in non-surfers (1.5%) [12].

Several studies on AMR in bathing waters have been conducted in different countries [17–19] and a few of them estimate human health risks associated with AMR in recreational waters, with preliminary work focusing on exposure assessments [20–22]. Other studies proposed framework for the environmental surveillance of AR and its related parameters [23–25].

This study report, for the first time, the Belgian situation with a human health exposure risk assessment according to 4 scenarios following a new framework [26].

The aims of this study were (i) to assess the levels of AR *E. coli* in bathing sites in Belgium (ii) to study the resistance rate evolution during a bathing season (iii) to monitor the ESBL-EC prevalence and (iv) to determine the risk for human health.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bathing stations

Nine areas of recreational waters were sampled from five watersheds in the Walloon Region of Belgium. The bathing stations were selected according to their different anthropic and demographic pressures and their nature: rivers (5 sampling zones), lakes (3 sampling zones) and canalized river (one sampling zone) (Fig. 1).

### 2.2. Water sampling

Samples were collected monthly from April to September 2021 covering the bathing period.

Water samples were collected in 1-L sterile polyethylene bottles without any preservative, transported at 4 °C, stored at 5 ± 3 °C and analyzed within 24 h.

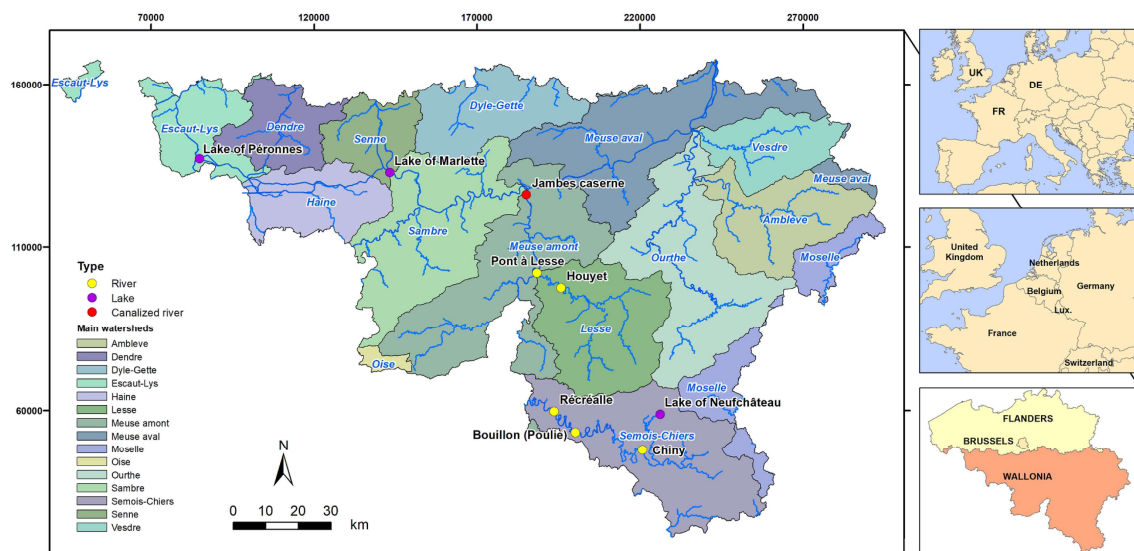


Fig. 1. Sampling areas of the recreational waters in Belgium. Rivers (5); Lakes (3); Canalized river (1) (ArcMap).

During each sampling, various field parameters were recorded. Firstly, the water physico-chemical parameters (temperature, dissolved oxygen, pH, conductivity and turbidity) were obtained and secondly, environmental observations were recorded (climate, number of animals, presence of bathers or kayaks, presence of waste or unusual smells).

### 2.3. *E. coli* absolute abundance

At first 10-fold dilutions of each sample were membrane filtered through 0.45- $\mu\text{m}$  pore size filters (Millipore Corporation, USA) which were placed on Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and incubated overnight at 37 °C to select the two optimal dilutions for Colony Forming Unit (CFU) counts, according to the ISO 8199:2018 norm (International Organization for Standardization, Switzerland).

The two optimal dilutions were membrane filtered a second time. Then, the filters were placed on TBX and on TBX supplemented with amoxicillin (AMX) at 8 mg l<sup>-1</sup> corresponding to the minimum inhibitory concentration of AMX (Acros organics, New Jersey, USA) to select beta-lactam-resistant *E. coli*, and incubated overnight at 37 °C for *E. coli* absolute abundance enumeration and isolation [27].

### 2.4. *E. coli* isolation and confirmation

For each water sample, ten colonies of *E. coli* were randomly picked up from TBX and ten from TBX + AMX, inoculated on TBX medium to check the purity [27] and stored at 5 ± 3 °C until further used.

The confirmation of presumptive *E. coli* isolates was further tested for tryptophanase activity with Kovac's reagent. Only indole positive isolates were considered for further analysis.

### 2.5. Antimicrobial susceptibility testing

For all strains isolated on TBX and TBX + AMX media, a susceptibility test was performed on Mueller-Hinton (MH) agar (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) using the disk diffusion assay and plates were incubated for 18 ± 2 h at 35 ± 1 °C according to the European Committee on Antimicrobials (EUCAST, 2020) [28]. *E. coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, US) was included in each assay as negative control. The antimicrobial disks (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) were dispensed on MH agar with automatic disk dispenser (16-disks per plate) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

A total of 16 antibiotics selected based on sale volumes in human medicine (National Institute of Health and Disability Insurance of Belgium) and on their use (hospital, domestic or veterinary uses) were tested: ampicillin (AMP, content of the disk: 10  $\mu\text{g}$ ), amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10  $\mu\text{g}$ ), cefotaxim (COX, 5  $\mu\text{g}$ ), cefotaxim/clavulanic acid (CCO, 5/10  $\mu\text{g}$ ), ceftazidim (CZD, 10  $\mu\text{g}$ ), ceftazidim/clavulanic acid (CCZ, 10/10  $\mu\text{g}$ ), cefuroxime (CXM, 30  $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacin (CIP, 5  $\mu\text{g}$ ), ertapenem (ETP, 10  $\mu\text{g}$ ), fosfomycin (FOS, 200  $\mu\text{g}$ ), gentamicin (GN, 10  $\mu\text{g}$ ), nitrofurantoin (NFE, 100  $\mu\text{g}$ ), meropenem (MEM, 10  $\mu\text{g}$ ), piperacillin/tazobactam (PTZ, 30/6  $\mu\text{g}$ ), sulfamethoxazole/trimethoprim (co-trimoxazole) (SXT, 23.75/1.25  $\mu\text{g}$ ), and tigecyclin (TGC, 15  $\mu\text{g}$ ).

Of these 16 antibiotics, cephalosporin discs without (COX, CZD) and with clavulanic acid (CCO, CCZ) were used for phenotypic confirmation of ESBL production in *Enterobacterales* according to the EUCAST technical guide.

### 2.6. Antimicrobial resistance rates

The AMX resistance rate was calculated by making the ratio between the numbers of CFU on TBX and on TBX + AMX. For the other antibiotics, the percentages of *E. coli* resistant to at least one, two or three antibiotics on TBX and TBX + AMX were calculated by making the ratio between the number of isolates respectively resistant to at least one, two or three antibiotics and the total of isolates. A Multi-Drug Resistant (MDR) strain is defined as being resistant to at least 3 antibiotics.

A Multiple Antimicrobial Resistant (MAR) index was calculated by sampling station. The MAR index of a sample was calculated with the following formula "a/(b\*c)" where "a" is the aggregate antibiotic resistance score of all isolates from the sample (sum over all isolates of the number of antimicrobials to which each isolate is resistant), "b" is the number of tested antibiotics, and "c" is the number of isolates from the sample [29].

### 2.7. Statistical analysis

A Variance Analysis was performed with the Proc GLM of SAS software 9.4 program (SAS Institute, Cary, NC, USA) to study the impact of the localization and month of sampling on the *E. coli* absolute abundance and the MAR index. A logarithmic and a square root transformation were done on *E. coli* absolute abundance and MAR index respectively to normalize the data.

The Pearson correlation between *E. coli* absolute abundance and the MAR index was calculated with the Proc CORR of SAS software 9.4 program (SAS Institute, Cary, NC, USA).

### 2.8. Risk assessment

The daily exposure to AR *E. coli* probability (Pd) was performed based on the data obtained in this study following Tyagi & Kumar [26].

The input data were the concentration of *E. coli* (CFU/ml) and the number of isolates per sample on TBX, the number of isolates with

**Table 1**

Exposure parameters for bathers in freshwater: frequency of swimming per year, duration of swimming and volume swallowed per swimming event [30].

	Men		Women		Children	
	Average	95% CI <sup>a</sup>	Average	95% CI <sup>a</sup>	Average	95% CI <sup>a</sup>
Frequency	7	0–25	7	0–23	8	0–25
Duration (min)	54	7–200	54	6–222	79	12–270
Volume swallowed (ml)	27	0.016–140	18	0.022–86	37	0.14–170

<sup>a</sup> CI: Confidence Interval.

at least one resistance and the number of non-resistant isolates.

The *fvalue* was calculated by antibiotic [26], but specific D-R models for each antibiotic were not available. In this study, *fvalue*, which ranged from 0 to 1, was defined as following:

$$fvalue = \frac{\text{Number of isolates with at least one resistance}}{\text{Total number of isolates}} \quad (1)$$

The concentration of AR *E. coli* (CFU/ml) was calculated as following:

$$\text{AR } E. coli \text{ concentration} = fvalue \times E. coli \text{ concentration} \quad (2)$$

The concentration of non-AR *E. coli* (CFU/ml) was calculated as following:

$$\text{non-AR } E. coli \text{ concentration} = (1 - fvalue) \times E. coli \text{ concentration} \quad (3)$$

The number of AR and non-AR *E. coli* swallowed per exposure (N) during a dip [30] (Table 1) were measured as following:

$$\text{AR } E. coli \text{ dose swallowed (N)} = \text{AR } E. coli \text{ concentration} \times \text{volume swallowed} \quad (4)$$

$$\text{non-AR } E. coli \text{ dose swallowed (N)} = \text{non-AR } E. coli \text{ concentration} \times \text{volume swallowed} \quad (5)$$

Different dose response (D-R) model scenarios were used to assess the probability of daily exposure (Pd) (Table 2). For the AR *E. coli* concentration, the 4 scenarios have been applied while for the non-AR *E. coli* concentration only scenario 1 has been applied since it corresponds to susceptible bacteria.

The annual exposure risk assessment of bathing water ingestion was given by:

$$\text{Annual exposure probability (Pa)} = 1 - (1 - Pd)^n \quad (6)$$

with *n*, the number of bathing per year (Table 1).

To take into account the infectious potential of non-AR *E. coli*, an overall probability of exposure was calculated as following:

$$\text{Overall exposure probability (Poverall)} = 1 - (1 - Pd_{AR}) \times (1 - Pd_{nonAR}) \quad (7)$$

The gastrointestinal (GI) illness risk caused by *E. coli* ingestion was also given by the U.S. Environmental Protection Agency [31] as following:

$$\text{Risk of GI / 1000 persons} = 9.4 \times (\log \text{ concentration } E. coli \text{ in 100 ml}) - 11.74 \quad (8)$$

$$\text{GI probability / person} = (9.4 \times (\log \text{ concentration } E. coli \text{ in 100 ml}) - 11.74) / 1000 \quad (9)$$

**Table 2**

Assumed dose-response (D-R) models based on four considered scenarios to assess the human exposure risk to antibiotic resistant (AR) *Escherichia coli* [26].

Scenarios	Host and response type	D-R model	Model parameters for infection endpoints
1: AR <i>E. coli</i> D-R model is similar to non AR <i>E. coli</i>	Human, diarrhoea	Beta-poisson model $P_d = 1 - \left(1 + \frac{N}{\beta}\right)^{-\alpha}$	$\alpha = 0.1705, \beta = 1.61 \times 10^6$
2: AR <i>E. coli</i> D-R model is similar to gentamicin resistant <i>E. coli</i>	Human, diarrhoea	Beta-poisson model $P_d = 1 - \left(1 + \frac{N}{\beta}\right)^{-\alpha}$	$\alpha = 0.16, \beta = 1.41 \times 10^6$
3: AR <i>E. coli</i> D-R model is similar to most infectious/virulent bacteria ( <i>E. coli</i> O157:H7/ Shigella)	Human, severe diarrhoea	Beta-poisson model $P_d = 1 - \left(1 + \frac{N}{\beta}\right)^{-\alpha}$	$\alpha = 0.277, \beta = 2.38 \times 10^2$
4: AR <i>E. coli</i> D-R model is similar to most persistent bacteria ( <i>Clostridium perfringens</i> )	Human, vomiting, abdominal cramps and diarrhoea within 24 h	Exponential model $P_d = 1 - e^{-r \times N}$	$r = 1.82 \times 10^{-11}$

### 3. Results

#### 3.1. Water sampling

The nine stations were sampled monthly from April to September 2021, representing 54 samples and covering the bathing season in order to highlight the public exposure levels to AR *E. coli*.

#### 3.2. *E. coli* absolute abundance

The samples from the Houyet station (Lesse river) contained the highest *E. coli* absolute abundance, with an average of 1807 CFU  $\times$  (100 ml)<sup>-1</sup> over the six months. Then came the lake of Neufchâteau and the Pont à Lesse station (Lesse river) with 1594 and 1574 CFU  $\times$  (100 ml)<sup>-1</sup> respectively (Table 3 and Fig. 2).

The samples from the lake of Péronnes were the least loaded with *E. coli* with an average of 120 CFU  $\times$  (100 ml)<sup>-1</sup> over the six months. All stations together, the highest average isolate numbers were counted in May and July with 1912 CFU and 1265 CFU  $\times$  (100 ml)<sup>-1</sup> respectively.

Statistical analysis showed that the localization and month effects were both highly significant on the *E. coli* absolute abundance ( $p < 0.001$ ).

#### 3.3. Antimicrobial resistance rates

Resistances were found against all antibiotics tested except for MEM which is a last resort molecule. The resistance rates measured

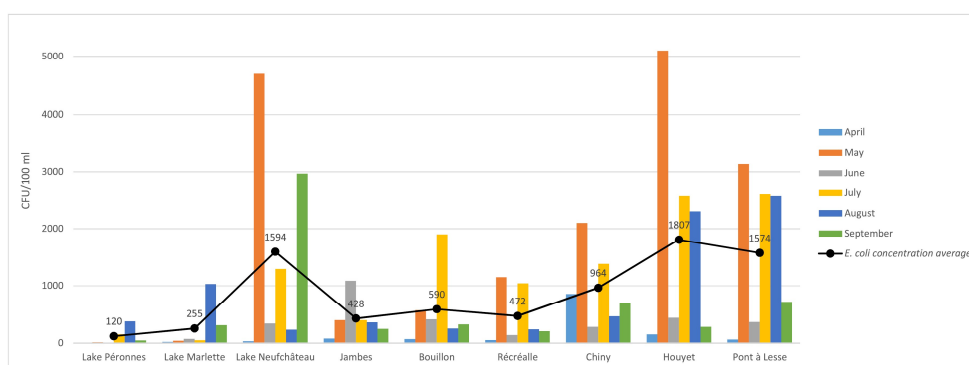
**Table 3**  
Average *Escherichia coli* absolute abundance (CFU/100 ml) per station and per month on the Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) medium.

		$\bar{X}^a$	SD <sup>b</sup>	SD/ $\bar{X}^c$
Sampling areas	Lake of Péronnes	120	157	1.3
	Lake of Marlette	255	394	1.5
	Lake of Neufchâteau	1594	1870	1.2
	Jambes	428	345	0.8
	Bouillon	590	663	1.1
	Récréalle	472	489	1.0
	Chiny	964	672	0.7
	Houyet	1807	1928	1.1
	Pont à Lesse	1574	1338	0.8
Months	April	165	281	1.7
	May	1912	1976	1.0
	June	350	2055	5.9
	July	1265	1673	1.3
	August	870	1790	2.1
	September	645	1882	2.9

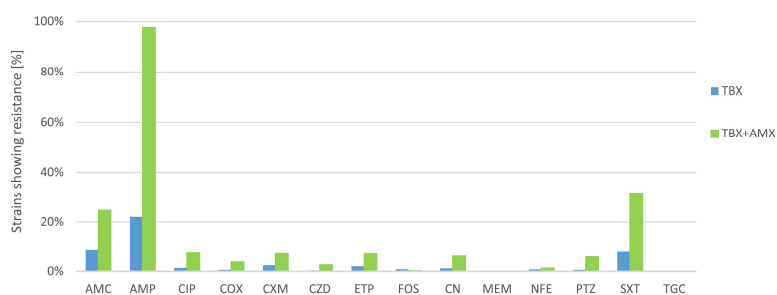
<sup>a</sup> Average *E. coli* absolute abundance.

<sup>b</sup> Standard deviation.

<sup>c</sup> Standard deviation divided by the average of *E. coli* absolute abundance.



**Fig. 2.** *E. coli* absolute abundance measured by sampling station and/or month.



**Fig. 3.** Resistance rates based on antibiotic and culture medium for the 912 *E. coli* isolated strains (AMC: amoxicillin/clavulanic acid, AMP: ampicillin, CIP: ciprofloxacin, COX: cefotaxim, CXM: cefuroxime, CZD: ceftazidim, ETP: ertapenem, FOS: fosfomicin, CN: gentamicin, MEM: meropenem, NFE: nitrofurantoin, PTZ: piperacillin/tazobactam, SXT: sulfamethoxazole/trimethoprim, TGC: tigecyclin).

by antibiotic and culture medium for the 912 isolated strains are presented in Fig. 3. On TBX medium, the highest resistance rates were found against AMP (22.1%), AMC (8.9%) and SXT (8.2%) and the lowest for CZD (0.4%) and TGC (0.2%). 23.8% of the *E. coli* strains were resistant to at least one antibiotic and 6.1% were multi-drug resistant.

### 3.4. Multiple antibiotic resistance (MAR) index

The MAR index was calculated for each of the 54 bathing water samples as well as globally per station and per month. The highest measured MAR index was 0.136 and corresponds to the Pont à Lesse sample from August (Fig. 4). A MAR index greater than 0.2 means that the high risk source of contamination is where antibiotics are frequently used [40]. The highest multi-drug resistant strain (resistant to six antibiotics) isolated in this study came from this sample. Four samples out of the 54 had a null MAR index, i.e. no resistance to the 14 tested antibiotics. These were sampled from the three lakes.

Overall, over the six months of sampling, the Pont à Lesse station showed the highest MAR index (0.063) and the highest percentages of multi-drug resistant strains (14.3%). Then, it was followed by the station of Récréalie for which the MAR index reached 0.056.

The lakes showed the lowest MAR index with 0.009 (Lake of La Marlette) and 0.014 (Lake of Neufchâteau).

Variations in MAR index, and thus antibiotic resistance, within the same station during the bathing season were observed (Fig. 4). The localization effect on the MAR index was slightly significant ( $p < 0.05$ ) due to the lower MAR index values for the lakes of La Marlette. Removing this localization from the statistical analysis led to an absence of significant difference between localizations.

The MAR index of the different stations did not identically vary within the same month. Overall, at the nine bathing stations sampled, the MAR index was highest in April (0.049), followed by August (0.041) and June (0.040). September samples showed the lowest one with a value of 0.026. However, the effect of month was not significant ( $p = 0.47$ ) on it.

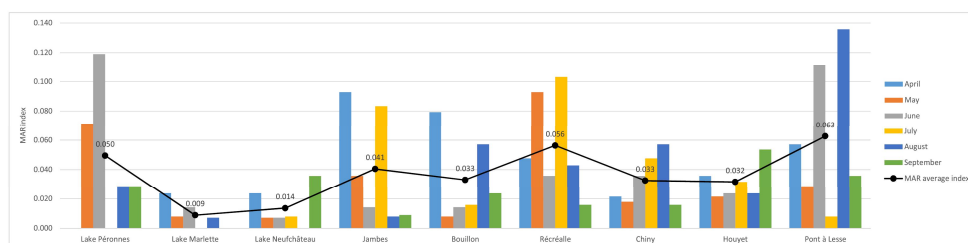
The correlation analysis between the MAR index and the *E. coli* absolute abundance showed no significant correlation ( $p = 0.56$ ) meaning that the *E. coli* absolute abundance was not directly related to the ARB presence.

The Lake of Péronnes had a higher overall MAR index than the other two lakes (0.050). The higher percentages observed in the lake of Péronnes compared to the two other lakes may be partially explained by the lower strain numbers that could be isolated from this sampling point over the entire campaign and from both environments ( $n = 43$  on TBX and  $n = 26$  on TBX + AMX). *E. coli* enumeration and isolation could not be performed in April for this lake.

### 3.5. ESBL-EC prevalence

During this campaign, ESBL-EC were found at every bathing point and in 33% (18/54) of the samples.

The two stations located on the Lesse, at Pont à Lesse and Houyet, were the most affected with 14 ESBL-EC detected. This corresponds to 50% of the strain detections with an ESBL-EC phenotype (28 in total). Only one ESBL-EC strain was found for each lakes



**Fig. 4.** MAR index calculated by sampling station and month and average MAR index by station.

and in Bouillon area. The highest number of ESBL-EC strains was found in July with 13 detections and the lowest in June.

Overall, these ESBL-EC strains represent 3% of the strains isolated during this study (28 out of 912 isolated strains).

3.6. Health exposure risk assessment

There is currently no dose-response model to quantify the risk of infection due to ARB swallowed by humans. Therefore, several scenarios were tested for the AR *E. coli* concentration (Table 2). The fact that ARB are potentially more dangerous than non-resistant bacteria was taken into account by applying the first scenario for the non-AR *E. coli* concentration and combining it with the 4 scenarios tested for the AR *E. coli* concentration.

Pd, Pa, and Poverall obtained are shown in Table 4.

For scenario 1, Pd varied from 0 to  $5.9 \times 10^{-5}$  (men), 0 to  $3.9 \times 10^{-5}$  (women), and 0 to  $8.0 \times 10^{-5}$  (children).

For scenario 2, Pd ranged from 0 to  $6.3 \times 10^{-5}$  (men), 0 to  $4.2 \times 10^{-5}$  (women), and 0 to  $8.6 \times 10^{-5}$  (children).

For scenario 3, Pd ranged from 0 to 0.283 (men), 0 to 0.229 (women), and 0 to 0.328 (children).

For scenario 4, Pd ranged from 0 to  $1.0 \times 10^{-8}$  (men), 0 to  $6.7 \times 10^{-9}$  (women) and 0 to  $1.4 \times 10^{-8}$  (children).

The GI probability for a person during a dip (Formula (9)) calculated from the *E. coli* concentrations measured from the 54 samples

**Table 4A**  
Daily human exposure probabilities (Pd<sub>AR</sub>) calculated based on four scenarios for AR *E. coli*.

	Pd <sub>AR</sub>											
	Scenario 1 <sup>a</sup>			Scenario 2 <sup>b</sup>			Scenario 3 <sup>c</sup>			Scenario 4 <sup>d</sup>		
	Men	Women	Children	Men	Women	Children	Men	Women	Children	Men	Women	Children
Mean	6.2E-06	4.1E-06	8.5E-06	6.6E-06	4.4E-06	9.1E-06	0.047	0.035	0.060	1.1E-09	7.1E-10	1.5E-09
Median	2.4E-06	1.6E-06	3.3E-06	2.6E-06	1.7E-06	3.6E-06	0.025	0.017	0.034	4.2E-10	2.8E-10	5.7E-10
Min	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Max	5.9E-05	3.9E-05	8.0E-05	6.3E-05	4.2E-05	8.6E-05	0.283	0.229	0.328	1.0E-08	6.7E-09	1.4E-08
P 95	2.5E-05	1.7E-05	3.5E-05	2.7E-05	1.8E-05	3.7E-05	0.176	0.133	0.214	4.4E-09	2.9E-09	6.0E-09

**Table 4B**  
Pd<sub>nonAR</sub> calculated based on the scenario 1 for non-AR *E. coli*.

	Pd <sub>nonAR</sub>		
	Scenario 1 <sup>a</sup>		
	Men	Women	Children
Mean	1.9E-05	1.3E-05	2.6E-05
Median	8.4E-06	5.6E-06	1.2E-05
Min	1.1E-07	7.1E-08	1.5E-07
Max	1.2E-04	8.1E-05	1.7E-04
P 95	7.0E-05	4.7E-05	9.6E-05

**Table 4C**  
Overall exposure probabilities (Poverall).

Poverall											
Scenario 1 <sup>a</sup> (AR) + scenario 1 <sup>a</sup> (non-AR)			Scenario 2 <sup>b</sup> (AR) + scenario 1 <sup>a</sup> (non-AR)			Scenario 3 <sup>c</sup> (AR) + scenario 1 <sup>a</sup> (non-AR)			Scenario 4 <sup>d</sup> (AR) + scenario 1 <sup>a</sup> (non-AR)		
Men	Women	Children	Men	Women	Children	Men	Women	Children	Men	Women	Children
2,5E-05	1,7E-05	3,5E-05	2,6E-05	1,7E-05	3,5E-05	0,047	0,035	0,060	1,9E-05	1,3E-05	2,6E-05

**Table 4D**  
Annual overall exposure probabilities (Poverall annual).

Poverall annual											
Scenario 1 <sup>a</sup> (AR) + scenario 1 <sup>a</sup> (non-AR)			Scenario 2 <sup>b</sup> (AR) + scenario 1 <sup>a</sup> (non-AR)			Scenario 3 <sup>c</sup> (AR) + scenario 1 <sup>a</sup> (non-AR)			Scenario 4 <sup>d</sup> (AR) + scenario 1 <sup>a</sup> (non-AR)		
Men	Women	Children	Men	Women	Children	Men	Women	Children	Men	Women	Children
1.8E-04	1.2E-04	2.8E-04	1.8E-04	1.2E-04	2.8E-04	0.238	0.185	0.308	1.3E-04	8.9E-05	2.1E-04

<sup>a</sup> Scenario 1: non-AR *E. coli* D-R model.

<sup>b</sup> Scenario 2: gentamicin-resistant *E. coli* model.

<sup>c</sup> Scenario 3: AR *E. coli* D-R model similar to most infectious/virulent bacteria (*E. coli* O157:H7/Shigella).

<sup>d</sup> Scenario 4: AR *E. coli* D-R model is similar to most persistent bacteria (*Clostridium perfringens*).

followed a normal distribution (mean = 0.0122, SD = 0.0064) meaning that there is more than 1/100 chance of developing a gastrointestinal disorder based on measured *E. coli* levels.

#### 4. Discussion

This study focuses on nine bathing sites in the Walloon Region of Belgium collected monthly for 6 months in 2021. The 2021 bathing season was exceptional in regard to the spring heavy rains and summer huge floods [32]. Fecal indicator concentration and AR tend to increase during precipitations, with greater concentrations occurring at higher rainfall intensity [33,34]. Thus, the *E. coli* levels observed during the 2021 bathing monitoring were three to ten times higher than in 2020 (ISSeP, unpublished data). In the future, the expected consequences of climate change include increased frequency of extreme rainfall, longer periods of drought, and higher stream temperatures, which increase the vulnerability of aquatic environments to bacterial contamination, including ARB [35].

Even if increasing the number of samples would allow a better assessment of the AR *E. coli* prevalence, the results obtained in this study are close to those of other recent studies in the same geographical area. Indeed, in 2019 in Belgium, resistance rates of 26.4% for AMP, 15.9% for AMC and 14.6% for SXT were observed in freshwater and hospital effluents [36]. These were slightly higher than the resistance rates found in this study (AMP (22.1%)-AMC (8.9%)-SXT (8.2%)) but included hospital effluent known for their high rate of MDR *E. coli* [37]. Furthermore, the percentages of AR *E. coli* in the Netherlands were lower during the bathing season than during the winter season [38], which could explain the higher resistance rates measured in 2019 because a sampling campaign was conducted in winter.

The prevalence measured in the Seine River watershed in France were 42% of *E. coli* strains resistant to at least one antibiotic and 35% resistant to at least two antibiotics [39]. These higher resistances in the Seine watershed were probably related to the high population density of the Parisian area. The MAR index measured in the Seine (0.075) is also higher than the average MAR index measured in this study, which suggests the good quality of the water at the bathing stations [41].

Out of the 912 *E. coli* isolated, 28 were identified as ESBL-producer (3% of the isolated strains) and 33% (18/54) of the samples were concerned. This is quite similar to Norway, where a study comparing ESBL-EC from clinical, recreational water and wastewater samples found that 40% (8/20 occasions) of the recreational water samples contained ESBL-EC, representing all sites [9]. Exposure to ESBL-EC through bathing is likely, if recreational waters are located downstream of WWTPs or livestock farms [20]. In England and Wales, 0.12% of the *E. coli* detected in coastal surface waters were resistant to third generation cephalosporins (3GCs). Despite this low prevalence, the authors conclude that there is still an identifiable human exposure risk for recreational water users [4].

The ultimate objective of this work was to be able to estimate the risk incurred by bathers. The potential human health risks caused by exposition to ARB and/or ARGs present in aquatic environment have not yet been completely evaluated because specific information such as dose-response curves and exposure assessment data needed for a quantitative microbial risk assessment (QMRA) are scarce [40–42]. The development of suitable dose-response models for the ingestion of AR vs non AR *E. coli*, specifically by antibiotic or antibiotic class would allow a more accurate risk evaluation for human health.

For the exposure assessment step of the QMRA process, it is necessary to quantify the ARBs or ARGs absorbed by an individual through various routes such as ingestion, inhalation or contact during recreational activities [42]. Although AR bacteria and ARG involved in skin infections are present in recreational waters [43], only the risk of exposure through ingestion was considered in this study.

An estimate of the daily (Pd), annual (Pa) and overall (Poverall) probability of exposure to ARB in Belgian bathing waters was calculated. Based on the measured ARB prevalence and the volume of water potentially swallowed, the ARB dose potentially swallowed by humans was calculated. In order to assess the human health risks, the absolute abundance of ARB present in a particular aquatic sample is essential [44]. Assuming that, the behaviour of Belgians is similar to that of the neighboring Dutch and swallowed volumes were extrapolated from the study by Schets et al. (2011) [30]. However, the frequency and duration of bathing can also be influenced by local factors such as climatic and cultural aspects. Four dose-response model scenarios were tested. Scenario 3, which was recommended by Tyagi and Kumar (2021) because it currently represents the fittest model for AR *E. coli*, given the lack of epidemiological/experimentally observed data, was the most severe one. With this scenario, the overall probability of exposure (Poverall) was on average 0.047 for men, 0.035 for women and 0.060 for children. Taking into account the annual bathing frequency (Table 1), Poverall annual increased to 0.238 for men, 0.185 for women and 0.308 for children. The scenario therefore strongly influenced the results. The probabilities (Pd, Pa) obtained with the other 3 scenarios were lower (scenario 2 > scenario 1 > scenario 4) (Table 4). Conversely, the probabilities obtained by Tyagi and Kumar (2021) based on literature data coming mainly from developing countries were high (99th percentile ~ 1 for the 4 scenarios). This is due to the low ARB prevalence found in Belgium compared to other developing countries.

In central Italy, human exposure to AR *E. coli* by recreational activities performed in bathing sites located in close proximity to WWTPs were predicted to be between 0.45 and 345.09 CFU/100 ml [21]. Therefore, even though information on the exact quantity of ARB necessary to colonize or infect the humans is not available, it will be reasonable to assume that an extremely low dose of ARB can pose human health risks [42].

#### 5. Conclusions

This study shows, for the first time in Belgium, that an antibiotic resistance monitoring within freshwaters seems important in terms of public health.

The exposure risk of bathers currently appears to be limited in recreational waters in Belgium. However, it is important to maintain

global efforts to control antibiotic resistance. Indeed, ESBL-EC have been found in good classified bathing areas and the MAR index fluctuates strongly between samples independently of the *E. coli* absolute abundance.

In application of the precautionary principle, the non-detection of a given ARB and ARG, based on state-of-the-art methodologies, cannot be interpreted as an absence of risk. Due to the large number of ARB, ARGs and antibiotics present in aquatics environments, quantification of each bacteria, gene or antibiotic concentration is time, cost and labor intensive. A solution would be to choose a panel of commonly accepted indicators, such as ESBL-EC but other approaches such as metagenomics could also be envisaged as monitoring tool in a near future.

#### Author contribution statement

Leslie Crettels: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Léa Champon: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Damien Thiry: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Nadine Burlion: Conceived and designed the experiments.

Elisa Delrée: Performed the experiments.

Claude Saegerman: Contributed reagents, materials, analysis tools or data; analyzed and interpreted the data.

#### Data availability statement

The authors do not have permission to share data.

#### Additional information

No additional information is available for this paper.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

Leslie Crettels reports financial support was provided by Walloon Public Service (SPW), "Antibiobug 2 " project, ENVIeS plan (Action I-4-4).

#### References

- [1] WHO, Ten Threats to Global Health in 2019, 2019. Geneva, Switzerland, <https://www.who.int/vietnam/news/feature-stories/detail/ten-threats-to-global-health-in-2019>.
- [2] A. White, J.M. Hughes, Critical importance of a one health approach to antimicrobial resistance, *EcoHealth* 16 (2019) 404–409, <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01415-5>.
- [3] T.U. Berendonk, C.M. Manaia, C. Merlin, D. Fatta-Kassinos, E. Cytryn, F. Walsh, H. Bürgmann, H. Sørsum, M. Norström, M.-N. Pons, N. Kreuzinger, P. Huovinen, S. Stefani, T. Schwartz, V. Kisand, F. Baquero, J.L. Martinez, Tackling antibiotic resistance: the environmental framework, *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (2015) 310–317, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>.
- [4] A.F.C. Leonard, L. Zhang, A.J. Balfour, R. Garside, W.H. Gaze, Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters, *Environ. Int.* 82 (2015) 92–100, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.02.013>.
- [5] I. Herrig, S. Fleischmann, J. Regnery, J. Wesp, G. Reifferscheid, W. Manz, Prevalence and seasonal dynamics of *bla*CTX-M antibiotic resistance genes and fecal indicator organisms in the lower Lahn River, Germany, *PLoS One* 15 (2020), e0232289, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232289>.
- [6] N. Hassoun-Kheir, Y. Stabholz, J.-U. Kreft, R. de la Cruz, J.L. Romalde, J. Nesme, S.J. Sørensen, B.F. Smets, D. Graham, M. Paul, Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: a systematic review, *Sci. Total Environ.* 743 (2020), 140804, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140804>.
- [7] H. Blaak, G. Lynch, R. Italiaander, R.A. Hamidjaja, F.M. Schets, A.M. de Roda Husman, Multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch surface water and wastewater, *PLoS One* 10 (2015), e0127752, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127752>.
- [8] L.J. Reynolds, L. Sala-Comorera, N.A. Martin, T.M. Nolan, J.H. Stephens, A. Gitto, G.M.P. O'Hare, J.J. O'Sullivan, W.G. Meijer, Correlation between antimicrobial resistance and faecal contamination in small urban streams and bathing waters, *Sci. Total Environ.* 739 (2020), 140242, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140242>.
- [9] S.B. Jørgensen, A.V. Soraas, L.S. Arnesen, T.M. Leegaard, A. Sundsfjord, P.A. Jenum, A comparison of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* from clinical, recreational water and wastewater samples associated in time and location, *PLoS One* 12 (2017), e0186576, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186576>.
- [10] B.M. Mahon, C. Brehony, E. McGrath, J. Killeen, M. Cormican, P. Hickey, S. Keane, B. Hanahoe, A. Dolan, D. Morris, Indistinguishable NDM-producing *Escherichia coli* isolated from recreational waters, sewage, and a clinical specimen in Ireland, 2016 to 2017, *Euro Surveill.* 22 (2017), <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.15.30513>.
- [11] M.L. Farrell, A. Joyce, S. Duane, K. Fitzhenry, B. Hooban, L.P. Burke, D. Morris, Evaluating the potential for exposure to organisms of public health concern in naturally occurring bathing waters in Europe: a scoping review, *Water Res.* 206 (2021), 117711, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117711>.



- [12] A.F.C. Leonard, L. Zhang, A.J. Balfour, R. Garside, P.M. Hawkey, A.K. Murray, O.C. Ukoumunne, W.H. Gaze, Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey), *Environ. Int.* 114 (2018) 326–333, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.003>.
- [13] A. Soraas, A. Sundsfjord, I. Sandven, C. Brunborg, P.A. Jenum, Risk factors for community-acquired urinary tract infections caused by ESBL-producing Enterobacteriaceae – a case-control study in a low prevalence country, *PLoS One* 8 (2013), e69581, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069581>.
- [14] K. Kennedy, P. Collignon, Colonisation with *Escherichia coli* resistant to “critically important” antibiotics: a high risk for international travellers, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29 (2010) 1501–1506, <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1031-y>.
- [15] D.P. Blake, K. Hillman, D.R. Fenlon, J.C. Low, Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions, *J. Appl. Microbiol.* 95 (2003) 428–436, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01988.x>.
- [16] J.F. Griffith, S.B. Weisberg, B.F. Arnold, Y. Cao, K.C. Schiff, J.M. Colford, Epidemiologic evaluation of multiple alternate microbial water quality monitoring indicators at three California beaches, *Water Res.* 94 (2016) 371–381, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.036>.
- [17] M. Döhla, E. Sib, B. Dericks, S. Grobe, K. Behringer, M. Frechen, K. Simon, H. Färber, F. Lenz, M. Parcina, D. Skutlarek, A. Voigt, C. Felder, M. Exner, R. M. Schmithausen, Assessment of the prevalence of antibiotic-resistant bacteria and the concentration of antibiotics in EU bathing waters in western Germany, *Expo Health* 12 (2020) 323–334, <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00313-z>.
- [18] A. Di Cesare, E.M. Eckert, A. Teruggi, D. Fontaneto, R. Bertoni, C. Callieri, G. Corno, Constitutive presence of antibiotic resistance genes within the bacterial community of a large subalpine lake, *Mol. Ecol.* 24 (2015) 3888–3900, <https://doi.org/10.1111/mec.13293>.
- [19] B. Hooban, K. Fitzhenry, N. Cahill, A. Joyce, L. O’ Connor, J.E. Bray, S. Brisse, V. Passet, R. Abbas Syed, M. Cormican, D. Morris, A point prevalence survey of antibiotic resistance in the Irish environment, 2018–2019, *Environ. Int.* 152 (2021), 106466, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106466>.
- [20] J.F. Schijven, H. Blaak, F.M. Schets, A.M. de Roda Husman, Fate of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from faecal sources in surface water and probability of human exposure through swimming, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 11825–11833, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01888>.
- [21] E. O’Flaherty, A. Solimini, F. Pantanella, E. Cummins, The potential human exposure to antibiotic resistant *Escherichia coli* through recreational water, *Sci. Total Environ.* 650 (2019) 786–795, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.018>.
- [22] S.P. Nappier, K. Liguori, A.M. Ichida, J.R. Stewart, K.R. Jones, Antibiotic resistance in recreational waters: state of the science, *IJERPH* 17 (2020) 8034, <https://doi.org/10.3390/ijerph17218034>.
- [23] P.M.C. Huijbers, C.-F. Flach, D.G.J. Larsson, A conceptual framework for the environmental surveillance of antibiotics and antibiotic resistance, *Environ. Int.* 130 (2019), 104880, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.074>.
- [24] M. Mortimer, A. Winchell, P.A. Holden, Evaluation of frameworks proposed as protective of antimicrobial resistance propagation in the environment, *Environ. Int.* 144 (2020), 106053, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106053>.
- [25] M. Jampani, R. Gothwal, J. Mateo-Sagasta, S. Langan, Water quality modelling framework for evaluating antibiotic resistance in aquatic environments, *J. Hazard. Mater. Lett.* 3 (2022), 100056, <https://doi.org/10.1016/j.hazl.2022.100056>.
- [26] N. Tyagi, A. Kumar, Evaluation of recreational risks due to exposure of antibiotic-resistance bacteria from environmental water: a proposed framework, *J. Environ. Manag.* 279 (2021), 111626, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.11.1626>.
- [27] L.J. Bessa, A. Barbosa-Vasconcelos, A. Mendes, P. Vaz-Pires, P. Martins da Costa, High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in river water, upstream and downstream of a wastewater treatment plant, *J. Water Health* 12 (2014) 426–435, <https://doi.org/10.2166/wh.2014.160>.
- [28] E. Matuschek, D.F.J. Brown, G. Kahlmeter, Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories, *Clin. Microbiol. Infection* 20 (2014) O255–O266, <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>.
- [29] P.H. Krumperman, Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foodst, *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (1983) 6.
- [30] F.M. Schets, J.F. Schijven, A.M. de Roda Husman, Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools, *Water Res.* 45 (2011) 2392–2400, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.01.025>.
- [31] U.S. Environmental Protection Agency, *Bacteriological Ambient Water Quality Criteria for Marine and Fresh Recreational Waters - 1986*, 1986. U.S.
- [32] W. Cornwall, Europe’s deadly floods leave scientists stunned, *Science* 373 (2021) 372–373, <https://doi.org/10.1126/science.373.6553.372>.
- [33] K.H. Cho, S.M. Cha, J.-H. Kang, S.W. Lee, Y. Park, J.-W. Kim, J.H. Kim, Meteorological effects on the levels of fecal indicator bacteria in an urban stream: a modeling approach, *Water Res.* 44 (2010) 2189–2202, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.051>.
- [34] L. Kubera, Spread patterns of antibiotic resistance in faecal indicator bacteria contaminating an urbanized section of the brda river, *Microb. Ecol.* 81 (2021) 592–600, <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01624-4>.
- [35] Anses, *Antibiorésistance et environnement. État et causes possibles de la contamination des milieux en France par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques*, 2020. *Avis de l’Anses. Rapport d’expertise collective*.
- [36] L. Crettels, N. Burlion, R. Breyer, J. Mainil, P. Servais, J. Korfer, D. Thiry, Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from freshwaters and hospital effluents in Belgium, *Lett. Appl. Microbiol.* 74 (2022) 411–418, <https://doi.org/10.1111/lam.13625>.
- [37] C.-M. Gaspar, L.T. Csiszter, C.F. Lázárescu, I. Țibru, M. Pentea, M. Butnariu, Antibiotic resistance among *Escherichia coli* isolates from hospital wastewater compared to community wastewater, *Water* 13 (2021) 3449, <https://doi.org/10.3390/w13233449>.
- [38] H. Blaak, S.R. van Rooijen, M.S. Schuijt, A.E. Docters van Leeuwen, R. Italiaander, H.H.J.L. van den Berg, F. Lodder-Verschoor, F.M. Schets, A.M. de Roda Husman, *Prevalence of Antibiotic Resistant Bacteria in the Rivers Meuse, Rhine, and New Meuse*, National Institute for Public Health and the Environment. Ministry of Health, Welfare and Sport, 2011.
- [39] J. Passerat, F. Tamtam, B. Le Bot, J. Eurin, M. Chevreuil, P. Servais, Rejets hospitaliers d’antibiotiques et de bactéries fécales antibiorésistantes dans les rivières du bassin de la Seine, *Eur. J. Water Qual.* 41 (2010) 1–13, <https://doi.org/10.1051/water/2010004>.
- [40] R. Davis, P.D. Brown, Multiple Antibiotic Resistance Index, Fitness and Virulence Potential in Respiratory *Pseudomonas aeruginosa* from Jamaica, *Microbiology Society*, 2016, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000229> (accessed April 14, 2023).
- [41] P. Servais, J. Passerat, Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France), *Sci. Total Environ.* 408 (2009) 365–372, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.09.042>.
- [42] C.M. Manaia, Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk, *Trends Microbiol.* 25 (2017) 173–181, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.014>.
- [43] T.M. Santiago-Rodriguez, J.I. Rivera, M. Coradin, G.A. Toranzos, Antibiotic-resistance and virulence genes in *Enterococcus* isolated from tropical recreational waters, *J. Water Health* 11 (2013) 387–396, <https://doi.org/10.2166/wh.2013.005>.
- [44] M. Amarasiri, D. Sano, S. Suzuki, Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: current knowledge and questions to be answered, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 50 (2020) 2016–2059, <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1692611>.

---

## Section expérimentale

### Etude 3:

Exploring the Presence, Genomic Traits, and Pathogenic Potential of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase *Escherichia coli* in Freshwater, Wastewater, and Hospital Effluents

---

<i>Under Review</i>
---------------------

L. Crettels, N. Burlion, A. Habets, B. Taminau, G. Daube, E. Delrée, A-F. Mouchette, D. Thiry

## Préambule

La résistance aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines est problématique car il s'agit de la plus large famille d'antibiotiques qui représente 2/3 des antibiotiques consommés en Belgique (Meeus et al., 2024). Cette étude concerne l'évaluation de la prévalence d'*E. coli* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (EcBLSE) dans les cours d'eaux wallons et leur caractérisation.

Vingt quatre stations ont été prélevées le long du bassin hydrographique de l'Ourthe. Ces prélèvements comprenaient des eaux de surface, des prélèvements en entrée/sortie de station d'épuration et des effluents hospitaliers (voir Annexe 2). Deux campagnes de prélèvement ont été prévues à des saisons différentes (hiver et été) en janvier et août 2021 afin de sélectionner des souches potentiellement distinctes.

Au total, 644 souches d'*E. coli* ont été isolées. Ces souches ont été caractérisées par des tests phénotypiques (antibiogramme), génotypiques (gènes *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> et *bla*<sub>CTX-M-9</sub>) et un panel de souches (n=40) a été choisi pour être séquencé (WGS) afin de connaître leur résistome.

Des gènes appartenant aux groupes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> et *CTX-M-9* ont été détectés respectivement dans 73,6 % et 14,9 % des souches isolées. Aucun gène du groupe *bla*<sub>CTX-M-2</sub> n'a été trouvé.

Lors du séquençage génomique du panel de souches (n=40), le sérotype O18:H7 d'*E. coli* avec le type séquentiel ST1463 était prédominant (n=14). Ces *E. coli* O18:H7 ST1463 possédaient toutes le gène *bla*<sub>KPC-3</sub> ainsi que les facteurs de virulence *fyuA*, *gad*, *irp2*, *terC* et *lpfA*. Une analyse SNP a démontré qu'il pourrait s'agir d'un clone. Plusieurs clones ont été isolés de l'effluent hospitalier de l'hôpital A et de l'entrée/sortie de la STEP qui reçoit cet effluent, démontrant que les effluents hospitaliers sont une source de contamination de l'environnement aquatique.

Les gènes de  $\beta$ -lactamase identifiés étaient *bla*<sub>CTX-M</sub> (n=21), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> étant le plus représenté (n=15) ainsi que *bla*<sub>TEM</sub> (n=11), *bla*<sub>OXA</sub> (n=7) et *bla*<sub>SHV</sub> (n=9). L'une des préoccupations majeures est le grand nombre de souches contenant des gènes de carbapénémase - *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=19), *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=2) et *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=2) - même dans les eaux de surface.

La pathogénicité de trois souches séquencées (souches Q22, N8 et K9) a été évaluée *in vivo* dans le modèle *Galleria mellonella*. La souche N8, de sérotype O18:H7 ST1463, était pathogène à partir de la dose injectée de 10<sup>6</sup> UFC tandis que les souches Q22 (O25:H4 ST131) et K9 (O86:H2 ST349) l'étaient à partir de 10<sup>5</sup> UFC.

## Exploring the Presence, Genomic Traits, and Pathogenic Potential of Extended Spectrum $\beta$ -lactamase *Escherichia coli* in Freshwater, Wastewater, and Hospital Effluents

L. Crettels<sup>1,2\*</sup>, N. Burlion<sup>1</sup>, A. Habets<sup>2</sup>, B. Taminiou<sup>3</sup>, G. Daube<sup>3</sup>, E. Delrée<sup>1</sup>, A-F. Mouchette<sup>1</sup>, D. Thiry<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Scientific Institute of Public Service (ISSeP), Liège, Belgium

<sup>2</sup>Veterinary bacteriology and bacterial animal diseases, Department of Parasitic and Infectious Diseases, Fundamental and Applied Research for Animals and Health Centre (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium

<sup>3</sup>Department of Food Sciences-Microbiology, Fundamental and Applied Research for Animals and Health Centre (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium

### RUNNING TITLE

Extended spectrum  $\beta$ -lactamase *Escherichia coli*

### Correspondence

Leslie Crettels, Department of Microbiology, ISSeP, Scientific Institute of Public Service, Rue du Chéra 200, 4000 Liège, Belgium Email: l.crettels@issep.be

### Abstract

**Aims;** The purpose of this work was to study extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* (ESBL-EC) in freshwaters, hospital effluents and wastewaters during two sampling campaigns in 2021.

**Methods and Results;** Water sampling was performed in 24 stations of the Ourthe watershed in Belgium. A total of 644 ESBL (n=642) and AmpC (n=2) *E. coli* strains were isolated. Disk-diffusion assays were performed following the EUCAST's recommendations. All strains were tested for the presence of *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> and *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene's group by PCR. Genes belonging to *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *bla*<sub>CTX-M-9</sub> groups were detected respectively in 73.6% and 14.9% of the strains. No *bla*<sub>CTX-M-2</sub> group's gene was found. A subset of strains (n=40) was selected for whole genome sequencing. *E. coli* serotype O18:H7 ST 1463 was predominant (n=14) in the sequenced strains and showed pathogenicity in the *Galleria mellonella* larvae model.  $\beta$ -lactamase genes identified were *bla*<sub>CTX-M</sub> (n=21), with *bla*<sub>CTX-M-15</sub> mostly represented (n=15), as well as *bla*<sub>TEM</sub> (n=11), *bla*<sub>OXA</sub> (n=7) and *bla*<sub>SHV</sub> (n=9) and carbapenemase

(CP) genes were observed in several strains - *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=19), *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=2) and *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=2) - even from freshwaters.

**Conclusions;** ESBL-EC are widely distributed in the aquatic environment in Belgium and contain a variety of ESBL and CP genes.

**Significance and Impact of Study:** This study highlights the role of hospital effluents and WWTPs in the dissemination of antimicrobial resistance through the dissemination of several ESBL clones in the environment.

## KEYWORDS

*Escherichia coli*, antimicrobial resistance, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, carbapenemase, *Galleria mellonella*, freshwaters.

## Introduction

The World Health Organization (WHO) lists antimicrobial resistance (AMR) as one of the top ten threats to global health (WHO, 2019a). Without intervention, AMR could cause 10 million deaths each year by 2050 and force up to 24 million people into extreme poverty by 2030 (WHO, 2019b).

Fighting against AMR implies a “One Health” approach with an integrated and holistic multisectoral collaboration in particular, the need for better integration of environmental, aquatic and wildlife issues into current approaches (White & Hughes, 2019).

*Escherichia coli*, an intestinal bacterium of human and warm-blooded animals, is used as fecal contamination indicator of aquatic systems and foodstuffs (Ghaderpour *et al.*, 2015). The release of antimicrobial resistant (AR) *E. coli* into the environment from anthropogenic sources, as well as the overuse of antibiotics in human or veterinary medicine and agriculture, are driving AMR (Berendonk *et al.*, 2015). AR *E. coli* can, among others, enter aquatic systems through discharge from hospital or municipal wastewaters and from intensive livestock production facilities (Pruden *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2013).

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) are one of the most important and widely spread mechanism of resistance among *E. coli* (Lenart-Boroń, Kulik & Jelonkiewicz, 2020) and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases- *E. coli* (ESBL-EC) have been declared by the WHO as a key indicator for the surveillance of AMR worldwide (WHO, 2021). Since the ESBLs were firstly reported in 1979 (Sanders & Sanders, 1979) and the first carbapenemase in 1993 (Naas & Nordmann, 1994), the prevalence of ESBL-

producing bacteria have been frequently detected worldwide from clinical strains due to the increasing use of  $\beta$ -lactam antibiotics. The mortality, length of hospital stays, and hospital costs associated with infections due to ESBL-producing *Enterobacteriaceae* were generally higher compared to those with non-ESBL infections, as ESBL-producing bacteria often cause more severe infections and require more complex treatments (Zhen *et al.*, 2019; Shamsrizi *et al.*, 2020). They are therefore responsible of a serious global health issue.

ESBLs are mostly plasmid-encoded which facilitate horizontal gene transfer between bacterial groups (Reinthaler *et al.*, 2010). They hydrolyze  $\beta$ -lactam antibiotics resulting in resistance to penicillins, cephalosporins and aztreonam. In many European countries, CTX-M-type enzymes are the predominant ESBLs and replaced TEM and SHV mutants, with *E. coli* joining *K. pneumoniae* as a major host, increasingly isolated from community patients (Livermore *et al.*, 2006). ESBL of the CTX-M-15 type has increased over time in most countries and is now dominant in most regions except for Asia where gene's group 9 (especially CTX-M-14) are dominant, and South America where *bla*<sub>CTX-M-2</sub> is still significant (Bevan, Jones & Hawkey, 2017).

Aquatic environments, in particular, have attracted attention as a hotspot for the accumulation, emergence and dissemination of clinically important AMR, including ESBLs. The freshwaters, including rivers and lakes, are constantly influenced by anthropogenic activities, including the discharge of wastewater treatment plants (WWTPs) that reduce the bacterial concentration in water, but not appreciably reduce the proportion of AR bacteria (Blaak *et al.*, 2015) and pollute receiving waters with high levels of faecal indicator bacteria including *E. coli* and antimicrobial resistance genes (ARGs) (Reynolds *et al.*, 2020). This not only increases the background level of ESBLs in the aquatic environment, but also provides an ideal setting for the horizontal exchange of ESBL genes with other pathogenic or indigenous bacteria present in the water. The impact on human health of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* present in aquatic environments is considerable, and it is therefore important to understand the role of aquatic environments as reservoirs and transmission routes for ESBL-producing *Enterobacteriaceae* to humans (Cho, Jackson & Frye, 2023).

Bathing waters are also risk areas for humans, exposure to ESBL-EC by swimming is likely, if recreational waters are located downstream of WWTPs or livestock farms (Schijven *et al.*, 2015). In Belgium, ESBL-EC, found in nine bathing areas, represent 3% of the isolated *E. coli* strains (Crettels *et al.*, 2023).

Despite the high levels of virulence present in many ESBL-EC, however, few studies have comprehensively assessed the pathogenicity of ESBL-EC. In order to study the pathogenicity of some ESBL-EC strains and speculate on their origin, the *Galleria mellonella* larvae model was used. This

invertebrate model enables large-scale studies due to its short life cycle, constituting a preliminary model to the use of vertebrate animals such as mice or rats, for which there are ethical, budgetary and logistical obstacles (Rossoni *et al.*, 2019). These larvae are used as model organisms to study many human pathogens, including bacteria, fungi and protozoa (Chen *et al.*, 2016). Zhao *et al.* (2022) tested the pathogenicity of ESBL-EC isolated from ovine origin to investigate the presence of virulence genes and to assess their pathogenicity and zoonotic potential. They found ESBLs-producing *E. coli* isolates with numerous virulence-related genes were able to cause multiple infectious diseases in animal models (mice, neonatal rats and *Galleria mellonella*).

The aims of this study were therefore: (i) to assess the ESBL-EC prevalence in freshwaters in Belgium, (ii) to assess the role of hospital effluents and WWTPs on the AMR dissemination, (iii) to characterize the ESBL-EC genes by PCR and whole genome sequencing, (iv) to assess the genetic heterogeneity among and within the populations of isolated *E. coli* and (v) to assess the pathogenicity of a selection of ESBL-EC in the *Galleria mellonella* larvae model.

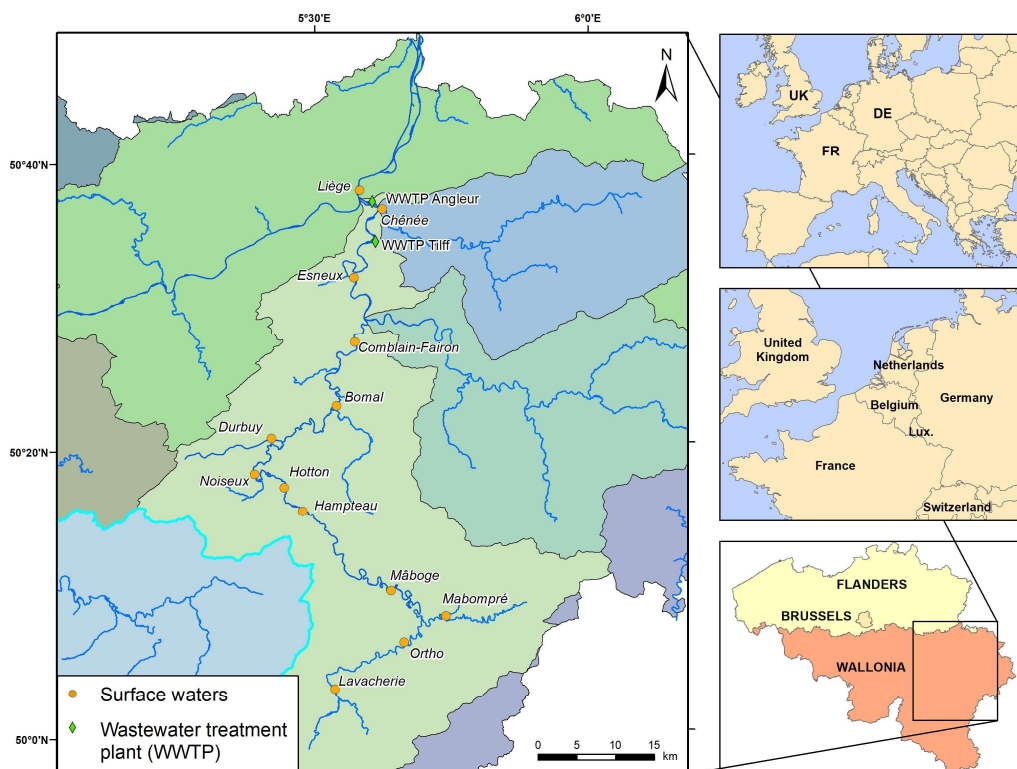
## Material and methods

### Water sampling

In this study, ESBL-EC were studied in the Ourthe river but also in a continuum hospital-WWTP-freshwater, allowing to directly observe the bacterial dispersion and the main sources of contamination. The Ourthe river flows for 180 kilometers in Southeast Belgium to the Meuse river. Its sources are located in a rural and forest area and then it is submitted to demographic pressure and urbanization. In the Ourthe watershed, 24 sampling stations were sampled including 13 freshwaters, two hospital effluents, one mixed effluent from a veterinary faculty and surrounding facilities wastewaters and the input/output and upstream/downstream of two WWTPs that each receive hospital effluents (Figure 1). Effluents from hospital A are discharged into the WWTP's Tilff and effluents from hospital B into the WWTP's Angleur.

Two sampling campaigns were performed in January (1<sup>st</sup> campaign) and August 2021 (2<sup>nd</sup> campaign) to assess the seasonal effect, linked to antibiotic use and climatic variations, on the presence of ESBL-EC. In July 2021, there were major floods in Belgium, which led to the non-operation of the WWTPs in the Ourthe and Vesdre watersheds (Cornwall, 2021). Sampling at the input/output of Tilff and Angleur WWTPs (sampling stations with the code N, O, R, S) could only be carried out in August 2022 instead of August 2021 when the WWTPs were no longer damaged.

Water samples were collected in 1-L sterile polyethylene bottles without any preservative, transported at 4°C, stored at 5±3°C and analyzed within 24 h.



**Figure 1:** Wastewater and surface water sampling stations in the Ourthe watershed (for confidentiality, hospitals and the veterinary faculty are not shown on the map)

### ***E. coli* and ESBL-EC enumeration**

From each sample, different volumes (range from 1 to 500 ml) and 10-fold dilutions of untreated water were membrane filtered through 0.45- $\mu\text{m}$  pore size filters (Millipore Corporation, USA) which were placed on Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) for *E. coli* enumeration and on Brilliance ESBL agar (Oxoid, Basingstoke, UK) for ESBL-EC enumeration. The Petri dishes were incubated overnight at 37°C to select the optimal two dilutions for Colony Forming Unit (CFU) counts, according to ISO 8199:2018 (International Organization for Standardization, Switzerland). All the ESBL-EC from a selected dilution were picked up from Brilliance ESBL agar and re-spread on Brilliance ESBL agar to check the purity. Tryptophanase activity tests with Kovac's reagent were applied to confirm the species of presumptive ESBL-EC strains. Only indole-positive strains were considered for further analysis and stored at -80°C. A code was given to each isolate: the letter indicates the sampling point (Table 1) and the number indicates the isolate number.



## Antimicrobial Susceptibility Testing

A susceptibility test was performed on all the strains on Mueller-Hinton (MH) agar (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) using the disk diffusion assay and plates were incubated for  $18 \pm 2$  h at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  according to the European Committee on Antimicrobials (EUCAST, 2020) (Matuschek, Brown & Kahlmeter, 2014). The inhibition diameters were measured using the Adagio system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and compared with the clinical breakpoints 2020 V.10.0 provided by EUCAST to determine whether a strain is sensitive or resistant to a given antibiotic. Resistance rates to determine the proportion of resistant strains in relation to the wild population were also calculated using the ECOFFs given by EUCAST for *E. coli* (consulted on 29/07/2022). *E. coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, US) was included in each assay as negative control and *K. pneumoniae* ATCC 700603 as ESBL-producer positive control.

The antimicrobial disks (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) were placed on MH agar with automatic disk dispenser (16-disks per plate) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

A total of 16 antibiotics were tested : ampicillin (AMP, 10  $\mu\text{g}$ ), amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10  $\mu\text{g}$ ), azithromycin (AZM, 15  $\mu\text{g}$ ), cefepime (FEP, 30  $\mu\text{g}$ ), cefotaxim (COX, 5  $\mu\text{g}$ ), cefotaxim/clavulanic acid (CCO, 5/10  $\mu\text{g}$ ), ceftazidim (CZD, 10  $\mu\text{g}$ ), ceftazidim/clavulanic acid (CCZ, 10/10  $\mu\text{g}$ ), cefuroxime (CXM, 30  $\mu\text{g}$ ), ceftazidim (CZD, 10  $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacin (CIP, 5  $\mu\text{g}$ ), colistin (COL, 10  $\mu\text{g}$ ), ertapenem (ETP, 10  $\mu\text{g}$ ), meropenem (MEM, 10  $\mu\text{g}$ ), piperacillin/tazobactam (PTZ, 30/6  $\mu\text{g}$ ), temocillin (TEM, 30  $\mu\text{g}$ ).

Of these 16 antibiotics, cephalosporin discs without (COX, CZD) and with clavulanic acid (CCO, CCZ) were used for phenotypic confirmation of ESBL production by the double disk synergy test according to the EUCAST technical guide (EUCAST, 2017). The resistance rate is determined as the ratio between the number of strains resistant to an antibiotic and the total number of strains tested by antibiogram. Multidrug resistance is defined as resistance to at least one agent from at least 3 antimicrobial classes (Magiorakos *et al.*, 2012).

## ESBL genotyping

All the strains were tested for the presence of *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> and *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene's group with specific primer (Table 2). Total DNA was extracted by the boiling method (Dashti *et al.*, 2009). PCR were then performed on 1  $\mu\text{l}$  of DNA extract mixed with 20 pmol of each primer and 12.5  $\mu\text{l}$  Fastgene 2x (Nippon Genetics, Filter service, Eupen, Belgium) in a final volume of 25  $\mu\text{l}$  on a CFX96 thermocycler (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) with the following protocol: initial denaturation

at 94°C for 10 min, followed by 30 cycles of denaturation for 30 s, annealing for 35s at 62,5°C, extension at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 9 min. PCR-products were visualized by UV light after electrophoresis at 100V for 55 min in 1xTAE, 1,5% agarose gel.

### Whole-genome analysis

Based on the susceptibility tests (highest number of antibiotic resistances) and the PCR results as well as their origin (diversity of sampling points), 40 *E. coli* strains (20 from the 1<sup>st</sup> and 20 from the 2<sup>nd</sup> campaign) were confirmed by API 20E and selected for whole genome sequencing.

Total DNA extraction was performed on a single colony using the Dneasy® Blood & Tissue kit (Qiagen, Venlo, Netherlands).

The sequencing libraries were prepared using the Nextera XT library preparation kit (Illumina). Sequencing was carried out using the Illumina MiSeq platform to generate 300 bp paired-end reads by the GIGA Institute (ULiège). Raw read sequences obtained in this study were deposited to GenBank/SRA under the BioProject PRJNA1012687.

Assembly of the Illumina sequence reads was performed using the SPAdes (v3.13.0) assembler. The assembled *E. coli* genomes were uploaded to the *Escherichia* database on PubMLST to confirm the species (<https://pubmlst.org/organisms/escherichia-spp/>). Bioinformatic analysis were carried out using the Center for Genomic Epidemiology (CGE) pipelines (Serotype Finder v2.0, MLST v2.0, cgMLST Finder v1.2, VirulenceFinder v2.0, ResFinder v4.1, MobileElement Finder v1.0.3, PathogenFinder 1.1). PATRIC and CARD (<https://www.bv-brc.org/>) were also used to compare the results obtained.

The CGE pipelines were used to identify acquired antibiotic resistance genes as well as *E. coli* virulence genes.

### Phylogenetic tree

The phylogenetic relationships of the sequenced *E. coli* strains were investigated, the concatenated sequences of 7 housekeeping genes (*adk*, *fumC*, *icd*, *gyrB*, *mdh*, *purA*, *recA*) were aligned with the sequences of the related reference genes in GenBank (Fakih *et al.*, 2017) with a length of 3424 nucleotides using Muscle in MEGA11 software. Phylogenetic relationships of all sequences were analyzed with MEGA11 software using Maximum Likelihood based on Tamura-Nei model (Tamura *et al.*, 2013). The statistical confidence of the tree was set by bootstrapping 1000 replicates.

A SNP analysis was performed with *Escherichia/Shigella* Enterobase V 1.1.5 (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) (Zhou *et al.*, 2020). Briefly, the Enterobase RefMasker identify in the assembly unwanted DNA region (i.e. tandem repeat, CRISPR regions, dispersed repeat). The Enterobase RefMapper align the rest of the assembly regions to the Reference Assembly and compute a single SNP matrix. A final maximum likelihood tree using RAxML is generated.

### ***Galleria mellonella* larvae infection assays**

The pathogenicity of three sequenced strains (Q22 and N8, K9 strains isolated from the first and second campaigns respectively) was assessed in *G. mellonella* larvae (Nusect, Deerlijk, Belgium). Randomly chosen *G. mellonella* larvae (n= 2x10 per group) were inoculated by injecting 10 µl of bacteria at 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> CFU/10µl into the last proleg with an automatic injector (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA). Injections were performed using BD Plastipak™ 1 mL sterile syringes (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and sterile 30-gauge needles (Terumo corporation, Tokyo, Japan). Equal volumes of PBS served as a negative control.

Post inoculation, the larvae were put into an incubator in the dark at 37°C, and survival were monitored daily for 4 days. Kaplan-Meier survival curves were drawn using Prism software and log-rank tests were performed to highlight any significant difference in survival rates between the groups (p-value ≤ 0.05).

### **Statistical analysis**

Chi-square tests were performed to compare the resistance rates per antibiotic during the two campaigns and to compare the resistance rates per antibiotic between origins with the procedure freq of SAS software 9.4 program (SAS Institute, Cary, NC). A p-value < 0.05 was defined as a statistically significant difference between the resistance rates.

## **Results**

### ***E. coli* and ESBL-EC prevalence**

*E. coli* concentrations in freshwaters ranged from 2.8x10<sup>2</sup> (Hampteau) to 1.5x10<sup>4</sup> (Durbuy, Angleur downstream) (CFU) x (100 ml)<sup>-1</sup> while ESBL-EC concentrations ranged from 2.0x10<sup>0</sup> (Hampteau, Hotton) to 2.4x10<sup>2</sup> (Liège) (CFU) x (100 ml)<sup>-1</sup> for the two sampling campaigns (Table 1). In freshwaters, the average concentrations of *E. coli* were 4.5 x10<sup>3</sup>(CFU) x (100 ml)<sup>-1</sup> and 6.1 x10<sup>1</sup>(CFU) x (100 ml)<sup>-1</sup> for ESBL-EC. In freshwaters, the proportion of ESBL-EC compared to the total number of *E. coli* per sampling point varied from 0.3 (Durbuy) to 4.7% (Lavacherie, Tilff downstream) and was 1.4% in

average. In the hospital effluents, the *E. coli* concentrations have reached (maximum)  $4.0 \times 10^6$  (CFU)  $\times$  (100 ml)<sup>-1</sup> (Hospital B) and  $1.1 \times 10^5$  (CFU)  $\times$  (100 ml)<sup>-1</sup> (Hospital A) for ESBL-EC. In hospital A, ESBL-EC represented up to 25.7% of the total *E. coli* flora.

At the WWTP's output, *E. coli* concentrations are of the order of log4-log5, while ESBL-EC concentrations are log2-log3. The log removals values for *E. coli* were 1.3- 2.2 log for the Tilff WWTP and 1.8-2.7 log for the Angleur WWTP for 1<sup>st</sup>-2<sup>nd</sup> campaigns respectively while those for ESBL-EC were 1.9- 2.9 for the Tilff WWTP and 1.3-2.9 log for the Angleur WWTP.

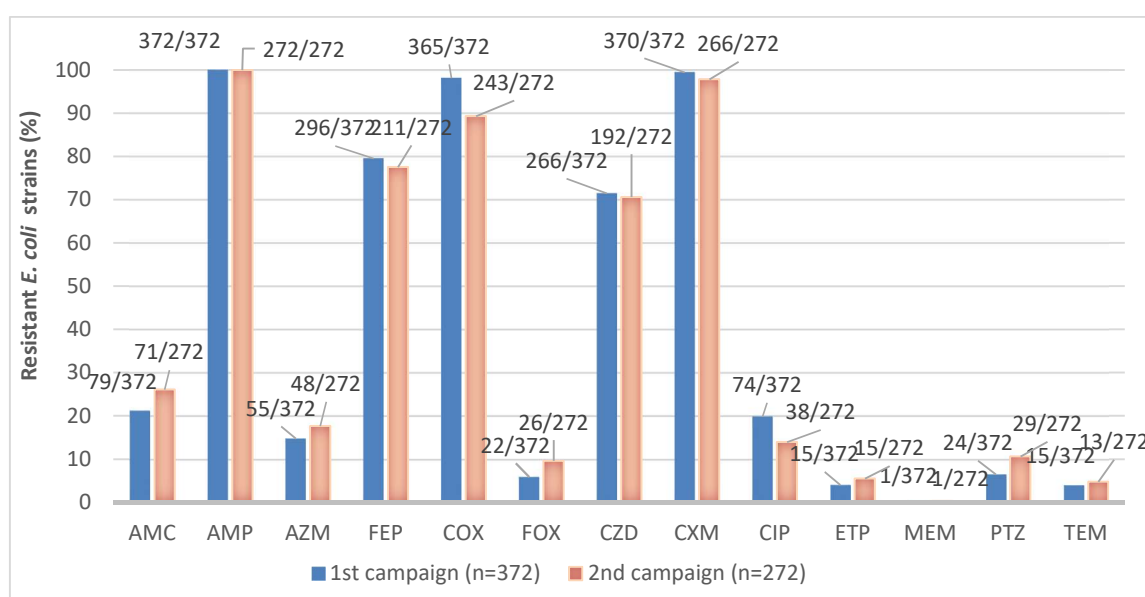
*E. coli* and ESBL-EC concentrations measured in freshwater during the second campaign in August 2021 were not higher than those measured during the first campaign in January 2021, even though the WWTPs were no longer in operation at that time following the floods that occurred in July 2021.

### Antibiotic resistance

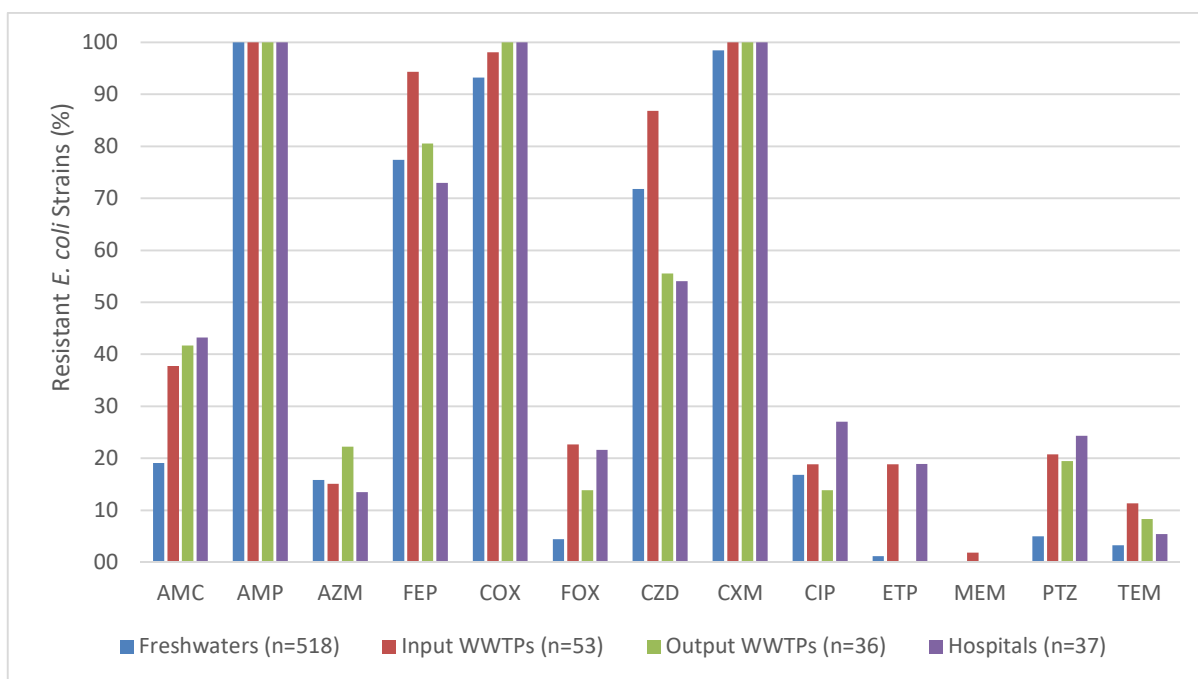
Since the strains were selected directly on the Brilliance ESBL medium, 642 out of the 644 strains had the ESBL phenotype, the two others had AmpC phenotype. Five percent of them had a carbapenemase producer profile.

A total of 372 and 272 strains were isolated respectively from the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> campaign. Calculated resistance rates for each campaign are compared with clinical breakpoints (Figure 2a). The Chi-square test did not show any significant difference (p-value > 0.05 for each antibiotic) between the two campaigns for each antimicrobial resistance rate by antibiotic except for COX.

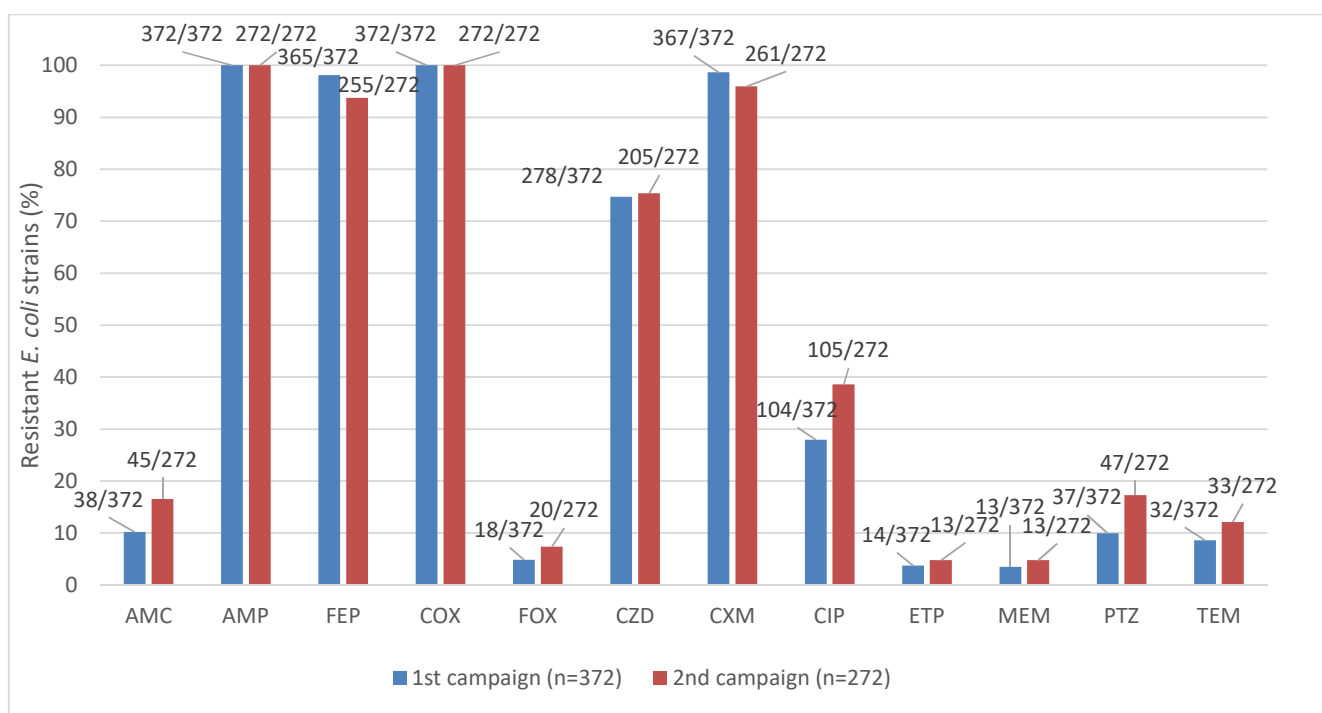
a)



b)



c)



**Figure 2:** a) Resistance rates of the ESBL (n=642) and AmpC (n=2) *E. coli* strains isolated respectively from the 1<sup>st</sup> (n=372) and 2<sup>nd</sup> (n=272) campaign using the clinical breakpoints given by EUCAST b) Resistance rates of the 644 strains sorted by water sources using the clinical breakpoints

given by EUCAST c) Resistance rates of the 644 strains isolated respectively from the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> campaign using the ECOFF given by EUCAST (ECOFF for AZM does not exist) (AMC: amoxicillin/clavulanic acid, AMP: ampicillin, AZM: azithromycin, FEP: cefepime, COX: cefotaxim, FOX: ceftazidim, CZD: ceftazidim, CXM: cefuroxime, CIP: ciprofloxacin, ETP: ertapenem, MEM: meropenem, PTZ: piperacillin/tazobactam, TEM: temocillin, WWTP: wastewater treatment plant)

In the figure 2a, the highest rates of resistance were found for AMP (100%-100%), COX (98.1%-89.3%) and CXM (99.5%-97.8%) and the lowest for ETP (4.0-5.5%) and MEM (0.3%-0.4%) for the 1<sup>st</sup>-2<sup>nd</sup> campaigns.

A total of 630 of the 644 ESBL-EC and AmpC strains (97.8%) were multidrug resistant (MDR), i.e. resistant to 3 different antibiotic classes. The most frequent combinations (68.3%) was resistance to penicillin/2<sup>nd</sup> generation cephalosporin/3<sup>rd</sup>-4<sup>th</sup> generation cephalosporin.

Based on clinical breakpoints, 100% of the strains are resistant to penicillin (AMP) and 3<sup>rd</sup>-4<sup>th</sup> generation cephalosporins (COX, CZD, FEP). A total of 23.3% strains are resistant to penicillin +  $\beta$ -lactamase inhibitors (AMC); 61.5% are resistant to 2<sup>nd</sup> generation cephalosporins (CXM) and 48.8% are resistant to fluoroquinolones (CIP).

Resistance rates were calculated by origin and plotted in a histogram (Figure 2b). Rates measured in freshwaters for AMC, COX, FOX, CXM, PTZ and TEM were lower than those measured at the input/output of WWTPs and hospitals. The Chi-square test measured a difference (p-value < 0.05) by origin for 7 antibiotics (AMC, FEP, FOX, CZD, ETP, PTZ, TEM).

In the figure 2c, some resistance rates calculated with the ECOFFs are higher (FEP, COX, CZD, CIP, MEM, PTZ, TEM) than those obtained with clinical breakpoints, while others are lower (AMC) but still close (FOX, CXM, ETP).

## Genotyping

A total of 474 strains out of 644 (73.6%) had a CTX-M-1 group's gene, 96 (14.9%) had a CTX-M-9 group's gene and none had CTX-M-2 group's gene. No strain had a combination of two CTX-M groups.

## Whole genome analysis

### Serotyping and MLST

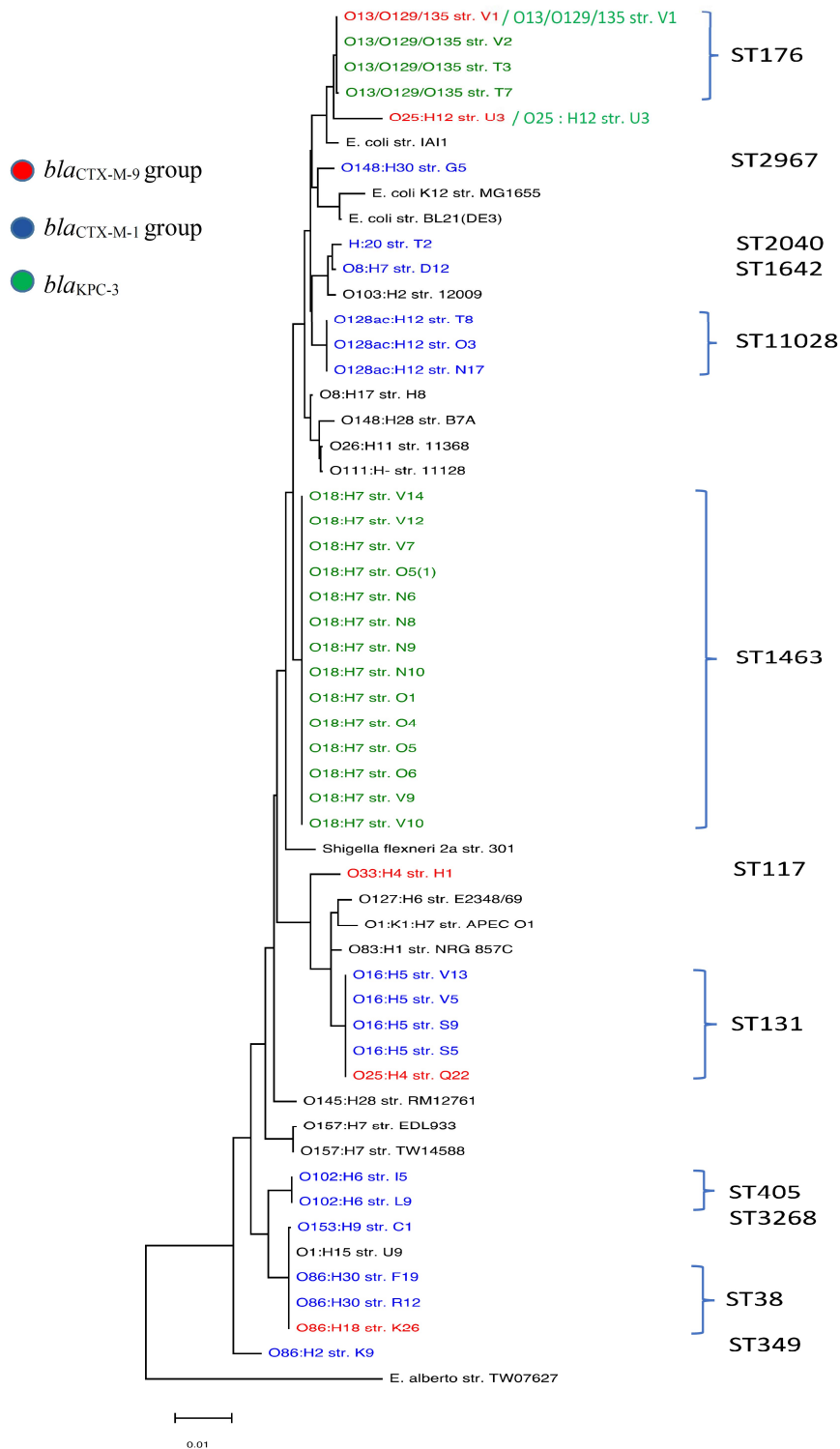
Several serotypes were detected for the 40 sequenced genomes (Table 3). Serotype O18:H7 belonging to ST1463 was predominant with 14 strains isolated from hospital effluents or treated effluents (output of WWTP). No O antigen was detected in one strain (T2) while no H antigen was detected in four others (T3, T7, V1 and V2). Three O86 serogroup strains belonging to ST38, three O128ac:H12 serotype strains belonging to ST11028 and four O16:H5 serogroup strains belonging to ST131 were found for the first campaign. For the second campaign, two strains were detected as O102:H6, belonging to ST405 and two strains belonged to serogroup O8 (ST88 and ST1642) (Table 3).

### Resistance genes

All strains had genes for resistance against AMP, FEP, and CIP. All strains except one (strain U9) had COX resistance genes. The most frequently detected ESBL gene's group was *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (n=21) with *bla*<sub>CTX-M-15</sub> the most represented (n=15). *bla*<sub>TEM</sub> variants (n = 11), *bla*<sub>OXA</sub> variants (n = 7), and *bla*<sub>SHV</sub> (n = 9) variants were also detected (Table 3). However, the variants *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>TEM-35</sub>, *bla*<sub>TEM-84</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub> are listed as broad-spectrum but not extended-spectrum in the beta-lactamase database (Naas *et al.*, 2017) and the function of *bla*<sub>SHV-182</sub> is not listed in this database.

Four different carbapenemase-producing *E. coli* genes were identified among the sequenced genomes: the *bla*<sub>KPC-3</sub> gene in 19 strains, the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene in one strain, the *bla*<sub>VIM-1</sub> gene in two strains, and the *bla*<sub>OXA-244</sub> in two strains.

With few exceptions, all strains belonging to the same ST clustered together, while a second basis for clustering was the resistance gene profiles with the presence of *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (blue), *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (red) gene's group or *bla*<sub>KPC-3</sub> carbapenemase-coding genes (green) (Figure 3). Some reference strains are included beside the isolated strains in this study.



**Figure 3:** Phylogenetic relationships and sequence types of the sequenced *E. coli* genomes based on the concatenated sequences of the 7 housekeeping genes (*adh*, *fumC*, *icd*, *gyrB*, *mdh*, *purA*, *recA*) with a length of 3424 nucleotides using Muscle in MEGA11 software (maximum Likelihood based on Tamura-Nei model and a bootstrap of 1000 replicates) (Tamura *et al.*, 2013).





## Virulence genes

The VirulenceFinder program identified the presence of several virulence genes in the 40 strains sequenced (Table 3). The *terC* gene, which codes for tellurite resistance, was the most abundant in each category of samples. Other genes were also detected in high proportion such as *fyuA* (siderophore), *gad* (glutamate decarboxylase), *lpfa* (polar fimbriae). The detected virulence genes were quite similar within each type of sample (hospital effluents, freshwaters, input/output WWTP).

A total of 13 other strains from different water categories and different serogroups (O16, O25, O86) possessed the genes *kpsE* and *kpsMIII\_K5* coding for a possible K5 capsule, an essential virulence factor. Only six strains had the *iha* gene coding for an adhesin (Table 3).

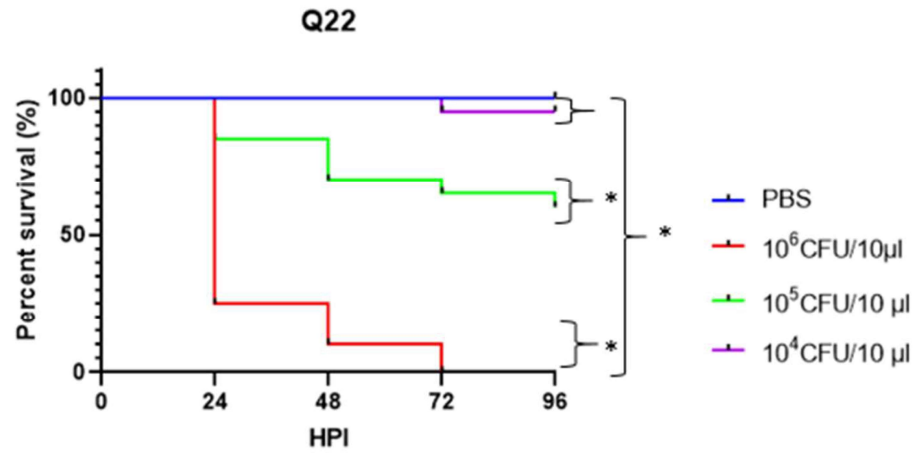
## Mobile genetic elements

The MobileElementFinder program detected several mobile elements associated with ESBLs genes (Table 3). Many *bla<sub>CTX-M</sub>* genes are associated with insertion sequences (ISEc9) and the *bla<sub>KPC-3</sub>* genes are generally located in a Tn4401 transposon, sometimes on the IncX3 plasmid.

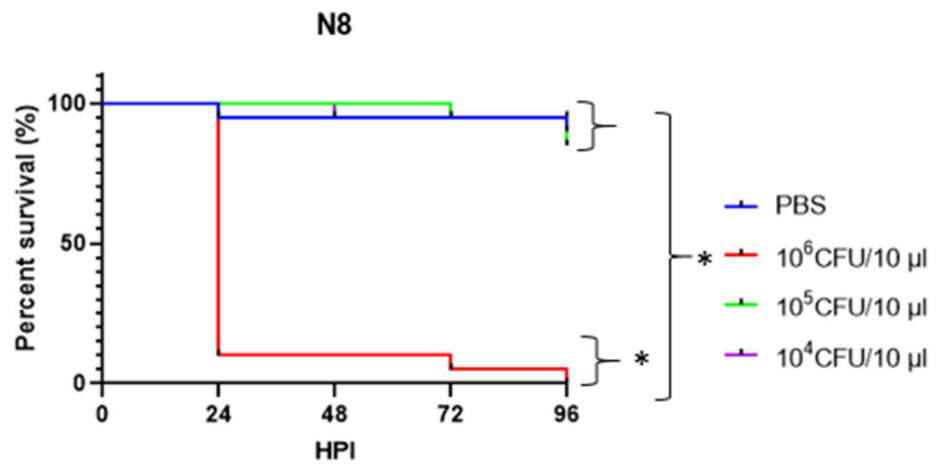
## *Galleria mellonella* larvae infection assays

The Q22 and K9 strains were virulent in the *G. mellonella* model from  $10^5$  CFU/10 $\mu$ l while the N8 strain was virulent from  $10^6$  CFU/10 $\mu$ l. The Kaplan–Meier survival curves are shown in Figure 5.

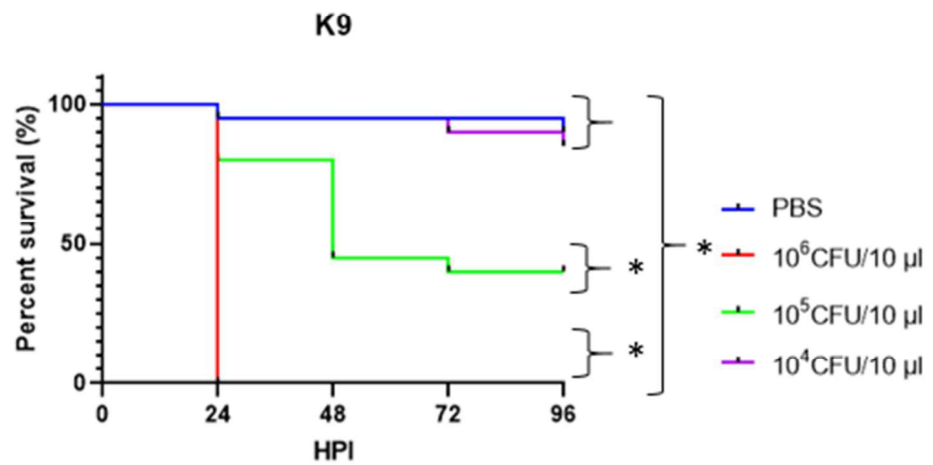
a)



b)



c)



**Figure 5:** Kaplan–Meier survival curves of the experiments with *G. mellonella* larvae inoculated with *E. coli* Q22 (a), *E. coli* N8 (b) and *E. coli* K9 (c). Each group contained 20 larvae separated in 2 subgroups of 10 larvae. HPI: hours post inoculation; *p*-value (\*) < 0.05 (Log-rank tests).

## Discussion

This study report, for the first time, the presence of ESBL-EC in non-recreational aquatic environments in Belgium. Several studies have been realized in different countries to date (Blaak *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2020; Hooban *et al.*, 2021; Kimera *et al.*, 2021; Cho *et al.*, 2023). ESBL-EC were enumerated in each of the 24 sampled sites. Surface water is highly impacted by anthropogenic activities as it receives contaminants from various sources, and the detection of ESBL-EC has become common in surface water worldwide (Cho *et al.*, 2023). Their concentrations were higher than those found by Blaak *et al.* (2014) in four recreational waters in the Netherlands where average ESBL-EC concentrations of  $1.3 \text{ (CFU) } \times \text{ (100 ml)}^{-1}$  were measured and their presence was found in 62% of all samples. In 2021, in nine recreational (freshwater) areas in Belgium, ESBL-EC had been found at least once in each bathing site and in 33% of all samples and represented 3% of the *E. coli* isolated (Crettels *et al.*, 2023). However, this value of 3% is certainly overestimated as it is calculated from isolates obtained on TBX and TBX+AMX media.

In this study, the proportion of ESBL-EC in the total *E. coli* flora ranged from 0.3 to 4.7% per sampling point in freshwaters, with an average of 1.4%.

This is lower than what was found in two rivers in southern Poland, where ESBL-EC constituted 15.30% of the *E. coli* isolated from these two rivers (Lenart-Boroń, 2017). In Norway, the ratio of ESBL-EC to total *E. coli* CFU ranged from 0 to 3.8% in recreational water samples (Jørgensen *et al.*, 2017).

In hospital effluents, the *E. coli* concentrations have reached (maximum)  $4.0 \times 10^6 \text{ (CFU) } \times \text{ (100 ml)}^{-1}$  (Hospital B) and  $1.1 \times 10^5 \text{ (CFU) } \times \text{ (100 ml)}^{-1}$  (Hospital A) for ESBL-EC. Servais & Passerat (2009) had found similar concentrations of *E. coli* in samples from 17 hospitals in France. Therefore, concentrations of ESBL-EC seem high in hospital effluents which are directed to WWTPs. The MAR index, which reflects the level of contamination by antibiotic-resistant *E. coli* in a sample, of these hospital effluents had been measured in 2019 in the same watershed and reached 0.16 to 0.22 on TBX medium (Crettels *et al.*, 2022). A MAR index greater than 0.2 means that the high risk source of contamination is where antibiotics are frequently used (Davis & Brown, 2016). In hospital A, ESBL-EC represent up to 25.7% of the total *E. coli* flora. This proportion has a large variability from one sample to another explained by the fact that it is a direct sampling in the pipes with a presumed variability between samplings dependent, among others, on the number of hospital beds (635 beds for hospital A and 226 beds for hospital B).

The log removals calculated for the WWTPs are within the expected ranges of removal - i.e., log reduction of heterotrophic bacteria up to 3 log (Munir, Wong & Xagorarakis, 2011; Kwak *et al.*, 2015) and ESBL-EC with removals of 1.5 log (Anses, 2020). Despite this, ESBL-EC concentrations remain high at the WWTP output and are discharged into the Ourthe River. This corroborates with different studies that have shown that WWTPs are not able to stop the release of ESBL-EC and MDR bacteria into receiving rivers (Reinthal *et al.*, 2010; Blaak *et al.*, 2015; Lenart-Boroń *et al.*, 2020).

PCR genotyping has shown that 474 of the 644 ESBL-EC and AmpC strains (73.6%) contain genes belonging to the CTX-M-1 group. No strain contained CTX-M-2 group's genes. Herrig *et al.* (2020), on the river Lahn in Germany, showed that  $bla_{CTX-M}$  concentrations are largely explained by faecal pollution. In animal health, the prevalence of pathogenic and non-pathogenic ESBL-EC isolated from diarrhoeic and septicaemia young calves over three calving seasons showed that out of 394 isolates studied, the majority contain CTX-M-1 (243, 61.7%), M-9 (74, 18.8%) and CTX-M-2 genes group (64, 16.2%) (Guérin *et al.*, 2022). In a nationwide survey in Belgian hospitals in 2006-2008, CTX-M-1, M-2 and M-9 genes groups were found in 79%, 12% and 9% of the ESBL-EC isolates, respectively. DNA sequencing revealed that  $bla_{CTX-M-15}$  was the most prevalent CTX-M-encoding gene, representing 85% of all ESBLs within the CTX-M-1 group (Rodriguez-Villalobos *et al.*, 2011).

A panel of 40 strains selected on the basis of a large number of antibiotic resistances were sequenced. In Ireland, WGS analysis revealed many different sequence types (ST) circulating in water and wastewater, including *E. coli* with ST131 (n=15), ST38 (n=8), ST10 (n=4) (Hooban *et al.*, 2021). In New Zealand, four ESBL-EC strains from freshwater were sequenced, three strains were ST 131 (CTX-M-27 positive) and the other ST69 (CTX-M-15-positive) (Burgess *et al.*, 2022). In this study, *E. coli* ST131 (n=5) and ST38 (n=4) were identified, but neither ST10, nor ST69. *E. coli* ST131 has been recognized as one of the top contributors to urinary tract infections in humans (Kudinha *et al.*, 2013). The intercontinental dissemination of this sequence type 131 has highly contributed to the worldwide emergence of fluoroquinolone-resistant and CTX-M-producing *E. coli* (Peirano *et al.*, 2014). Recent surveillance studies have shown that its overall prevalence ranges from 12.5% to 30% of all *E. coli* clinical strains, from 70% to 80% of fluoroquinolone-resistant strains, and from 50% to 60% of ESBL-producing strains (Peirano *et al.*, 2014).

$\beta$ -lactamase genes identified were  $bla_{CTX-M}$  (n=21), with  $bla_{CTX-M-15}$  the most represented (n=15), as well as  $bla_{TEM}$  (n=11),  $bla_{OXA}$  (n=7) and  $bla_{SHV}$  (n=9). Epidemiologically, CTX-M-15 is the most prevalent ESBL in *E. coli* clones worldwide in both community and hospital settings (Merida-Vieyra *et al.*, 2016; Robin *et al.*, 2017). CTX-M-15 is typically associated with IncF-type plasmids, a predominant group of large conjugative plasmids that carry and mobilize multiple resistance and virulence determinants (Mahéroul *et al.*, 2019). CTX-M-15 was the most prevalent ESBL in surface water in Europe, whereas

CTX-M-1 was most prevalent in Italy and CTX-M-14 was most prevalent in Spain (Cho *et al.*, 2023). While CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-15, and CTX-M-27 were commonly detected in Europe, less frequently detected CTX-M variants included CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-24, CTX-M-28, CTX-M-32, CTX-M-55, and CTX-M-79 (Cho *et al.*, 2023). Other ESBLs including TEM-3, TEM-52, SHV-2, and GES-1 were also detected, and especially SHV-12 widely distributed in surface water (Cho *et al.*, 2023). In this study, many plasmids such as IncFIB, IncFII and col156 were found in the strains. Baron *et al.* (2020) showed the genetic and plasmid diversity of *E. coli* AR isolated from French rivers probably related to the various animal and human origins of the isolated bacteria. In this study, the *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were often associated with ISEc9 (synonym: ISEcp1 or ISEcp1B) (Table 3). These insertion sequences (IS), which belong to the IS1380 family, are known to be associated with three of the five CTX-M groups (CTXM-1, -M-2 and -M-9 groups). They enable to mobilize the CTX-M genes by a transpositional mechanism in *E. coli* by recognizing a variety of DNA sequences as right inverted repeats (Poirel *et al.*, 2005).

The pathogenicity of three ESBL-EC (Q22, N8 and K9 strains) was tested in the *Galleria mellonella* model like it was the case with Zhao *et al.* (2022) who tested the pathogenicity of ESBL-EC from ovine origin in this model. The Q22 strain belonging to serotype O25:H4 and ST131 was selected as it is a rapidly spreading lineage and an emerging problem in community and hospital infections (Peirano & Pitout, 2010). It possesses numerous virulence factors (Table 3), including an adhesin (*iha*). In the *G. mellonella* larvae model, Q22 strain showed pathogenicity from 10<sup>5</sup> CFU/10 µl, confirming its pathogenicity. Strain N8 was chosen because it is one of the 14 strains of serotype O18:H7 ST 1463, and possesses the *bla*<sub>KPC-3</sub> gene encoding a carbapenemase. Its virulence factors are *fyuA*, *gad*, *irp2*, *terC*, *LpfA*, *celB*. Strain N8 showed pathogenicity in the *Galleria mellonella* model from a concentration of 10<sup>6</sup> CFU/10 µl. The K9 strain, with serotypes O86:H2 and ST349, was also tested as it possesses numerous virulence factors, including the *lpfa* gene, which codes for long polar fimbriae important for adhesion of pathogenic strains, and the *agg* genes characteristic of enteroaggregative *E. coli*. This K9 strain is predicted as human pathogen with a probability of 92,6% according to Pathogenfinder. K9 is pathogenic in the *Galleria mellonella* model from a concentration of 10<sup>5</sup> CFU/10µl, like the Q22 strain, showing that these two strains have a higher pathogenicity than the N8 strain. A human origin can be hypothesized for strains Q22 and K9, both isolated from freshwater, in the Ourthe at Esneux (K9) and in the Ourthe downstream of the Angleur WWTP (Q22).

One of the most observed concerns was the large number of strains containing carbapenemase genes- *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=19), *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=2) and *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=2) -even in freshwaters. In an American survey, the most commonly detected carbapenemase gene in wastewater was *bla*<sub>VIM</sub> (n=36), followed by *bla*<sub>KPC</sub> (n=2) (Hoelle *et al.*, 2019).

SNP analysis showed that the 14 strains with serotype O18:H7 ST1463 appeared to originate from the same clone. This 14 strains belong to the B1 Clermont phylotype. The current classification of *E. coli* extends to eight phlotypes (A, B1, B2, C, D, E, F and G) (Clermont *et al.*, 2013). These phlotypes are associated with certain hosts, specific environments or lifestyles. For example, strains from phylotype B2 and D are involved in extra-intestinal infections (Picard *et al.*, 1999), while water-adapted strains belong to phylogroup B1 (Berthe *et al.*, 2013). The majority of the strains that contained *bla<sub>KPC-3</sub>* had this gene located on transposon Tn4401, which is a Tn3-based transposon known to be involved in the mobilization of the *bla<sub>KPC</sub>* gene (Cuzon, Naas & Nordmann, 2011). The *bla<sub>KPC-3</sub>* genes of 2 strains (V7 and V12) were located on an IncX3 plasmid known to carry carbapenemase genes in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) worldwide (Mouftah *et al.*, 2019).

One of these strains (strain O5) was found at the output of the Tilff's WWTP demonstrating that hospitals may represent a source of environmental contamination as suggested by Cahill *et al.* (2019) but none of them was found in freshwaters.

Each of these 14 strains showed resistance to ertapenem and susceptibility under conditions of high dose exposure to meropenem (intermediate). Extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains of serotype O18:K1:H7 are primarily responsible for neonatal meningitis and sepsis in humans and this serotype is also frequently isolated from extra-intestinal lesions of colibacillosis in poultry (Moulin-Schouleur *et al.*, 2007). However, the O18:H7 strains in this study do not possess the *Neu* gene encoding the K1 capsule. Despite this, Kaplan–Meier survival curves for serotype O18:H7 strain N8 injected in *G. mellonella* larvae showed mortality from 10<sup>6</sup> CFU/10μl with a larvae mortality of 80% after 24 HPI. This results could be correlated to the ones obtained by Antoine *et al.* (2021) with avian pathogenic *E. coli* O18:K1 (APEC) which presented a similar larvae mortality (70-90%) after 24 HPI with the same concentrations (10<sup>6</sup> CFU/10μl) of APEC. In addition, the N8 strain has virulent properties in comparison with a *E. coli* K12-DH5α strain selected on its avirulent background and which showed a larvae mortality < 10% for a range of concentrations between 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> CFU/10μl (Habets *et al.*, 2022).

The *bla<sub>KPC-3</sub>* gene is generally associated with ST1463 and thus with serotype O18:H7 in contrast to other studies where it is generally associated with ST167 or even ST3948 (Peirano *et al.*, 2014; Mani *et al.*, 2017). KPC-producing *E. coli* strains, although distributed worldwide, are rare and only described in countries where the prevalence of this carbapenemase in *K. pneumoniae* is high, Italy is characterized by the highest rates in Europe (Peirano *et al.*, 2014). Carbapenemase-producing bacteria represent a global health problem because of their multidrug resistance and limited therapy options (Bonomo *et al.*, 2018).

This study shows that ESBL-EC are widespread in the region of Belgium studied and found at all sampling points. Sampling along the hospital-WWTP-freshwater continuum supposed that hospital effluents represent one of the sources of AR bacteria in the aquatic environment. More worryingly, some of the ESBL-EC isolated were also resistant to carbapenems and possessed genes for carbapenemase production, which represents a threat to public health. Further studies are now needed to determine the impact of each sector and the risk associated to the environmental dissemination of AR bacteria by the aquatic environment.

**Funding:** The authors thank the ISSEP for the funding of this study (“EBLSE” project).

**Conflict of interest:** There is no conflict of interest to declare.

**Data Availability Statement:** The data underlying this article are available in the article.

**CRedit authorship contribution statement:** **L. Crettels:** Project administration, conceptualization, methodology, Writing - Original Draft. **N. Burlion:** Supervision. **A. Habets:** Formal analysis, Writing - Review & Editing. **B. Taminiau:** formal analysis, Writing - Review & Editing. **G. Daube:** Writing - Review & Editing. **E. Delrée:** formal analysis. **A-F Mouchette:** formal analysis. **D. Thiry:** Supervision, Writing - Review & Editing. **P. Mayeres:** Software.

## References

- Anses (2020) Antibiorésistance et environnement. État et causes possibles de la contamination des milieux en France par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques. Avis de l’Anses. Rapport d’expertise collective.
- Antoine, C., Laforêt, F., Blasdel, B., Fall, A., Duprez, J.-N., Mainil, J., Delcenserie, V. and Thiry, D. (2021) In Vitro Characterization and In Vivo Efficacy Assessment in *Galleria mellonella* Larvae of Newly Isolated Bacteriophages against *Escherichia coli* K1. *Viruses*. **13**, 2005.
- Baron, S., Le Devendec, L., Lucas, P., Larvor, E., Jové, T. and Kempf, I. (2020) Characterisation of plasmids harbouring extended-spectrum cephalosporin resistance genes in *Escherichia coli* from French rivers. *Veterinary Microbiology*. **243**, 108619.
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F. and Martinez, J.L. (2015) Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol*. **13**, 310–317.
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E. and Petit, F. (2013) Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. *Appl Environ Microbiol*. **79**, 4684–4693.



- Bevan, E.R., Jones, A.M. and Hawkey, P.M. (2017) Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **72**, 2145–2155.
- Blaak, H., de Kruijf, P., Hamidjaja, R.A., van Hoek, A.H.A.M., de Roda Husman, A.M. and Schets, F.M. (2014) Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Veterinary Microbiology*. **171**, 448–459.
- Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R.A., Schets, F.M. and de Roda Husman, A.M. (2015) Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Dutch Surface Water and Wastewater. *PLoS One*. **10**, e0127752.
- Bonomo, R.A., Burd, E.M., Conly, J., Limbago, B.M., Poirel, L., Segre, J.A. and Westblade, L.F. (2018) Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases*. **66**, 1290–1297.
- Burgess, S.A., Moinet, M., Brightwell, G. and Cookson, A.L.Y. (2022) Whole genome sequence analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* recovered from New Zealand freshwater sites. *Microbial Genomics*. **8**, 000893.
- Cahill, N., O'Connor, L., Mahon, B., Varley, Á., McGrath, E., Ryan, P., Cormican, M., Brehony, C., Jolley, K.A., Maiden, M.C., Brisse, S. and Morris, D. (2019) Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing Enterobacterales? *Sci Total Environ*. **672**, 618–624.
- Chen, P.-A., Hung, C.-H., Huang, P.-C., Chen, J.-R., Huang, I.-F., Chen, W.-L., Chiou, Y.-H., Hung, W.-Y., Wang, J.-L. and Cheng, M.-F. (2016) Characteristics of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Multiple Rivers in Southern Taiwan. *Appl Environ Microbiol*. **82**, 1889–1897.
- Cho, S., Jackson, C.R. and Frye, J.G. (2023) Freshwater environment as a reservoir of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Applied Microbiology*. **134**, lxad034.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E. and Gordon, D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. **5**, 58–65.
- Cornwall, W. (2021) Europe's deadly floods leave scientists stunned. *Science*. **373**, 372–373.
- Crettels, L., Burlion, N., Breyer, R., Mainil, J., Servais, P., Korfer, J. and Thiry, D. (2022) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from freshwaters and hospital effluents in Belgium. *Lett Appl Microbiol*. **74**, 411–418.
- Crettels, L., Champon, L., Burlion, N., Delrée, E., Saegerman, C. and Thiry, D. (2023) Antimicrobial resistant *Escherichia coli* prevalence in freshwaters in Belgium and human exposure risk assessment. *Heliyon*. **9**, e16538.
- Cuzon, G., Naas, T. and Nordmann, P. (2011) Functional Characterization of Tn4401, a Tn3-Based Transposon Involved in blaKPC Gene Mobilization  $\nabla$ . *Antimicrob Agents Chemother*. **55**, 5370–5373.

- Dashti, A.A., Jadaon, M.M., Abdulsamad, A.M. and Dashti, H.M. (2009) Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *KUWAIT MEDICAL JOURNAL*.
- Davis, R. and Brown, P.D. (2016) Multiple antibiotic resistance index, fitness and virulence potential in respiratory *Pseudomonas aeruginosa* from Jamaica | Microbiology Society [WWW Document]. URL DOI 10.1099/jmm.0.000229.
- Fakih, I., Thiry, D., Duprez, J.-N., Saulmont, M., Iguchi, A., Piérard, D., Jouant, L., Daube, G., Ogura, Y., Hayashi, T., Taminiau, B. and Mainil, J.G. (2017) Identification of Shiga toxin-producing (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in diarrhoeic calves and comparative genomics of O5 bovine and human STEC. *Vet Microbiol.* **202**, 16–22.
- Ghaderpour, A., Ho, W.S., Chew, L.-L., Bong, C.W., Chong, V.C., Thong, K.-L. and Chai, L.C. (2015) Diverse and abundant multi-drug resistant *E. coli* in Matang mangrove estuaries, Malaysia. *Front Microbiol.* **6**.
- Guérin, V., Farchi, A., Cawez, F., Mercuri, P., Lucas, P., Blanchard, Y., Saulmont, M., Mainil, J. and Thiry, D. (2022) A three-year evolution and comparison of the blaCTX-M genes in pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* isolated from young diarrheic and septicaemic calves in Belgium. *Res Vet Sci.* **152**, 647–650.
- Habets, A., Antoine, C., Wagemans, J., Vermeersch, M., Laforêt, F., Diderich, J., Lavigne, R., Mainil, J. and Thiry, D. (2022) Impact of Shiga-toxin encoding gene transduction from O80:H2 Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) on non-STEC strains. *Sci Rep.* **12**, 21587.
- Herrig, I., Fleischmann, S., Regnery, J., Wesp, J., Reifferscheid, G. and Manz, W. (2020) Prevalence and seasonal dynamics of blaCTX-M antibiotic resistance genes and fecal indicator organisms in the lower Lahn River, Germany. *PLoS ONE.* **15**, e0232289.
- Hoelle, J., Johnson, J.R., Johnston, B.D., Kinkle, B., Boczek, L., Ryu, H. and Hayes, S. (2019) Survey of US wastewater for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Water and Health.* **17**, 219–226.
- Hooban, B., Fitzhenry, K., Cahill, N., Joyce, A., O' Connor, L., Bray, J.E., Brisse, S., Passet, V., Abbas Syed, R., Cormican, M. and Morris, D. (2021) A Point Prevalence Survey of Antibiotic Resistance in the Irish Environment, 2018–2019. *Environment International.* **152**, 106466.
- Johnson, A., Ginn, O., Bivins, A., Rocha-Melogno, L., Tripathi, S.N. and Brown, J. (2020) Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Escherichia coli* presence in urban aquatic environments in Kanpur, India. *Journal of Water and Health.* **18**, 849–854.
- Jørgensen, S.B., Søraas, A.V., Arnesen, L.S., Leegaard, T.M., Sundsfjord, A. and Jennum, P.A. (2017) A comparison of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* from clinical, recreational water and wastewater samples associated in time and location. *PLoS ONE.* **12**, e0186576.
- Kimera, Z.I., Mgaya, F.X., Mshana, S.E., Karimuribo, E.D. and Matee, M.I.N. (2021) Occurrence of Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producers, Quinolone and Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae Isolated from Environmental Samples along Msimbazi River Basin Ecosystem in Tanzania. *IJERPH.* **18**, 8264.

- Kudinha, T., Johnson, J.R., Andrew, S.D., Kong, F., Anderson, P. and Gilbert, G.L. (2013) *Escherichia coli* Sequence Type 131 as a Prominent Cause of Antibiotic Resistance among Urinary *Escherichia coli* Isolates from Reproductive-Age Women. *J Clin Microbiol.* **51**, 3270–3276.
- Kwak, Y.-K., Colque, P., Byfors, S., Giske, C.G., Möllby, R. and Kühn, I. (2015) Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm during 1 year: does it reflect the resistance trends in the society? *International Journal of Antimicrobial Agents.* **45**, 25–32.
- Lenart-Boroń, A. (2017) Antimicrobial resistance and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* from major rivers in Podhale, southern Poland. *Int J Environ Sci Technol.* **14**, 241–250.
- Lenart-Boroń, A.M., Kulik, K. and Jelonkiewicz, E. (2020) Antimicrobial resistance and ESBL genes in *E. coli* isolated in proximity to a sewage treatment plant. *Journal of Environmental Science and Health, Part A.* **55**, 1571–1580.
- Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L. and Woodford, N. (2006) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **59**, 165–174.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. and Monnet, D.L. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection.* **18**, 268–281.
- Mahéroult, A.-C., Kemble, H., Magnan, M., Gachet, B., Roche, D., Le Nagard, H., Tenaillon, O., Denamur, E., Branger, C. and Landraud, L. (2019) Advantage of the F2:A1:B- IncF Pandemic Plasmid over IncC Plasmids in In Vitro Acquisition and Evolution of blaCTX-M Gene-Bearing Plasmids in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **63**, e01130-19.
- Mani, Y., Mansour, W., Mammeri, H., Denamur, E., Saras, E., Boujâafar, N., Bouallègue, O., Madec, J.-Y. and Haenni, M. (2017) KPC-3-producing ST167 *Escherichia coli* from mussels bought at a retail market in Tunisia. *J Antimicrob Chemother.* **72**, 2403–2404.
- Matuschek, E., Brown, D.F.J. and Kahlmeter, G. (2014) Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection.* **20**, O255–O266.
- Merida-Vieyra, J., De Colsa, A., Calderon Castañeda, Y., Arzate Barbosa, P. and Aquino Andrade, A. (2016) First Report of Group CTX-M-9 Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Pediatric Patients in Mexico. *PLoS One.* **11**, e0168608.
- Mouftah, S.F., Pál, T., Darwish, D., Ghazawi, A., Villa, L., Carattoli, A. and Sonnevend, Á. (2019) Epidemic IncX3 plasmids spreading carbapenemase genes in the United Arab Emirates and worldwide. *Infect Drug Resist.* **12**, 1729–1742.
- Moulin-Schouleur, M., Réperant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rassaert, D. and Schouler, C. (2007) Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains of

- Avian and Human Origin: Link between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**, 3366–3376.
- Munir, M., Wong, K. and Xagorarakis, I. (2011) Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Research*. **45**, 681–693.
- Naas, T. and Nordmann, P. (1994) Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**, 7693–7697.
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R.A., Dabos, M.L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P. and Iorga, B.I. (2017) Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **32**, 917–919.
- Ogutu, J.O., Zhang, Q., Huang, Y., Yan, H., Su, L., Gao, B., Zhang, W., Zhao, J., Cai, W., Li, W., Zhao, H., Chen, Y., Song, W., Chen, X., Fu, Y. and Zhang, F. (2015) Development of a multiplex PCR system and its application in detection of blaSHV, blaTEM, blaCTX-M-1, blaCTX-M-9 and blaOXA-1 group genes in clinical *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. *J Antibiot*. **68**, 725–733.
- Peirano, G., Bradford, P., Kazmierczak, K.M., Badal, R.E., Hackel, M., Hoban, D.J. and Pitout, J.D.D. (2014) Global Incidence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* ST131 - Volume 20, Number 11—November 2014 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC*. *Emerging Infectious Diseases*. **20**.
- Peirano, G. and Pitout, J.D.D. (2010) Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents*. **35**, 316–321.
- Pereira, A., Santos, A., Tacão, M., Alves, A., Henriques, I. and Correia, A. (2013) Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Science of The Total Environment*. **461–462**, 65–71.
- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. and Denamur, E. (1999) The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. *Infect Immun*. **67**, 546–553.
- Pitout, J.D.D., Hossain, A. and Hanson, N.D. (2004) Phenotypic and Molecular Detection of CTX-M<sup>β</sup>-Lactamases Produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J CLIN MICROBIOL*. **42**, 7.
- Poirel, L., Lartigue, M.-F., Decousser, J.-W. and Nordmann, P. (2005) ISEcp1B-Mediated Transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. **49**, 447–450.
- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H. and Carlson, K.H. (2006) Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants: Studies in Northern Colorado †. *Environ Sci Technol*. **40**, 7445–7450.
- Reinthal, F.F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., Melkes, A., Posch, J., Winter, I. and Zarfel, G. (2010) ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Research*. **44**, 1981–1985.
- Reynolds, L.J., Sala-Comorera, L., Martin, N.A., Nolan, T.M., Stephens, J.H., Gitto, A., O’Hare, G.M.P., O’Sullivan, J.J. and Meijer, W.G. (2020) Correlation between antimicrobial resistance

- and faecal contamination in small urban streams and bathing waters. *Science of The Total Environment*. **739**, 140242.
- Robin, F., Beyrouthy, R., Bonacorsi, S., Aissa, N., Bret, L., Brieu, N., Cattoir, V., Chapuis, A., Chardon, H., Degand, N., Doucet-Populaire, F., Dubois, V., Fortineau, N., Grillon, A., Lanotte, P., Leyssene, D., Patry, I., Podglajen, I., Recule, C., Ros, A., Colomb-Cotin, M., Ponties, V., Ploy, M.C. and Bonnet, R. (2017) Inventory of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in France as Assessed by a Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother*. **61**, e01911-16.
- Rodriguez-Villalobos, H., Bogaerts, P., Berhin, C., Bauraing, C., Deplano, A., Montesinos, I., de Mendonça, R., Jans, B. and Glupczynski, Y. (2011) Trends in production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **66**, 37–47.
- Rossoni, R.D., Ribeiro, F. de C., dos Santos, H.F.S., dos Santos, J.D., Oliveira, N. de S., Dutra, M.T. dos S., de Lapena, S.A.B. and Junqueira, J.C. (2019) *Galleria mellonella* as an experimental model to study human oral pathogens. *Archives of Oral Biology*. **101**, 13–22.
- Sanders, C.C. and Sanders, W.E. (1979) Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. **15**, 792–797.
- Schijven, J.F., Blaak, H., Schets, F.M. and de Roda Husman, A.M. (2015) Fate of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Faecal Sources in Surface Water and Probability of Human Exposure through Swimming. *Environ Sci Technol*. **49**, 11825–11833.
- Servais, P. and Passerat, J. (2009) Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of The Total Environment*. **408**, 365–372.
- Shamsrizi, P., Gladstone, B.P., Carrara, E., Luise, D., Cona, A., Bovo, C. and Tacconelli, E. (2020) Variation of effect estimates in the analysis of mortality and length of hospital stay in patients with infections caused by bacteria-producing extended-spectrum beta-lactamases: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. **10**, e030266.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. **30**, 2725–2729.
- White, A. and Hughes, J.M. (2019) Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. *EcoHealth*. **16**, 404–409.
- WHO (2019a) Ten threats to global health in 2019. Geneva, Switzerland, 2019 [WWW Document]. URL <https://www.who.int/vietnam/news/feature-stories/detail/ten-threats-to-global-health-in-2019>.
- WHO (2019b) New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>.
- WHO (2021) WHO integrated global surveillance on ESBL-producing *E. coli* using a “One Health” approach : implementation and opportunities. Geneva.

- Zhao, X., Miao, Y., Adam, F.E.A., Zhao, H., Zhou, Z., Su, M., Li, R., Yang, B., Lv, Z., Xiao, S., Wang, X., Wang, J. and Yang, Z. (2022) ESBLs-producing *Escherichia coli* from sheep-origin: Genome-wide virulence genes identification and in vivo virulence assessment in mice and *Galleria mellonella*. *Transboundary Emerging Dis.* **69**, 3606–3617.
- Zhen, X., Lundborg, C.S., Sun, X., Hu, X. and Dong, H. (2019) Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: a systematic review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control.* **8**, 137.
- Zhou, Z., Alikhan, N.-F., Mohamed, K., Fan, Y., Group, the A.S., Achtman, M., Brown, D., Chattaway, M., Dallman, T., Delahay, R., Kornschober, C., Pietzka, A., Malorny, B., Petrovska, L., Davies, R., Robertson, A., Tyne, W., Weill, F.-X., Accou-Demartin, M. and Williams, N. (2020) The Enterobase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia coli* core genomic diversity. *Genome Res.* **30**, 138–152.

## Tables

**Table 1:** *E. coli* and ESBL-EC concentrations measured by locations for the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> campaign

Code	Locations	Origin	1 <sup>st</sup> campaign (January 2021)			2 <sup>nd</sup> campaign (August 2021)		
			<i>E. coli</i> /100 ml TBX	BLSE-EC/100 ml	% BLSE-EC	<i>E. coli</i> /100 ml TBX	BLSE-EC/100 ml	% BLSE-EC
A	Ourthe at Lavacherie	Freshwater	2.0 x 10 <sup>3</sup>	94	4.7	3.2 x 10 <sup>3</sup>	15	0.5
B	Ourthe at Ortho	Freshwater	1.1 x 10 <sup>3</sup>	25	2.3	6.1 x 10 <sup>2</sup>	5	0.8
C	Ourthe at Mabompré	Freshwater	9.7 x 10 <sup>2</sup>	11	1.1	8.3 x 10 <sup>2</sup>	5	0.6
D	Ourthe at Maboge	Freshwater /bathing localization	6.1 x 10 <sup>2</sup>	8	1.4	3.2 x 10 <sup>2</sup>	4	1.3
E	Ourthe at Hampteau	Freshwater	6.5 x 10 <sup>2</sup>	6	0.9	2.8 x 10 <sup>2</sup>	2	0.6
F	Ourthe at Hotton	Freshwater /bathing localization	4.7 x 10 <sup>2</sup>	5	1.1	4.3 x 10 <sup>2</sup>	2	0.5
G	Ourthe at Noiseux	Freshwater /bathing localization	6.5 x 10 <sup>2</sup>	8	1.3	6.2 x 10 <sup>2</sup>	11	1.7
H	Petite Somme at Durbuy	Freshwater	1.5 x 10 <sup>4</sup>	52	0.3	2.1 x 10 <sup>3</sup>	12	0.6
I	Ourthe at Bomal	Freshwater	1.3 x 10 <sup>4</sup>	86	0.6	9.8 x 10 <sup>2</sup>	5	0.5
J	Ourthe at Comblain-Fairon	Freshwater	9.9 x 10 <sup>3</sup>	1.5 x 10 <sup>2</sup>	1.5	1.5 x 10 <sup>3</sup>	17	1.2
K	Ourthe at Esneux	Freshwater	1.2 x 10 <sup>4</sup>	1.3 x 10 <sup>2</sup>	1.1	1.5 x 10 <sup>3</sup>	20	1.3
L	Upstream of WWTP Tilff in the Ourthe	Freshwater	2.6 x 10 <sup>3</sup>	33	1.3	1.0 x 10 <sup>4</sup>	95	0.9
M	Downstream of WWTP Tilff in the Ourthe	Freshwater	1.3 x 10 <sup>3</sup>	60	4.7	7.2 x 10 <sup>3</sup>	1.4 x 10 <sup>2</sup>	1.9
N	Input WWTP Tilff	Hospital/community effluent	2.5 x 10 <sup>6</sup>	2.3 x 10 <sup>5</sup>	9.2	5.4 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	20.5
O	Output WWTP Tilff	Treated effluent	1.2 x 10 <sup>5</sup>	3.1 x 10 <sup>3</sup>	2.6	3.2 x 10 <sup>4</sup>	1.5 x 10 <sup>3</sup>	4.6
P	Upstream of WWTP Angleur in the Ourthe	Freshwater	2.8 x 10 <sup>3</sup>	42	1.5	1.2 x 10 <sup>4</sup>	1.4 x 10 <sup>2</sup>	1.1
Q	Downstream of WWTP Angleur in the Ourthe	Freshwater	3.6 x 10 <sup>3</sup>	43	1.2	1.5 x 10 <sup>4</sup>	1.9 x 10 <sup>2</sup>	1.3
R	Input WWTP Angleur	Hospital/community effluent	7.3 x 10 <sup>6</sup>	1.6 x 10 <sup>4</sup>	0.02	1.0 x 10 <sup>7</sup>	2.0 x 10 <sup>5</sup>	2
S	Output WWTP Angleur	Treated effluent	1.2 x 10 <sup>5</sup>	7.6 x 10 <sup>2</sup>	0.6	1.9 x 10 <sup>4</sup>	2.4 x 10 <sup>2</sup>	1.2
T	Ourthe at Chênée	Freshwater	8.6 x 10 <sup>3</sup>	2.1 x 10 <sup>2</sup>	2.5	8.5 x 10 <sup>3</sup>	1.1 x 10 <sup>2</sup>	1.3
U	Meuse at Liège	Freshwater	1.3 x 10 <sup>4</sup>	2.4 x 10 <sup>2</sup>	1.9	9.2 x 10 <sup>3</sup>	1.7 x 10 <sup>2</sup>	1.9
V	Hospital A*	Hospital effluent	7.3 x 10 <sup>5</sup>	1.1 x 10 <sup>5</sup>	15.6	4.3 x 10 <sup>5</sup>	1.1 x 10 <sup>5</sup>	25.7
W	Hospital B*	Hospital effluent	4.0 x 10 <sup>6</sup>	6.3 x 10 <sup>3</sup>	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	2.0 x 10 <sup>2</sup>	2
X	Veterinary faculty and surrounding facilities*	Hospital/community effluent	1.1 x 10 <sup>6</sup>	6.7 x 10 <sup>4</sup>	6.3	3.2 x 10 <sup>6</sup>	4.1 x 10 <sup>3</sup>	0.1

\*Effluents of Hospital A and the Veterinary faculty and surrounding facilities are transferred to the Tilff WWTP, while Hospital B effluent to the Angleur WWTP

**Table 2:** Target genes, primer sequences and amplified fragment lengths of the CTX-M 1, 2 and 9 groups PCR

Targeted groups	Primer sequences	Amplicon size in base pairs	Reference
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	CTX-M-1-F: 5'TTAGGAAGTGTGCCGCTGTA-3'	655 bp	Ogutu <i>et al.</i> , 2015
	CTX-M-1-R: 5'CGGTTTTATCCCCACAAC-3'		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	CTX-M-2-F: 5'GCGACCTGGTAACTACAATCC-3'	351 bp	Pitout <i>et al.</i> , 2004
	CTX-M-2-R: 5'-CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC-3'		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	CTX-M-9-F: 5'-GGTGATGAACGCTTTCCAAT-3'	518 bp	Ogutu <i>et al.</i> , 2015
	CTX-M-9-F: 5'-TTATCACCTGCAGTCCACGAa-3'		



**Table 3:** Serotype, sequence type, plasmid replicons, virulence genes,  $\beta$ -lactamase genes with their location on mobile genetic elements and other resistance genes of the 40 sequenced strains classified by sample type (1<sup>st</sup> campaign, 2<sup>nd</sup> campaign)

Sample type	Strain	Serotype	ST	Plasmid replicons	Virulence genes	$\beta$ -lactamase genes <sub>(mobile element)</sub>	Other resistance genes
Freshwaters	<u>H1</u>	O33:H4	ST117	IncFII	<i>chuA, fyuA, irp2, iss, terC, traT, astA, cea, ireA, lpfA, ompT, pic, vat</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-84</sub>	<i>dfrA1, aadA1, qacE, mph(A), aac(6')-Ib3, aac(6')-Ib-cr, sul1, catA1, erm(B)</i>
	<u>K26</u>	O86:H18	ST38	/	<i>afaD, air, chuA, eilA, fyuA, gad, hra, irp2, iss, kpsE, kpsMII_K5, terC</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14 (ISEc9)</sub>	<i>sul2, mph(A), aph(6)-Id, aph(3')-Ib, qacE, sul1</i>
	<u>Q22</u>	O25:H4	ST131	col156, IncFIA, IncFIB, IncFII	<i>chuA, fyuA, gad, irp2, iss, kpsE, kpsMII_K5, terC, traT, cea, ompT, sitA, usp, yfcV, senB, sat, mcbA, iha</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub>	<i>tet(A), sul2, dfra17, qacE, sitABCD</i>
	<u>T2</u>	H:20	ST2040	IncC, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncHI2, IncHI2A	<i>gad, terC, traT, lpfA, sitA</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-182</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY-6 (Tn6196 - IS682-ISA<sub>eme15</sub>)</sub> , <i>bla</i> <sub>DHA-1/7/24 (ISK<sub>pn14</sub>)</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1 (ISK<sub>pn14</sub>)</sub>	<i>aph(6)-Id, aadA1, catB3, qnrB9, tet(A), qnrB1, aac(3)-IId, aac(3)-Iia, catA1, aac(6')-Ib3, aac(6')-Ib-cr, sitABCD, dfra14</i>
	<u>T3</u>	O13/O129/O135	ST176	Col(IMGS31), Col(Ye449), Col156, Col440I, IncFIB, IncFII, IncX3	<i>gad, iss, terC, traT, celB</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-182</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3(Tn4401)</sub>	<i>qnrS1</i>
	<u>T7</u>	O13/O129/O135		Col(IMGS31), Col(pHAD28), Col156, Col440I, IncFII, IncX3	<i>gad, iss, terC, traT, celB</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-182</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3(Tn4401)</sub>	<i>qnrS1</i>
	<u>T8</u>	O128ac:H12	ST11028	IncFIB, IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncY	<i>gad, terC, traT, lpfA</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>sul1, ant(2'')-Ia, catB3, tet(D), catA2, aph(3')-Ia, tet(A), mph(A), dfra14, qnrB1, mcr-9, aac(3)-Iia, qacE, sul1, catA1, qnrA1, ant(2'')-Ia, aadA2b, dfra16, mcr-9</i>
	<u>U3</u>	O25:H12	ST607	IncFII, IncFIB, FII, IncHI2, IncHI2A, IncM1, IncX3	<i>gad, terC, lpfA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-182</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3(Tn4401)</sub>	<i>ant(2'')-Ia, aadA2b, dfra16, mcr-9</i>
<u>C1</u>	O153:H9	ST3268	IncFIB	<i>air, chuA, eilA, fyuA, gad, irp2, kpsE, kpsMII_K5, terC, cea, sitA,</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15 (ISK<sub>pn19</sub>-ISEc9)</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-35</sub>	<i>sul2, aph(6)-Id, mph(A), qnrS1, sitABCD</i>	

	<a href="#">H8</a>	O8:H17	ST88	IncFIA, IncFIB, IncFII	<i>iutA, iucC, afaC, papA_F11, papC, afaA, afaB, lpfA, mcmA</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	<i>aadA1, qacE, sul2, tet(B), aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, aph(3')-Ia, floR, sitABCD</i>
	<a href="#">I5</a>	O102:H6	ST405	IncB/O/K/Z, IncFIA, IncFIB, IncFII, p0111	<i>air, chuA, eilA, fyuA, gad, irp2, kpsE, kpsMII_K5, terC, traT, iutA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15 (ISEc9)</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1C</sub>	<i>tet(B), sul2, aph(6)-Id, floR</i>
	<a href="#">K9</a>	O86:H2	ST349	IncFIB, IncFII, IncI1-I	<i>ORF3, ORF4, afaD, aggA, aggC, aggD, aggR, air, chuA, eilA, fyuA, irp2, iss, kpsE, kpsMII_K5, terC, traT, cea, celB, aap, aar, aatA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15 (ISEc9)</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>DHA-1 (IS6100)</sub>	<i>qnrB4, qacE, sul2, tet(A), dfrA17</i>
	<a href="#">L9</a>	O102:H6	ST405	Col156, IncB/O/K/Z, IncFIA, IncFIB, IncII, p0111	<i>air, chuA, eilA, fyuA, gad, irp2, kpsE, kpsMII_K5, terC, traT, lpfA, iutA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15 (ISEc9)</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1C</sub>	<i>tet(B), sul2, aph(6)-Id, florR</i>
	<a href="#">U9</a>	O1:H15	ST38	Col(BS512), IncFIA, IncFIB, IncFII, IncX4	<i>afaD, air, chuA, eilA, fyuA, gad, hra, irp2, kpsE, kpsMII_K5, terC, traT, sitA, sat, iha, papA_F43, iutA, iucC, afaC, nfaE, afaA</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>tet(B), qacE, sitABCD</i>
	<a href="#">N17</a>	O128ac:H12	ST11028	IncFIB, IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncY	<i>gad, terC, traT, lpfA</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15 (ISEc11)</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	<i>catB3, tet(A), ant(2'')-Ia, aadA2b, qnrB1, aac(3)-Iia, catA2, aph(3')-Ia, sul1, qacE, aac(6')-Ib3, aac(6')-Ib-cr, aac(6')-29b, tet(D), mph(A), dfrA14, mcr-9</i>
Hospital/ community effluent (Input WWTP)	<a href="#">R12</a>	O86:H30	ST38	IncFIB, IncFII	<i>ORF3, ORF4, afaD, agg3D, agg5A, air, capU, chuA, eilA, fyuA, hra, irp2, iss, kpsE, kpsMII_K5, terC, traT</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15 (ISEc9)</sub>	<i>aadA1, dfrA1</i>
	<a href="#">N6</a>	O18:H7		IncFIB, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-182</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3 (Tn4401)</sub>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>
	<a href="#">N8</a>	O18:H7	ST1463	Col156, IncFIB, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA, celB</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-182</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3 (Tn4401)</sub>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>
	<a href="#">N9</a>	O18:H7		Col156, IncFIB, IncFII, IncHI1A, IncHI1B,	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA, celB</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-182</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3 (Tn4401)</sub>	-

			IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193			
<u>N10</u>	O18:H7		Col156, IncFIB, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA, celB</i>	<i>bla<sub>SHV-182</sub>, bla<sub>KPC-3(Tn4401)</sub></i>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>
<u>O3</u>	O128ac:H12	ST11028	Col(pHAD28), IncFIB, IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncY	<i>gad, terC, traT, lpfA</i>	<i>bla<sub>TEM-1B (ISEc9)</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>CTX-M-15 (ISEc9)</sub>, bla<sub>VIM-1</sub></i>	<i>catB3, tet(A), ant(2'')-Ia, aadA2b, qnrB1, aac(3)-Iia, catA2, aph(3')-Ia, sul1, qacE, aac(6')-Ib3, aac(6')-Ib-cr, aac(6')-29b, tet(D), mph(A), dfrA14, mcr-9</i>
<u>O5</u>	O18:H7	ST1463	IncFIB, IncFII, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA</i>	<i>bla<sub>SHV-12</sub>, bla<sub>KPC-3 (Tn4401)</sub></i>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>
<u>S5</u>	O16:H5		Col156, IncFIA, IncFIB, IncFII, IncY	<i>chuA, fyuA, gad, irp2, kpsE, kpsMII_K5, terC, traT, ompT, vat, usp, yfcV, sat, iha, papa_F43, iutA, iucC</i>	<i>bla<sub>CTX-M-15 (IS630)</sub>, bla<sub>OXA-244</sub></i>	<i>erm(B), dfrA17, qacE, sitABCD</i>
		ST131				
Treated effluent (Output WWTP)	<u>S9</u>	O16:H5	Col156, IncFIA, IncFIB, IncFII, IncY	<i>chuA, fyuA, gad, irp2, kpsE, kpsMII_K5, terC, traT, ompT, vat, usp, yfcV, sat, iha, papa_F43, iutA, iucC</i>	<i>bla<sub>CTX-M-15 (IS630)</sub>, bla<sub>OXA-244</sub></i>	<i>erm(B), dfrA17, qacE, sitABCD</i>
	<u>O1</u>	O18:H7	IncFIB, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA, celB</i>	<i>bla<sub>SHV-182</sub>, bla<sub>KPC-3(Tn4401)</sub></i>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>
	<u>O4</u>	O18:H7	Col156, IncFIB, IncFII, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA, celB</i>	<i>bla<sub>SHV-182</sub>, bla<sub>KPC-3(Tn4401)</sub></i>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>
	<u>O5</u>	O18:H7	Col156, IncFIB, IncFII, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA, celB</i>	<i>bla<sub>SHV-182</sub>, bla<sub>KPC-3(Tn4401)</sub></i>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>
	<u>O6</u>	O18:H7	Col156, IncFIB, IncFII, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA, celB</i>	<i>bla<sub>SHV-182</sub>, bla<sub>KPC-3</sub></i>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>

Freshwaters /bathing site	<a href="#">F19</a>	O86:H30	ST38	IncFIB, IncII	<i>ORF3, ORF4, afaD, agg3C, agg3D, agg5A, air, capU, chuA, eilA, fyuA, gad, hra, irp2, iss, kpsE, kpsMII_K5, terC, traT</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15 (ISEc9)</sub>	<i>aadA1, dfrA1</i>
	<a href="#">D12</a>	O8:H7	ST1642	IncFIA, IncFIB, IncFII	<i>gad, hra, terC, traT, cea, ireA, lpfA, sitA, iutA, iucC</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	<i>qacE, ant(2'')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(3'')-Ib, aph(3'')-Ia, aac(3)-Iid, mph(A), floR, dfrA36, sul2, tet(B), qnrS1, sitABCD, aadA2b, lnu(F)</i>
	<a href="#">G5</a>	O148:H30	ST2967	Col(IMGS31), IncFIB, IncR	<i>gad, terC</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15 (ISEc9)</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>catB3, tet(A), dfrA14, qnrB1, aac(3)-Iia</i>
Hospital effluent	<a href="#">V5</a>	O16:H5	ST131	Col156, IncFIA, IncFIB, IncFII	<i>afaD, chuA, fyuA, irp2, kpsE, kpsMII_K5, terC, traT, ompT, sitA, usp, yfcV, senB, sat, iha, papA_F43, iutA, iucC, afaC, nfaE</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15(ISEc9)</sub>	<i>aph(6)-Id, sul2, aac(3)-Iid, mph(A), qacE, sitABCD</i>
	<a href="#">V7</a>	O18:H7	ST1463	IncFIB, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-182</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3 (IncX3, Tn4401)</sub>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>
	<a href="#">V12</a>	O18:H7		Col156, IncFIB, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA, celB</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-182</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3 (IncX3)</sub>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>
	<a href="#">V13</a>	O16:H5	ST131	Col156, IncFIA, IncFIB, IncFII	<i>afaD, chuA, fyuA, irp2? kpsE, kpsMII_K5, terC, traT, ompT, sitA, usp, yfcV, senB, sat, iha, papA_F43, iuA, afaD, chuA, fyuA, irp2, kpsE, kpsMII_K5, terC, traT, ompT, sitA, usp, yfcV, senB, sat, iha, papA_F43, iuA, iucC, afaC, nfaE</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15(ISEc9)</sub>	<i>tet(A), sul2, aac(3)-Iid, dfrA17, qacE, sitABCD</i>
	<a href="#">V14</a>	O18:H7	ST1463	Col156, IncFIB, IncFII, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA, celB</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3 (Tn4401)</sub>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>
	<a href="#">V1</a>	O13/O129/O135	ST176	Col(IMGS31), Col(Ye4449), Col4401, IncFIB, IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncX3	<i>gad, iss, terC, traT, celB</i>	<i>bla</i> <sub>KPC-3(Tn4401)</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-182</sub>	<i>qnrS1, qacE, sul1, qnrA1, aadA2b, ant(2'')-Ia, dfrA16, catA1, mcr-9</i>

<u>V2</u>	O13/O129/O135		Col(IMGS31), Col156, Col4401, IncFIB, IncFII, IncX3	<i>gad, iss, terC, traT, celB</i>	<i>bla<sub>KPC-3(Tn4401)</sub>, bla<sub>SHV-182</sub></i>	<i>qnrS1</i>
<u>V9</u>	O18:H7		IncFIB, IncFII, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, lpfA</i>	<i>bla<sub>KPC-3(Tn4401)</sub>, bla<sub>SHV-11</sub></i>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>
<u>V10</u>	O18:H7	ST1463	Col156, IncFIB, IncHI1A, IncHI1B, IncX3, IncX6, pKPC-CAV1193	<i>fyuA, gad, irp2, terC, traT, lpfA, celB</i>	<i>bla<sub>KPC-3(Tn4401)</sub>, bla<sub>SHV-182</sub></i>	<i>ant(2'')-Ia, qacE</i>

1st campaign

2nd campaign

---

## Section expérimentale

### Etude 4 :

Etude et caractérisation des *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* productrices de carbapénémases isolées de l'environnement aquatique

---

## ***Préambule***

La résistance aux carbapénèmes est problématique car cette classe d'antibiotiques, appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines, est utilisée en dernier recours dans les hôpitaux en médecine humaine.

En vue de découvrir si des bactéries résistantes aux carbapénèmes étaient présentes dans les eaux wallonnes, un screening sur plusieurs types d'eau a été entrepris : 29 eaux de baignade, 20 eaux de surface et 3 continuums hospitaliers ont été échantillonnés en 2022. Aucune *E. coli* ou *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes (CRE) n'ont pu être isolées à partir des eaux de baignades, ce qui démontre leur relative bonne qualité. Par contre, 24 *E. coli* et 27 *K. pneumoniae* CRE ont été isolées à partir d'eaux de surface et de continuums hospitaliers.

Des tests phénotypiques incluant des tests de combinaison de disque pour identifier la classe d'Ambler, des tests génotypiques (PCR en temps réel des gènes *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>) et immunochromatographiques ont été mis en œuvre pour les caractériser.

Un panel de 26 souches (11 *E. coli* et 15 *K. pneumoniae* CRE) a été séquencé et toutes les souches possédaient des gènes CPE - *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=14), *bla*<sub>OXA-48</sub> (n=9), *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=1) and *bla*<sub>NDM-5</sub> (n=1) - majoritairement couplés à des gènes codant pour des BLSE.

L'article concernant cette étude est en cours de préparation.

- **Introduction**

Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (CRE) peuvent être responsables d'infections dangereuses car les carbapénèmes sont de puissants antibiotiques de dernier recours, efficaces contre les infections causées par des bactéries multirésistantes. Le premier carbapénème, l'imipénème, a été mis sur le marché en 1985, et peu après, le méropénème, le biapénème, l'ertapénème et le doripénème ont été mis au point (Mills and Lee, 2019).

Les carbapénèmes sont des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, qui se lient à des enzymes pour inhiber la synthèse de la paroi cellulaire, tuant ainsi efficacement les bactéries (Papp-Wallace et al., 2011).

L'isolement de CRE est croissant dans le monde entier et les plus dangereuses sont connues pour produire des enzymes appelées carbapénémases (Iovleva and Doi, 2017).

Les carbapénémases de type KPC décrites tout d'abord aux États-Unis chez *Klebsiella* ont une diffusion mondiale avec une endémicité marquée également en Israël et en Grèce. Les carbapénémases de type métallo-enzymes (VIM, IMP...) ont été également décrites dans le monde entier avec une forte prévalence en Europe du Sud et en Asie. OXA-48 est l'une des carbapénémases les plus récemment décrites, structurellement différente des précédentes et essentiellement identifiée dans des pays méditerranéens. Les gènes de ces carbapénémases sont le plus souvent plasmidiques, rencontrés majoritairement dans des souches hospitalières de *K. pneumoniae* mais leur diffusion communautaire a déjà été rapportée (Nordmann and Carrer, 2010).

Cherak et collaborateurs (2021) ont réalisé une revue bibliographique concernant les bactéries à Gram négatif productrices de CP isolées de l'environnement aquatique (eaux de STEP et usées, effluents hospitaliers, eaux de surface, de mer et potables). Des entérobactéries (dont notamment *E. coli* et *K. pneumoniae*) produisant des CP de classe A (avec prédominance de KPC), de classe B (NDM, IMP et VIM) et de classe D (avec prédominance d'OXA-48) ont été mises en évidence dans de nombreux pays. La seule étude référencée en Belgique concernait le dosage de gènes de carbapénémases (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* et *bla<sub>OXA-48</sub>*) dans des échantillons d'eau prélevés sur une période d'un an dans un continuum hôpital – STEP – rivière Zenne (Belgique) (Proia et al., 2018).

Notre étude vise à élargir les connaissances dans le domaine en Belgique en étudiant la présence d'*E. coli* ou *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes dans les eaux wallonnes via un screening sur différents types d'eaux (eaux de baignade, eaux de surface et continums hospitaliers).



- **Matériel et méthode**

1. **Choix des points d'échantillonnage**

Une sélection de 29 eaux de baignade a été prélevée durant la saison de baignade en 2022 (tableau 7 et figure 17) ainsi que 20 eaux de surface (tableau 8 et figure 18) et 3 continuums hospitaliers (tableau 9).

Tableau 7 : Liste des codes stations et localisation des 29 points d'eau de baignade.

<b>Code</b>	<b>Localisation</b>	<b>Code</b>	<b>Localisation</b>
H10	Semois à Florenville	F03	Etangs de Recht à Saint Vith
H34	Semois à Bouillon - Pont de France	F26	Centre de Worriken à Butgenbach
I11	Semois à Alle-sur-Semois	F01	Lac de Roberville
H03	Lac de Neufchâteau	I02	Lac du Ry Jaune à Cerfontaine
H05	Etang de Libramont	I01	Lac de Falemprise à Cerfontaine
H02	Etang de Saint-Léger	I03	Lac de la Plate-Taille à Cerfontaine
H01	Etang du Rabais à Virton	I04	Lac de Bambois Fosses-la-Ville
I16	Lesse à Houyet	E04	Grand Large à Péronnes à Antoing
I15bis	Lesse à Hulsommaux	E03	Grand Large à Nimy à Mons
I14	Lesse à Pont à Lesse	E02	Lac de Claire-Fontaine à Chapelle-lez-Herlaimont
H23	Ourthe à Maboge	E05	La Marlette à Seneffe
H35	Ourthe à Hotton	B04	Plage de Renipont à Lasne
I13	Ourthe à Noiseux	VIELS	Lac des Doyards à Vielsalm
H06	Lac de Chérapont à Gouvy	HMA	Meuse Jambes Caserne
Remy	Etang Rémy		

Tableau 8 : Liste des codes stations et localisation des 20 eaux de surface.

<b>Code</b>	<b>Localisation</b>	<b>Code</b>	<b>Localisation</b>
360	Escaut à Brunehaut	12161	Ruisseau de Sainte-Julienne à Visé
1270	Dendre à Ath	40073	Dendre occidentale à Ath
1281	Dendre à Lessines	40154	Rigole d'Awans à Awans
1395	Senne à Rebecq	50099	Dyle à Ottignies-Louvain-la-Neuve
1440	Hain à Tubize	50130	Geer à Oreye
2280	Haine canalisée à Hensies	4513	Salm à Trois-ponts
3833	Ruisseau des Gouttes à Libramont-Chevigny	3294	Meuse à Liège
4130	Mehaigne à Wanze	50080	Ywenne à Houyet
4580	Vesdre à Pepinster	2390	Canal du centre à Mons
4722	Geer à Bassenge	3190	Meuse à Hastière-Lavaux



Figure 17 : Carte reprenant les 29 points d'eau de baignade analysés.



Figure 18 : Carte reprenant les 20 eaux de surface analysées.

Tableau 9 : Date de prélèvement, continuums hospitaliers et échantillons prélevés et analysés.

Date	Continuum	Echantillons
20/06/2022	Hôpital C (438 lits) – STEP – Meuse	Effluent Hôpital C
		Entrée STEP
		Sortie STEP
		Amont STEP dans la Meuse
		Aval STEP dans la Meuse
08 et 09/08/2022	Hôpital A (635 lits) et hôpital B (226 lits) – STEP – Ourthe	Effluent Hôpital A
		Entrée STEP de Tilff
		Sortie STEP de Tilff
		Amont STEP de Tilff dans l'Ourthe
		Aval STEP de Tilff dans l'Ourthe
		Effluent Hôpital B
		Entrée STEP d'Angleur
		Sortie STEP d'Angleur
		Amont STEP d'Angleur dans l'Ourthe
		Aval STEP d'Angleur dans l'Ourthe
17/10/2022	Hôpital D (539 lits) – STEP – Sambre	Hôpital D (rejet Fosse aile C)
		Hôpital D (rejet aile F-Sortie Parking)
		Entrée STEP de Montignies sur Sambre
		Sortie STEP de Montignies sur Sambre
		Amont STEP de Montignies dans la Sambre
		Aval STEP Montignies dans la Sambre

## 2. Dénombrement, isolement et confirmation des *E. coli* et *K. pneumoniae*

Les dénombrements par filtration sur membrane sont réalisés pour deux dilutions successives selon les modalités définies au § 9.1.8.2. de l'ISO 8199 (2018) et exprimé en nombre d'UFC/100 ml.

Le milieu CHROMagar mSuperCARBA (CHROMagar, Paris, France) est utilisé pour le dénombrement des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, y compris les producteurs d'OXA-48. Les *E. coli* CRE sont des colonies roses foncées à rougeâtres tandis que les *K. pneumoniae* font partie des KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) qui apparaissent comme des colonies bleues métalliques.

Pour *E. coli*, l'espèce bactérienne a été confirmée par les tests oxydase (négative) et indole (positive). Si ces deux premiers tests étaient concluants, une galerie API 20 E (Biomérieux, Craponne, France) était réalisée et mise à incuber à  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant  $21 \pm 3\text{h}$ .

Pour *K. pneumoniae*, un test en tube Miomedium, basé sur la détection de 3 caractéristiques (motilité (-), production d'indole (-) et décarboxylation de l'ornithine (-)) a été réalisé avant confirmation par galerie API 20 E.

### 3. Test phénotypique

Les pastilles du kit KPC&MBL&OXA-48 disk kit (Liofilchem, Italie) ont été placées dans un antibiogramme.

### 4. Test génotypique

Une PCR en temps réel permettant la mise en évidence des principaux gènes codant pour des carbapénémases (*bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>) a été reprise de l'article de Hooban et collaborateurs (2021) et adaptée pour une utilisation avec du SYBR green.

### 5. Test immunochromatographique à flux latéral

Un test de diagnostic rapide *in vitro* (O. K. N. V. I. RESIST-5, Coris Bioconcept, Gembloux, Belgique) pour la détection des carbapénémases OXA-48, KPC, NDM, VIM et IMP à partir de cultures bactériennes a été mis en œuvre.

### 6. Séquençage du génome

Un total de 26 souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* ont été sélectionnées selon leur profil phénotypique et génotypique pour être séquencées selon les mêmes modalités qu'à la 3<sup>ème</sup> étude de ce travail, à la plateforme de génomique du GIGA-Ulège. Le kit d'extraction de l'ADN utilisé est le NucleoSpinR Microbial DNA de Macherey-Nagel (Düren, Allemagne). La détermination des sérotypes de *K. pneumoniae* a été réalisée via l'application Kaptive (<https://kaptive-web.erc.monash.edu/>).

- **Résultats**

1. **Isolement des *E. coli* et *K. pneumoniae* CRE**

Au total, 24 *E. coli* CRE et 27 *K. pneumoniae* CRE ont pu être isolées lors de ce screening (tableau 10).

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des isollements de *E. coli* et *K. pneumoniae* CRE (entérobactéries résistantes aux carbapénèmes).

Type d'échantillons	Nombre d' <i>E. coli</i> CRE isolées	Nombre de <i>K. pneumoniae</i> CRE isolées
29 eaux de baignade	0	0
20 eaux de surface	4	7
Continuum hospitalier (hôpital A et B) dans le bassin de l'Ourthe	19	7
Continuum hospitalier (hôpital C) dans le bassin de la Meuse	0	2
Continuum hospitalier (hôpital D) dans le bassin de la Sambre	1	11
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>27</b>

2. **Comparaison des résultats obtenus par les tests phénotypiques, génotypiques et immunochromatographiques**

Différents tests ont été appliqués aux 24 isolats d'*E. coli* CRE et aux 27 isolats de *K. pneumoniae* CRE afin de déterminer quelle carbapénémase était produite. Le tableau 11 reprend la comparaison des résultats obtenus par les tests phénotypiques, génotypiques et immunochromatographiques (Test O. K. N. V. I. RESIST-5).

Tableau 11 : Comparaison des résultats des tests phénotypiques, génotypiques et immunochromatographiques.

Localisation	Code	Test phénotypique	Test génotypique	Test immunochromatographique
<i>Escherichia coli</i> (24) :		Gène		
Hôpital A	/-2/6r	KPC	KPC	KPC
	/-2/10r			
	/-2/7r			
	/-2/8r			
	/-2/9r			
	/-2/1r			
	/-2/2r			
	/-2/3r			
	/-2/4r			
	/-2/5r			
	/-3/3r			
	/-3/2r			
	/-3/4r			
	/-3/5r			
	/-3/6r			
	/-3/7r			
ESU	12161/1r	OXA	OXA	OXA
	1440/1r	KPC (ou OXA)	OXA	OXA
	3294/1r	KPC	KPC	KPC
	4722/1r	OXA	OXA	OXA
Ourthe Aval STEP Tilff	Bt/1r	KPC	KPC	KPC
Ourthe Aval STEP Tilff	Bt/5r	KPC	KPC	KPC
Sambre Amont	Am-c/1r	OXA	OXA	OXA
Sortie STEP Tilff	OUTt/1ml/4r	KPC	KPC	KPC

Localisation	Code	Test phénotypique	Test génotypique	Test O. K. N. V. I. RESIST-5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (27) :		Gène		
Hôpital A	/-2/3b	OXA	RIEN	RIEN
	/-3/2b	MBL	NDM	NDM
Entrée STEP Tilff	INt/7b	KPC	KPC	KPC
Entrée STEP Montignies	INm-c/-1/1b	KPC	KPC	KPC
Entrée STEP Montignies	INm-c/-1/2b	KPC	KPC	KPC
ESU	1440/1b	OXA	OXA	OXA
	1440/200ml/1b*	OXA	RIEN	RIEN
	2280/9b	MBL	VIM	VIM
	3294/3b	KPC	KPC	KPC
	4722/1b	OXA	OXA	OXA
	1395/2b	OXA	OXA	OXA
	1395/3b	OXA	OXA	OXA
Hôpital D aile F	HMCf/-2/1b	OXA	OXA	OXA
	HMCf/-2/2b	KPC	KPC	KPC
	HMCf/2/5b	OXA	OXA	OXA
	HMCf/-3/3b	KPC	KPC	KPC
Ourthe Amont STEP Grosses Battes	Ag,b/3b	KPC	KPC	KPC
Ourthe Aval STEP Tilff	Bt/3b	KPC	KPC	KPC
Ourthe Aval STEP Grosses Battes	Bg,b/3b	OXA	RIEN	RIEN
Sambre Aval	Bm-c/3b	KPC	KPC	KPC
	Bm-c/7b	KPC	KPC	KPC
Sortie STEP Tilff	OUTt/1ml/3b	KPC	KPC	KPC
Sortie STEP Montignies	OUTm-c/1b	RIEN	RIEN	RIEN
	OUTm-c/10b	OXA	OXA	OXA
	OUTm-c/7b	RIEN	RIEN	RIEN
Hôpital C	/1b	OXA	OXA	OXA
	/-1/5b	OXA	OXA	OXA



### 3. Distribution des CP

- Pour les 24 *E. coli* CRE :

Au total, 20 souches possédaient le gène *bla<sub>KPC</sub>* et 4 le gène *bla<sub>OXA-48</sub>*. A noter que les 16 isolats provenant de l'effluent de l'hôpital A possédaient tous le gène *bla<sub>KPC</sub>* (Figure 19).

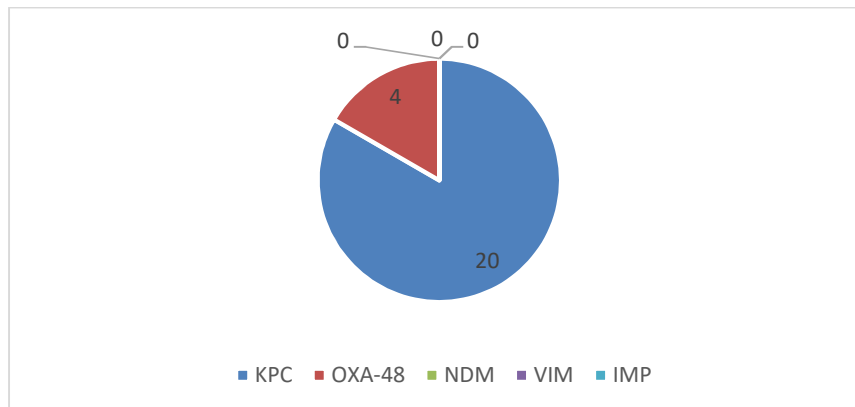


Figure 19 : Répartition des gènes *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* pour les 24 *E. coli* CRE.

- Pour les 27 *K. pneumoniae* CRE :

Des 27 *K. pneumoniae* isolées, 11 possédaient le gène *bla<sub>KPC</sub>*, 9 le gène *bla<sub>OXA-48</sub>*, un *bla<sub>NDM</sub>*, un *bla<sub>VIM</sub>* et 5 ne possédaient aucun des gènes testés (noté « Autre ») (Figure 20).

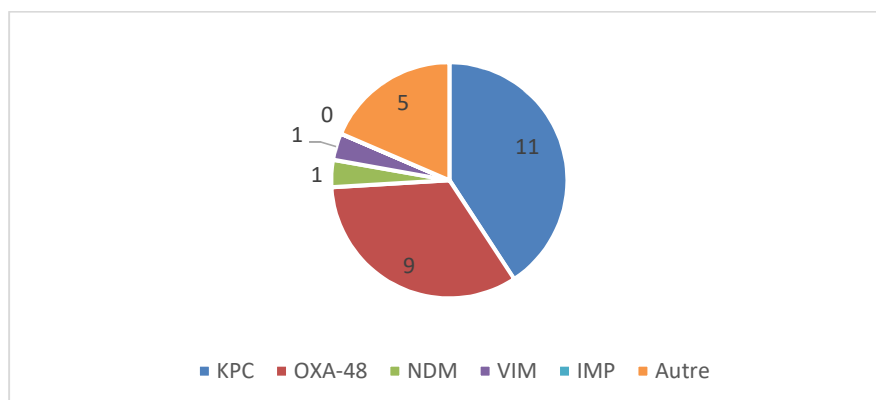


Figure 20 : Répartition des gènes *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* pour les 27 *K. pneumoniae* CRE.

#### 4. Résultats du séquençage

Un panel de 26 souches (11 *E. coli* et 15 *K. pneumoniae* CRE) a été séquençé. Les espèces bactériennes révélées avec les galeries API 20 E ont été confirmées par SpeciesFinder. Toutes ces souches possédaient des gènes CPE - *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=14), *bla*<sub>OXA-48</sub> (n=9), *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=1) and *bla*<sub>NDM-5</sub> (n=1) - majoritairement couplés à des gènes codant pour des BLSE.

Différents sérotypes ont été détectés. Trois souches d'*E. coli* ont été classées dans le sérotype O18:H7 appartenant au ST1463. Il était prédominant avec 14 souches isolées à partir d'effluent hospitalier ou d'effluent traité dans la 3<sup>ème</sup> étude de ce travail. Une souche de ce sérotype a été isolée de la Meuse à Liège.

Le tableau 12 reprend le détail des isolats, leur localisation, les sérotypes, le MLST et cgMLST obtenus. Les tableaux 13 et 14 présentent, par type d'eaux (origine), le nombre d'isolats, les types séquentiels (ST), les réplicons plasmidiques, les gènes de virulence et les gènes BLSE détectés.

Tableau 12 : Code des souches, localisation, sérotypes, MLST et cgMLST.

Souches		Localisation	Sérotypes	MLST	cgMLST
<i>E. coli</i>					
1	/-2/7r	Hôpital A	H25	635	67548
2	/-2/2r		O18:H7	1463	103730
3	/-2/5r		O18:H8	1463	103730
4	/-3/6r		O21:H25	401	97525
8	12161/1r	ESU - Ruisseau de Sainte-Julienne à Visé	O86:H18	38	180160
9	1440/1r	ESU - Hain à Tubize	O105:H10	607	100707
10	3294/1r	ESU - Meuse à Liège	O18:H7	1463	103730
11	4722/1r	ESU - Geer à Bassenge	H21	10	184324
19	Bt/1r	Ourthe Aval STEP Tilff	O25:H12	607	149
20	Am-c/1r	Sambre Amont	O86:H30	38	155495
23	OUTt/1ml/4r	Sortie STEP Tilff	O18:H7	1463	103730
<i>K. pneumoniae</i>					
5	/-3/2b	Hôpital A	K51/O3b	16	-
6	INt/7b	Entrée STEP Tilff	O2afg	512	-
7	INm-c/-1/2b	Entrée STEP Montignies	K38/O3b	11	-
12	1440/1b	ESU - Hain à Tubize	K17/O1	101	-
13	2280/9b	ESU - Haine canalisée à Hensies	K46/O1	461	-
14	3294/3b	ESU - Meuse à Liège	O5	3318	-
15	4722/1b	ESU - Geer à Bassenge	K24/O1	15	-
16	HMCf/-2/2b	Hôpital D aile F	K38/O3b	1486	-
17	HMCf/-2/5b	Hôpital D aile F	K10/O3/O3a	147	-
18	Ag,b,/3b	Ourthe Amont STEP Grosses Battes	/	1770	-
21	Bm-c/7b	Sambre Aval	K38/O3b	11	-
22	1395/3b	ESU - Senne	K27/O4	392	-
24	OUTt/1ml/3b	Sortie STEP Tilff	O2afg	512	-
25	OUTm-c/10b	Sortie STEP Montignies	K10/O3/O3a	147	-
26	/1b	Hôpital C	K13/O1	540	-

Tableau 13 : Origine, nombre d'isolats, séquences types, réplicons plasmidiques, gènes de virulence et gènes BLSE détectés pour les 11 *E. coli* séquencées.

Origine	Nombre d'isolats	ST	Réplicons plasmidiques	Gènes de virulence	Gènes
Eau de surface	6	ST1463 (1), ST10 (1), ST607 (2), ST38 (1)	IncFII (1), IncFIB(K) (2), IncN (1), IncX3 (2), IncX6 (2), Col156 (2), IncHI1A(NDM-CIT) (1), IncHI1B(pNDM-CIT) (1), IncHI1B(pNDM-MAR) (1), pKPC-CAV1193 (1), repB(R1701) (2), Col440I (1), IncFIB(AP001918) (1), IncFIB(H89-PhagePlasmid) (1), IncX1 (1), IncY (1), IncFII(Yp) (1), IncL (1), p0111 (1), IncR (1)	<i>clpK1</i> (2), <i>clpK2</i> (1), <i>csgA</i> (1), <i>fimH</i> (5), <i>fuya</i> (3), <i>gad</i> (6), <i>irp2</i> (3), <i>ipfA</i> (3), <i>nlpl</i> (6), <i>terC</i> (6), <i>yehA</i> (4), <i>yehB</i> (6), <i>yehC</i> (6), <i>yehD</i> (6), <i>hlyE</i> (6), <i>fdeC</i> (5), <i>ColE7</i> (1), <i>anr</i> (1), <i>cba</i> (1), <i>hha</i> (2), <i>traT</i> (1), <i>Shia</i> (1), <i>kpsMIII_K5</i> (2), <i>kpsE</i> (2), <i>iss</i> (2), <i>faeF</i> (1), <i>eilA</i> (2), <i>eata</i> (2), <i>csgA</i> (4), <i>chuA</i> (2), <i>astA</i> (2), <i>afaE</i> (1), <i>colE2-like</i> (2)	<i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i> (1), <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i> (1), <i>bla<sub>KPC-3</sub></i> (2), <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> (3), <i>bla<sub>OXA-244</sub></i> (1), <i>bla<sub>SHV-12</sub></i> (1)
Effluent traité (sortie de STEP)	1	ST1463 (1)	IncX3 (1), IncX6 (1), Col156 (1), IncHI1A(NDM-CIT) (1), IncHI1B(pNDM-CIT) (1), IncHI1B(pNDM-MAR) (1), pKPC-CAV1193 (1), IncFIB(pNDM-Mar) (1)	<i>clpK1</i> (1), <i>fimH</i> (1), <i>fuya</i> (1), <i>gad</i> (1), <i>irp2</i> (1), <i>ipfA</i> (1), <i>nlpl</i> (1), <i>terC</i> (1), <i>yehA</i> (1), <i>yehB</i> (1), <i>yehC</i> (1), <i>yehD</i> (1), <i>hlyE</i> (1), <i>fdeC</i> (1), <i>csgA</i> (1), <i>colE2-like</i> (1)	<i>bla<sub>KPC-3</sub></i> (1)
Effluent hospitalier	4	ST635 (1), ST1463 (2), ST401 (1)	IncFII (1), IncFIB(K) (2), IncN (1), IncX3 (4), IncX6 (4), Col156 (2), IncHI1A(NDM-CIT) (2), IncHI1B(pNDM-CIT) (2), IncHI1B(pNDM-MAR) (2), IncFII(K) (1), Col440II (1), IncFIA(HI1) (1), IncHI1A (1), IncHI1B(R27) (1), repA(pKOX) (1), pKPC-CAV1193 (2), repB(R1701) (1), IncFIB(pNDM-Mar) (1), Col440I (1)	<i>clpK1</i> (2), <i>clpK2</i> (4), <i>csgA</i> (3), <i>fimH</i> (4), <i>fuya</i> (3), <i>gad</i> (4), <i>irp2</i> (3), <i>ipfA</i> (4), <i>nlpl</i> (4), <i>terC</i> (4), <i>yehA</i> (4), <i>yehB</i> (4), <i>yehC</i> (4), <i>yehD</i> (4), <i>hlyE</i> (3), <i>fdeC</i> (3), <i>csgA</i> (1), <i>colE2-like</i> (1)	<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i> (2), <i>bla<sub>KPC-3</sub></i> (4)

Tableau 14 : Origine, nombre d'isolats, séquences types, réplicons plasmidiques et gènes BLSE détectés pour les 15 *K. pneumoniae* séquencées.

Origine	Nombre d'isolats	ST	Réplicons plasmidiques	Gènes
Eau de surface	7	ST101 (1), ST461 (1), ST3318 (1), ST15 (1), ST 1770 (1), ST11 (1), ST392 (1)	IncFIB(K) (3), IncN (1), IncFII(K) (1) repB(R1701) (1), Col440I (3), Col440II (1), IncFIA(HI1) (1), IncFIB(pQil) (1), ColRNAI (1), IncFII(Yp) (1)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (3), <i>bla</i> <sub>TEM-1A</sub> (3), <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> (1), <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub> (3), <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> (2), <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> (2), <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> (3), <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> (1), <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> (1), <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> (2), <i>bla</i> <sub>SHV-67</sub> (1), <i>bla</i> <sub>SHV-106</sub> (2)
Effluent hospitalier/communautaire (entrée de STEP)	2	ST512 (1), ST11 (1)	IncFIB(K) (2), IncFII(K) (2), Col440I (1), IncFIB(pQil) (1), ColRNAI (2), IncFII(Yp) (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1A</sub> (1), <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> (1), <i>bla</i> <sub>TEM-104</sub> (1), <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub> (2), <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> (2)
Effluent traité (sortie de STEP)	2	ST512 (1), ST147 (1)	IncFIB(K) (1), IncFII(K) (1), IncHI1B(pNDM-MAR) (1), IncFIB(pQil) (1), ColRNAI (1), IncL (1), IncR (1), Col(pHAD28) (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> (1), <i>bla</i> <sub>TEM-104</sub> (1), <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub> (1), <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub> (1), <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> (1), <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> (1), <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> (1), <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> (1), <i>bla</i> <sub>SHV-67</sub> (1)
Effluent hospitalier	4	ST16 (1), ST1486 (1), ST147 (1), ST540 (1)	IncN (1), IncX3 (1), IncFII(K) (4), repB(R1701) (1), IncFIB(pNDM-Mar)(2), Col440I (1), IncFIA(HI1) (1), IncFIB(pQil) (2), IncL (1)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (3), <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> (2), <i>bla</i> <sub>TEM-1C</sub> (1), <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub> (1), <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> (3), <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> (1), <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> (2), <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> (1), <i>bla</i> <sub>SHV-26</sub> (2), <i>bla</i> <sub>SHV-42</sub> (1), <i>bla</i> <sub>SHV-67</sub> (1), <i>bla</i> <sub>SHV-78</sub> (2), <i>bla</i> <sub>SHV-98</sub> (2), <i>bla</i> <sub>SHV-106</sub> (1), <i>bla</i> <sub>SHV-145</sub> (2), <i>bla</i> <sub>SHV-179</sub> (2), <i>bla</i> <sub>SHV-194</sub> (2), <i>bla</i> <sub>SHV-199</sub> (2), <i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> (1)

- **Discussion**

Dans cette quatrième étude, aucun isolement d'*E. coli* et *K. pneumoniae* CRE n'a pu être réalisé à partir d'eaux de baignade tandis que cela a été possible à partir de 6 échantillons d'eaux de surface sur les 20 prélevés. Ces 20 eaux de surface avaient été préalablement sélectionnées sur base de leur activité oestrogénique (données fournies par la cellule écotoxicité de l'ISSeP). Les six eaux de surface à partir desquelles des *E. coli* et *K. pneumoniae* CRE ont pu être isolées sont le Hain à Tubize, la Haine canalisée à Hensies, la Meuse à Liège, le Geer à Bassenge, la Senne à Quenast et le ruisseau de Sainte-Julienne à Visé. Le Hain est une petite rivière qui s'écoule à l'ouest du Brabant Wallon en milieu très urbain avec des hôpitaux dans le bassin. La Haine canalisée, affluent de l'Escaut, reçoit les effluents de la STEP de Wasmuel qui recueille toutes les eaux usées de Mons en amont (250000 E.H.). La Meuse à Liège est située dans une zone industrialisée et peuplée. A Bassenge, la STEP de Wonck n'était pas terminée à l'époque des prélèvements.

Des *E. coli* et *K. pneumoniae* CRE ont également été isolées à partir des trois continuums hospitaliers. Le rôle des effluents hospitaliers dans la dispersion de l'antibiorésistance est intéressant à étudier car Khan et collaborateurs (2018) avaient comparé le profil de deux *Klebsiella* CPE isolées de l'environnement aquatique en Suède par rapport à des isolats hospitaliers et ils suggéraient leur dispersion du milieu hospitalier vers l'environnement aquatique.

Au total, 24 *E. coli* et 27 *K. pneumoniae* CRE ont pu être isolés. Lors des tests phénotypiques (antibiogramme), tous les isolats présentaient un profil phénotypique de suspicion de production de CP. Seules deux souches de *K. pneumoniae* n'étaient pas identifiées comme productrices de BLSE.

Trois techniques ont été utilisées pour connaître les principaux gènes (gènes *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*) impliqués dans la production de CP. Ils ont tout d'abord pu être déduits à partir des résultats de l'antibiogramme via les pastilles du kit KPC&MBL&OXA-48. Ensuite, des tests génotypiques (PCR) et des tests immunochromatographiques ont été réalisés sur chaque isolat.

Le test diagnostic rapide *in vitro* (O. K. N. V. I. RESIST-5) utilisé dans notre étude (test immunochromatographique) a été évalué par Song et collaborateurs (2020) sur 65 souches d'entérobactéries, la sensibilité et spécificité étaient de 97,8% et 100% respectivement. Il n'y a que pour une souche de *K. pneumoniae* qui co-produisait NDM-1 et OXA-232 que le test n'avait pas fonctionné.

Une seule discordance de résultat pour les *E. coli* CRE est mise en évidence pour l'isolat 1440/1r (Hain à Tubize) (tableau 11). L'antibiogramme laissait la possibilité de déduire la présence d'une carbapénémase KPC ou OXA (il y avait 6 mm de différence entre le disque de mérépénème et celui de

méropénème + acide phénylboronique) et le diamètre d'inhibition de la témocilline était < 11 mm. La PCR en temps réel et le test rapide ont montré qu'il s'agissait d'une carbapénémase OXA. Cette souche a été séquencée et elle possède le gène OXA-48 mais pas de gène KPC.

Pour les *K. pneumoniae*, au tableau 11, les résultats des 3 tests coïncident. Il y a 3 souches pour lesquelles le test phénotypique laissait penser à une production d'une carbapénémase OXA car le diamètre d'inhibition à la témocilline était <11mm (dernier critère du kit) mais la PCR et le test rapide n'ont pas mis en évidence un des 5 principaux gènes étudiés.

Par contre, il y a deux souches isolées pour lesquelles le test phénotypique ne permettait pas de déduire le gène codant pour une carbapénémase, ce qui a été confirmé par PCR et test rapide.

Une sélection de 11 *E. coli* et 15 *K. pneumoniae* CRE à séquencer a été réalisée sur base des résultats obtenus aux antibiogrammes.

Différents sérotypes et types séquentiels ont été obtenus :

- Pour *E. coli* :

-trois souches de sérotype O18:H7 avec ST 1463 ont été retrouvées. Lors de la 3<sup>ème</sup> étude de ce travail, 14 clones possédant ce sérotype avaient été identifiés dans les effluents hospitaliers de l'hôpital A, en entrée de la STEP de Tilff ainsi qu'à sa sortie. Dans cette quatrième étude, ce clone est détecté dans l'effluent de l'hôpital A, un autre à la sortie de la STEP de Tilff et le troisième dans la Meuse à Liège. Une hypothèse serait que ce clone proviendrait de l'effluent de l'hôpital A et serait disséminé dans la STEP et ensuite en aval dans l'Ourthe puis jusqu'à la Meuse.

-il n'y a pas d'*E. coli* ST 131 identifiée comme c'était le cas dans la 3<sup>ème</sup> étude de ce travail. Par contre, deux souches d'*E. coli* ST 38 et une ST 10 ont été isolées comme en Irlande (Hooban et al., 2021).

- Pour *K. pneumoniae* :

-quatre souches possèdent le sérotype O1 qui est associé avec de la multirésistance (Choi et al., 2020) tandis qu'aucune souche de sérotype K1 et K2 associés à de l'hypermultiplicité n'a été isolée (Follador et al., 2016).

-deux souches ST11 sont retrouvées, à l'entrée de la STEP de Montignies et dans la Sambre. Ce sérotype avait été retrouvé en Irlande avec deux isolats ST11 provenant de plans d'eau et qui possédaient le gène *bla<sub>OXA-48</sub>* portés par des plasmides pOXA-48 (Hooban et al., 2021).

-une souche ST16 a été isolée de l'effluent de l'hôpital A. Il s'agit d'un clone émergent : De Sales et collaborateurs (2022) ont réalisé une analyse génomique complète de la lignée émergente de *K. pneumoniae* ST16 par rapport à la virulence et la résistance aux antimicrobiens et l'ont comparé avec la souche clinique *K. pneumoniae* ST11. Bien que les ST11 et ST16 présentent des scores de virulence similaires, la ST11 a été davantage étudiée et associée à une hyper-virulence, comme la souche ST11-KL64 signalée en Chine, porteuse des gènes de virulence *rmpA/rmpA2*, *iucABCD* et *iutA* (aérobactine) (Zhang et al., 2022). Compte tenu de la propagation mondiale de la souche ST11 et des similitudes avec la souche ST16 en termes de virulence et de résistance aux antibiotiques, ce clone émergent a le potentiel de devenir un clone épidémique mondial à double risque et une menace majeure pour la santé publique.

-deux *K. pneumoniae* ST512 possédant le gène *bla<sub>KPC-3</sub>* ont été détectées en entrée/sortie de la STEP de Tilff et une *K. pneumoniae* ST101 a été détectée en eau de surface dans l'Hain à Tubize. Oteo et collaborateurs (2016) ont étudié les entérobactéries productrices de KPC et en ont conclu qu'elles sont en augmentation en Espagne. La majorité d'entre elles appartiennent à 5 clones : ST11 et ST512 qui ont provoqué une propagation interrégionale, ST101 une propagation régionale et ST1961 et ST678 des épidémies hospitalières indépendantes. La souche ST101/*bla<sub>KPC-2</sub>* présentait le plus grand nombre de gènes de résistance et de virulence. ST101/*bla<sub>KPC-2</sub>* et ST512/*bla<sub>KPC-3</sub>* ont été impliqués dans la propagation de la KPC en Italie. A noter que dans notre étude, le gène *bla<sub>KPC-3</sub>* est retrouvé, associé à ces 3 ST (ST512, ST 101, ST11) mais pas le *bla<sub>KPC-2</sub>*.

En regardant le profil de résistance des bactéries séquencées, il s'étend à un large panel de familles d'antimicrobiens comme les quinolones (ciprofloxacine ; 23 bactéries résistantes sur les 26 séquencées), le chloramphénicol (18/26), le sulfaméthoxazole (14/26), le triméthoprime (18/26) et les aminoglycosides (gentamicine (13/26), tobramycine (17/26)).

Les ammoniums quaternaires utilisés comme biocide ou désinfectant font également l'objet de résistance (cetylpyridium chloride (22/26), benzylkonium chloride (22/26)). Carencio (2017) explique que la résistance aux désinfectants ne naît pas dans les milieux de soins où les concentrations en désinfectants sont largement supérieures aux capacités de défense bactérienne ni à la maison. C'est dans les réseaux d'assainissement puis dans l'environnement qu'elle se développe. Les effluents hospitaliers sont microbiologiquement très pauvres en raison des biocides (désinfectants et antibiotiques) qu'ils contiennent, ce qui peut limiter les capacités épuratoires de l'effluent. Par contre, les bactéries que ces effluents hospitaliers contiennent sont nettement plus équipées en intégrons de résistance qui leur permettent d'y survivre. Les hôpitaux contribuent ainsi à la diffusion et à la progression de l'antibiorésistance et de la résistance aux biocides. Les biocides contribuent à des phénomènes d'antibiorésistance par le biais de mécanismes de co-résistance (deux mécanismes de résistance portés



par une même bactérie) ou de résistance croisée (un seul mécanisme de résistance permettant de contrer plusieurs agents antibactériens).

Des gènes codant pour la production de carbapénémases sont retrouvés dans les 26 souches séquencées (tableaux 13 et 14). Il s'agit des gènes *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=14), *bla*<sub>OXA-48</sub> (n=9), *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=1) et *bla*<sub>NDM-5</sub> (n=1). Les gènes séquencés sont en adéquation avec les profils phénotypiques obtenus (antibiogramme) et avec les tests PCR et immunochromatographiques réalisés. Ils sont majoritairement couplés à des gènes codant pour des BLSE.

- **Conclusion**

Cette quatrième étude a permis de montrer que des *E. coli* et *K. pneumoniae* CPE sont retrouvées en Belgique dans l'environnement aquatique et atteste de cette contamination environnementale. En effet, 24 *E. coli* CRE et 27 *K. pneumoniae* CRE ont pu être isolées à partir d'eaux de surface et de continuum hospitaliers.

Les carbapénèmes sont actuellement prescrits en médecine humaine, uniquement à usage hospitalier. L'origine des bactéries CPE isolées de cette étude est certainement une origine humaine étant donné qu'elles affichent de grandes similitudes avec les isolats cliniques humains et qu'elles sont isolées le long de continuum hospitalier. C'est le cas des *E. coli* O18:H7 ST1463 retrouvées dans l'effluent de l'hôpital A, à la sortie de la STEP de Tilff et dans la Meuse à Liège dans cette étude. Lors de la 3<sup>ème</sup> étude de ce travail, 14 clones possédant ce sérotype avaient été identifiés dans les effluents hospitaliers de l'hôpital A, en entrée de la STEP de Tilff ainsi qu'à sa sortie. L'hypothèse qu'il s'agirait d'une dispersion d'un clone du milieu hospitalier vers l'environnement aquatique peut être émise, démontrant le rôle important que peuvent avoir les effluents hospitaliers dans la dissémination de l'antibiorésistance.

---

# Discussion - Perspectives

---

La première étude de cette thèse visait à étudier les phénotypes de résistance d'*E. coli*, isolées de cours d'eau et d'effluents hospitaliers dans les bassins hydrographiques de l'Ourthe, la Vesdre, l'Amblève et la Meuse en Belgique. La seconde étude présentait les mêmes objectifs mais ciblait les eaux de baignade, où le risque d'exposition humaine aux bactéries antibiorésistantes est potentiellement accru. Dans ces deux études, des *E. coli* antibiorésistantes ont été isolées à chaque point de prélèvement. La troisième étude s'est focalisée sur un des mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, la production de BLSE chez *E. coli*. La prévalence des EcBLSE et leur caractérisation a été réalisée dans le bassin hydrographique de l'Ourthe dans des échantillons d'eaux de surface, des entrées/sorties de STEP et des effluents hospitaliers. Des EcBLSE ont été dénombrées dans toutes les stations de prélèvement, ce qui démontre l'ampleur de la dispersion de ces bactéries antibiorésistantes dans l'environnement aquatique. La quatrième étude consistait en un screening pour détecter et caractériser des *E. coli* et *K. pneumoniae* productrices de carbapénèmes (CP). 24 *E. coli* et 27 *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes (CRE) ont pu être isolées.

Lors des deux premières études de ce travail, les tests phénotypiques (antibiogrammes) comprenaient 10 antibiotiques en commun. Les taux de résistance les plus élevés, sur milieu TBX et TBX+AMX ont été rencontrés pour les 3 mêmes antibiotiques : l'AMP, l'AMC et le SXT. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans d'autres études en rivière où les résistances aux pénicillines (AMP, AMX, PTZ) et aux sulfamidés (SXT) sont plus répandues chez *E. coli* que les résistances aux quinolones (ciprofloxacine) et aux aminoglycosides (gentamicine) (Hu et al., 2008; Servais and Passerat, 2009). Dans le projet ISEMA, dans lequel l'amont/aval des STEP de Tilff et d'Angleur ont été échantillonnés aux mêmes dates que les prélèvements de la troisième étude, la triméthoprine, le sulfaméthoxazole et la clarithromycine ont été quantifiés dans  $\pm 90$  % des échantillons prélevés en aval des hôpitaux. L'azithromycine a été quantifiée dans 80 % des échantillons « aval », la sulfadiazine et l'érythromycine dans  $\pm 50$  % des échantillons, la lincomycine dans 40 % des échantillons et le florfénicol et la sulfaméthazine dans moins de 10 % des prélèvements. La somme des concentrations en antibiotiques mesurées dans l'Ourthe en amont/aval des STEP de Tilff et d'Angleur est cependant plus faible par rapport à d'autres eaux de surface recevant des effluents hospitaliers préalablement traités (STEP) ou pas (Chalon et al., 2022).

Dans les deux premières études, la multi-résistance a été définie comme la résistance à au moins trois antibiotiques testés à l'antibiogramme (et non à un antibiotique de 3 classes différentes comme dans les troisièmes et quatrièmes études). Dans la première étude, 15,7% des 938 *E. coli* isolées sur le milieu TBX étaient multi-résistantes (isolats provenant de l'ensemble des échantillons, toutes origines confondues) tandis que 6% des 912 *E. coli* isolées l'étaient dans la seconde étude (isolats provenant d'eaux de baignade).

Différents types d'eaux ont été échantillonnés (eaux de surface, de baignade, résiduaire). Les eaux de baignade présentent une meilleure qualité que les eaux de surface étudiées. Globalement, les taux de résistance mesurés vis-à-vis des antibiotiques testés communément (antibiogramme) lors des deux premières études à partir des isolats d'*E. coli* étaient légèrement plus faibles pour les eaux de baignade. Sur le milieu TBX, 32,7% des 938 *E. coli* isolées lors de la première étude étaient résistantes à un antibiotique (27,7% provenant d'eaux de surface) tandis que 24% des souches isolées l'étaient dans les eaux de baignade (seconde étude). Aucune résistance au mérépénème (MEM), carbapénème de dernier recours, n'a été mise en évidence dans les prélèvements issus des eaux de baignades (deuxième étude) alors que deux souches résistantes à celui-ci avaient été isolées lors de la première étude dont une provenait d'une eau de surface (Ourthe à Comblain-Fairon). De même, aucune *E. coli* ou *K. pneumoniae* CPE n'ont pu être isolées des 29 eaux de baignade prélevées alors que de tels isolements ont pu être réalisés à partir de 6 des 20 eaux de surface testées et à partir des continuums hospitaliers à la quatrième étude. Au sein même des eaux de baignade, la seconde étude a montré que les rivières contiennent des concentrations plus élevées en *E. coli* et *E. coli* antibiorésistantes que les lacs, même si le lac de Neufchâteau fait face à des contaminations fécales récurrentes traduites par de nombreuses interdictions de baignade. Dans les lacs, l'apport des polluants est différent et mieux maîtrisé qu'en rivière. Les deux stations sur la Lesse (Pont à Lesse et Houyet) étaient celles qui ont présenté les MAR index, les concentrations en *E. coli* ainsi que le nombre d'EcBLSE les plus élevés. Ces résultats observés pour la Lesse peuvent s'expliquer par une plus grande diversité de la contamination fécale sur cette rivière (présence de campings). Durant la période de baignade 2021, ces lieux de baignade ont été interdits au public à de nombreuses reprises.

Une analyse de risques visant à évaluer l'exposition humaine aux bactéries antibiorésistantes (QMRA) présentes dans les eaux de baignade a d'ailleurs été réalisée dans la seconde étude et a conclu à des probabilités très faibles d'infection, hormis pour un des quatre scénarios testés. Une estimation de la probabilité d'infection journalière ( $P_d$ ), annuelle ( $P_a$ ) et globale ( $P_{overall}$ ) a été calculée sur base de la prévalence en bactéries antibiorésistantes mesurée et du volume d'eau potentiellement ingéré par l'homme. Ces volumes proviennent de l'étude de Schets et collaborateurs (2011) qui ont réalisé une enquête via questionnaire par rapport aux pratiques de baignade des Néerlandais.

Le cadre de cette analyse de risques a suivi en partie celui proposé par Tyagi and Kumar (2021) qui proposent quatre scénarios de modèle dose-réponse. En effet, il n'existe pas actuellement de modèle dose-réponse formel permettant de quantifier le risque d'infection dû aux bactéries antibiorésistantes pathogènes spécifiques ingérées par les humains.

Les probabilités d'infection journalière ( $P_d$ ) et annuelle ( $P_a$ ) obtenues pour 3 des 4 scénarios se sont avérées très faibles ( $P_d$  de l'ordre de  $10^{-5}$  à  $10^{-9}$ ). Le modèle dose-réponse d'*E. coli* résistantes à la

gentamicine (scénario 2) est celui qui apporte les probabilités d'infection les plus faibles, suivi de celui relatif aux *E. coli* non antibiorésistantes (scénario 1) puis de celui relatif aux bactéries persistentes (*Clostridium perfringens* - scénario 4).

Le scénario 3 qui est le modèle dose-réponse des bactéries les plus infectieuses et virulentes (*E. coli* O157:H7) est le plus sévère. Le choix du scénario influence donc fortement les résultats obtenus. Ce scénario 3 est celui recommandé par Tyagi and Kumar (2021) car il présente le meilleur ajustement pour les *E. coli* antibiorésistantes. En appliquant ce scénario à nos données, la probabilité d'infection (Pd) est en moyenne de 0,047 pour un homme ; 0,035 pour une femme et 0,060 pour un enfant. En tenant compte de la fréquence annuelle de baignade, la probabilité d'infection annuelle (Pa) augmente à 0,238 pour un homme ; 0,185 pour une femme et 0,308 pour un enfant. La probabilité d'avoir une infection selon ce scénario atteint 30 pourcent chez un enfant. Cependant, il s'agit du scénario le plus sévère car l'équation du modèle dose-réponse considère que la totalité des bactéries sont infectieuses et virulentes. La concentration en *E. coli* mesurée au point de baignade a été utilisée pour réaliser l'analyse de risque, mais il est très peu probable que toutes les *E. coli* présentes dans l'eau soient infectieuses et virulentes. Ce scénario est donc à considérer comme un *worst-case* scénario.

Le calcul de la probabilité de survenue de troubles gastro-intestinaux pour une personne lors d'une baignade, basé sur les concentrations en *E. coli* mesurées dans l'échantillon d'eau, suit une distribution normale dont la moyenne est de 0,0122. Cela signifie qu'il y a plus d'une « chance » sur 100 de développer des troubles gastro-intestinaux.

D'autres études ont déjà été réalisées pour évaluer l'exposition aux bactéries antibiorésistantes, notamment en estimant la dose ingérée (Leonard et al., 2015; O'Flaherty et al., 2019). Cependant, peu font le lien entre dose ingérée et impact sur la santé humaine. Actuellement, le risque pour la santé humaine reste difficile à appréhender. Quelques études épidémiologiques ont évalué l'association entre l'exposition potentielle aux bactéries antibiorésistantes par le biais d'activités aquatiques récréatives et des paramètres de santé tels que les maladies gastro-intestinales (Griffith et al., 2016) ou la colonisation intestinale par les bactéries EcBLSE (Leonard et al., 2018). Leonard et collaborateurs (2018) ont réalisé une enquête épidémiologique et ont pu observer des taux de colonisation d'*E. coli* porteurs du gène codant pour la  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>CTX-M</sub> plus élevés chez les surfeurs (6,3 %) que chez les non-surfeurs (1,5 %), même si leur prévalence était faible (retrouvées dans 11 eaux de baignade sur les 97 analysées). Le statut de colonisation des surfeurs n'ayant pu être vérifié avant leur pratique du surf, ceux qui avaient probablement été exposés à d'autres sources connues de contamination ont été exclus de l'enquête comme les personnes souffrant d'infections suffisamment graves pour nécessiter une hospitalisation ou un traitement aux antibiotiques.

Même si les résultats calculés lors de l'évaluation de l'exposition humaine aux bactéries antibiorésistantes dans les eaux de baignade sont rassurants, il est important de poursuivre les efforts tant aux niveaux national et local qu'au niveau mondial pour contrôler la résistance aux antibiotiques.

En effet, la seconde étude de notre travail a montré que des EcBLSE ont été détectées dans tous les points de baignade (neuf stations). Elles étaient présentes dans 33% des prélèvements (18 échantillons positifs sur 54) et représentaient 3% des *E. coli* isolées. A noter cependant que ce chiffre de 3% a été obtenu à partir des tests de combinaison de disques positifs pour la production de BLSE, à partir des souches isolées sur les milieux TBX et TBX+AMX. La prévalence est certainement surestimée puisque les résultats positifs obtenus à partir du milieu TBX+AMX (qui favorise la sélection de souches résistantes aux  $\beta$ -lactamines) ont été pris en compte. Dans la troisième étude de ce travail, la prévalence en EcBLSE est de 1,4% en eau de surface dans le bassin hydrographique de l'Ourthe. Dans certaines eaux récréatives au Pays-Bas, les EcBLSE représentaient entre 0,05 et 1% du total de la population d'*E. coli* et étaient présentes dans 62% des échantillons d'eau (Blaak et al., 2014). Des valeurs similaires de 1,7% d'EcBLSE ont été trouvées dans des eaux de surfaces au Colorado (Haberecht et al., 2019). Une étude menée en Norvège, où la consommation d'antibiotiques est pourtant fortement limitée, montre que des EcBLSE sont présentes dans 40% des échantillons d'eau récréative testés et représentent entre 0 et 3,8% du total des souches d'*E. coli* isolées (Jørgensen et al., 2017). Dans notre seconde étude, des EcBLSE étaient présentes dans des zones de baignade bien classées selon la directive Européenne des eaux de baignade (2006/7/EC). De même, Schijven et collaborateurs (2015) ont étudié des eaux récréatives au Pays-Bas ayant une « bonne » classification selon la Directive Européenne des eaux de baignade. Ils y ont détecté des EcBLSE à des concentrations allant jusqu'à  $1,5 \times 10^2$  UFC/l. La classification des eaux de baignade, basée sur les indicateurs de contamination fécale, ne permet pas de garantir l'absence de bactéries antibiorésistantes, et donc l'absence de risque. Aussi, lors de la seconde étude de ce travail, le MAR index, reflétant le degré de contamination du milieu (antibiorésistance), a fluctué fortement entre les échantillons, indépendamment de l'abondance absolue en *E. coli*.

La troisième étude de ce travail a démontré la pathogénicité de certaines souches isolées de l'environnement aquatique. Des tests *in vivo* de pathogénicité dans le modèle *Galleria mellonella* ont été entrepris sur trois souches choisies sur base de leurs facteurs de virulence. Il s'agissait de la souche Q22, isolées de l'Ourthe en aval de la STEP d'Angleur, ainsi que des souches N8, isolée de l'entrée de la STEP de Tilff, et K9, isolée de l'Ourthe à Esneux.

La souche Q22 a été testée *in vivo* car elle appartient au sérotype O25:H4 ST131 et représente une lignée qui se propage rapidement et constitue un problème émergent dans les infections communautaires et hospitalières (Peirano and Pitout, 2010). Elle possède de nombreux facteurs de virulence dont une adhésine (*iha*). En utilisant ce modèle, les tests ont révélé une pathogénicité à partir de la concentration

$10^5$  CFU/10  $\mu$ l. Dans ce même modèle, la souche K9 qui appartient au sérotype O86:H2 ST349 était pathogène à partir de la même concentration ( $10^5$  CFU/10 $\mu$ l).

La souche N8, de sérotype O18:H7 ST 1463, a présenté une pathogénicité à partir de la concentration  $10^6$  CFU/10  $\mu$ l dans le modèle *Galleria mellonella*. Ce sérotype O18:H7 ST 1463 a été détecté dans de nombreux isolats, 14 souches séquencées sur 40 le possédant lors de la troisième étude. L'analyse SNP a montré un regroupement de ces 14 souches, suggérant qu'il s'agit d'un clone. Ces clones ont été isolés de l'effluent de l'hôpital A et de l'entrée de la STEP de Tilff, qui reçoit les effluents de l'hôpital A. Plus problématique, un des 14 clones O18:H7 ST 1463 (souche n°O5) a été retrouvé à la sortie de la STEP de Tilff, démontrant que les hôpitaux peuvent être la source d'une contamination de l'environnement, même si aucune souche de sérotype O18:H7 ST 1463 n'a pu être isolée à partir d'eaux de surface lors de la troisième étude. Par contre, lors de la quatrième étude de ce travail, une souche O18:H7 ST 1463 a été isolée de l'effluent de l'hôpital A, une autre à la sortie de la STEP de Tilff, et la troisième dans la Meuse à Liège. La propagation de cette souche dans les eaux de surface à partir de l'effluent de l'hôpital A paraît très probable.

Ce groupe de 14 souches présente la particularité de posséder le gène *bla<sub>KPC-3</sub>*, un gène codant pour la production d'une carbapénémase. Les souches d'*E. coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC) de sérotype O18:K1:H7 sont principalement responsables de la méningite néonatale et de la septicémie chez l'homme. Ce sérotype est également fréquemment isolé dans les lésions extra-intestinales de la colibacillose chez la volaille (Moulin-Schouleur et al., 2007). Cependant, les souches O18:H7 de cette étude-ci ne possèdent pas le gène *neu* codant pour la capsule K1. Notre étude rencontre les conclusions de Cahill et collaborateurs (2019), qui suggèrent que les effluents hospitaliers sont un contributeur majeur aux entérobactéries productrices de carbapénémases dans les STEP municipales.

Les conditions de prélèvements des échantillons lors de ce type d'études sont importantes, c'est pourquoi des prélèvements ont été réalisés à des périodicités différentes. Dans les premières et troisièmes études de cette thèse, des campagnes de prélèvements ont été réalisées sur deux saisons différentes dans le but d'observer l'influence de la saison sur les taux de résistance mesurés. L'hypothèse d'une surconsommation d'antibiotiques en hiver a été posée. De plus, la concentration des indicateurs fécaux et l'antibiorésistance ont tendance à augmenter pendant les précipitations, les concentrations étant plus importantes lorsque l'intensité des précipitations est plus élevée (Cho et al., 2010; Kubera, 2021). À l'avenir, les conséquences attendues du changement climatique comprennent une augmentation de la fréquence des précipitations extrêmes, des périodes de sécheresse plus longues et des températures plus élevées dans les cours d'eau, ce qui accroît la vulnérabilité des milieux aquatiques à la contamination bactérienne, y compris l'antibiorésistance (Anses, 2020). Lors de ces événements pluvieux, en Wallonie, les eaux usées, y compris celles d'hôpitaux, sont déviées vers des déversoirs d'orage et détournées ainsi

de leur trajet vers les STEP pour aboutir directement dans les cours d'eaux. Dans ce cas, les effluents ne subissent aucun traitement, entraînant une pollution directe par les BRA et GRA. En été, les conditions de sécheresse et la période d'étiage pourrait défavoriser le développement bactérien suite au rayonnement solaire (Cho et al., 2010).

Lors de la première étude, les campagnes de prélèvements ont eu lieu en mai et octobre 2019. La comparaison des taux de résistance par antibiotique pour les deux campagnes (test Chi-carré) a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives ( $p > 0,05$  pour chaque antibiotique) entre les saisons. Dans la troisième étude, les mêmes conclusions ont été émises, hormis pour les taux de résistance au céfotaxime qui montrait une différence significative entre saison (COX – 98,1% en hiver et 89,3% en été).

Dans cette troisième étude, suite aux grosses inondations qui ont eu lieu en juillet 2021 dans les bassins hydrographiques de l'Ourthe et de la Vesdre notamment, les prélèvements en entrée/sortie des deux STEP n'ont pu être réalisés car celles-ci étaient endommagées et en arrêt de fonctionnement. Ces entrées/sorties de STEP (localisation avec code N, O, R, S) ont été échantillonnées en août 2022. Il est intéressant de remarquer que, malgré l'arrêt des STEP dans tout le bassin hydrographique, les dénombrements réalisés en août 2021 soit un mois après les inondations, sont du même ordre de grandeur que ceux effectués lors de la première campagne de janvier 2021, alors que les STEP étaient en arrêt de fonctionnement.

Dans les quatre études jalonnant ce travail, les prélèvements ont été réalisés de manière ponctuelle. En effet, en microbiologie, il est recommandé de mener les dénombrements dans des laps de temps les plus courts possible. Les prélèvements dans les effluents hospitaliers (études 1, 3 et 4) ont été réalisés à un temps  $t$ , reflétant une situation à un moment précis, qui dépend de plusieurs paramètres : nombre de lits, localisation de la canalisation par rapport aux bâtiments et aux soins intensifs, arrivée d'eau de douche et de chasse de toilette, ....

Au fur et à mesure des études menées dans cette thèse, les prélèvements ont été étoffés et les analyses approfondies. Ainsi, dans la 1<sup>ère</sup> étude, l'impact des effluents hospitaliers (effluent de l'hôpital A et effluent mixte de la faculté vétérinaire comprenant les effluents de la faculté mélangés à celui de la clinique vétérinaire) dans l'Ourthe en aval de la STEP de Tilff n'avait pas pu être démontré. L'effluent de l'hôpital A possédait pourtant des MAR index élevés (0,4 à la première campagne et de 0,35 à la seconde). Ceux mesurés dans l'Ourthe en aval de la STEP de Tilff (MAR index de 0,03 et 0,02 à la première et seconde campagne respectivement) étaient relativement faibles. Malgré l'apport en *E. coli* antibiorésistantes provenant de l'hôpital A, une augmentation significative du MAR index entre l'aval et



l'amont de la STEP de Tilff n'avait pas été observée. Dans cette première étude, les prélèvements avaient eu lieu dans l'effluent hospitalier et en amont/aval de la STEP de Tilff (dans l'Ourthe) qui les recevaient. Dans la 3<sup>ème</sup> étude, les prélèvements ont eu lieu dans l'effluent hospitalier, en amont/aval des STEP, mais également dans les entrées/sorties de STEP, ce qui a permis de mieux connaître le continuum « effluent hospitalier – STEP – rivière ». De plus, l'utilisation de tests génotypiques (PCR) et du séquençage de génome (WGS) a permis de typer de manière détaillée les isolats provenant de ces échantillons.

Dans le but d'étudier les contaminations fécales d'aliments par des *E. coli* multi-résistants, Krumperman (1983) a défini un MAR index et fixé arbitrairement sa valeur à 0,2 comme étant la limite entre les contaminations fécales à faible risque de celles à haut risque. Le MAR index est également utilisé pour tenter de discriminer les sources de contamination fécales (Afunwa et al., 2020). Les MAR index des 4 effluents hospitaliers étaient élevés dans la première étude (0,16 et 0,22 sur milieu TBX lors de la première et seconde campagne respectivement) et significativement différents de ceux calculés en eaux de surface qui variaient de 0,03 à 0,07 sur TBX. A noter qu'il n'y avait pas de différences significatives entre le MAR index calculé en eaux de surface provenant de couverture forestière, rurale et urbaine. Les concentrations en *E. coli* dénombrées dans l'effluent de l'hôpital A étaient de l'ordre de  $10^5$  -  $10^7$  UFC/100 ml dans les première, troisième et quatrième études. Servais and Passerat (2009) avaient trouvé des concentrations similaires en *E. coli* dans des échantillons provenant de 17 hôpitaux et des MAR index légèrement plus élevés (en moyenne 0,075 en rivière et 0,250 en hôpitaux) dans le bassin de la Seine. Par conséquent, les concentrations en EcBLSE sont élevées dans les effluents hospitaliers et vont être dirigées vers les STEP. Dans la troisième étude, les EcBLSE isolées dans cet effluent représentaient jusqu'à 25,7% de la flore totale en *E. coli* lors de la seconde campagne de prélèvement. Ces éléments suggèrent que les effluents hospitaliers jouent un rôle important dans la propagation des bactéries antibiorésistantes dans l'environnement aquatique comme l'ont indiqué Hassoun-Kheir et collaborateurs (2020) dans leur revue bibliographique puisque 30/37 (81%) des études examinées montraient que les eaux usées des hôpitaux contiennent beaucoup plus de bactéries antibiorésistantes que les eaux usées communautaires. Les troisième et quatrième études ont démontré que les effluents hospitaliers sont une source de contamination de bactéries antibiorésistantes, notamment avec la dispersion du clone O18:H7 ST 1463, et que les STEP rejettent dans l'environnement aquatique des concentrations élevées en bactéries antibiorésistantes.

Les taux d'abattement des STEP calculés dans la troisième étude se situent dans les fourchettes d'élimination attendues, à savoir une réduction logarithmique des bactéries hétérotrophes allant jusqu'à 3 log (Kwak et al., 2015; Munir et al., 2011) et, pour les EcBLSE, des éliminations de 1,5 log (Anses, 2020). Malgré cela, les concentrations en EcBLSE restent élevées à la sortie des STEP – Sortie STEP

Tilff :  $3,1 \times 10^3$  (C1) et  $1,5 \times 10^3$  (C2), sortie STEP Angleur :  $7,6 \times 10^2$  (C1) et  $2,4 \times 10^2$  (C2) EcBLSE/100 ml – et sont rejetées dans l’Ourthe. Cela corrobore différentes études qui ont montré que les STEP sont responsables du rejet de bactéries EcBLSE et MDR dans les rivières réceptrices (Blaak et al., 2015; Lenart-Boron et al., 2020; Łuczkiwicz et al., 2010; Reinthaler et al., 2010).

La troisième étude s’est consacrée à l’étude des EcBLSE dans le bassin hydrographique de l’Ourthe. Le génotypage par PCR a montré que 73,6% des 644 EcBLSE et Ampc isolées possédaient un gène BLSE du groupe CTX-M-1, 14,9% du groupe CTX-M-9 et aucune souche ne contenait de gènes du groupe CTX-M-2. Une grande diversité de BLSE a été identifiée dans les 40 souches séquencées, notamment *bla*<sub>CTX-M</sub> (n=21) avec *bla*<sub>CTX-M-15</sub> étant le plus représenté (n=15) ainsi que *bla*<sub>TEM</sub> (n=11), *bla*<sub>OXA</sub> (n=7) et *bla*<sub>SHV</sub> (n=9). Des gènes codant pour des CP ont été identifiés dans 22 des 40 souches séquencées avec *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=19), *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=2) et *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=2). Certaines de ces 22 souches ont été isolées d’eaux de surface, ce qui est préoccupant car les bactéries productrices de carbapénémases représentent un fléau sanitaire mondial en raison de leur multirésistance aux antimicrobiens et des options thérapeutiques limitées (Bonomo et al., 2018).

Le gène *bla*<sub>KPC-3</sub> a été identifié à 19 reprises. Ce gène *bla*<sub>KPC-3</sub> a été associé au ST1463 dans nos études et donc au sérotype O18:H7, contrairement à d’autres études où il est associé au ST167 ou encore au ST3948 (Mani et al., 2017; Peirano et al., 2014b).

D’un point de vue épidémiologique, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> est la BLSE la plus répandue dans les clones d’*E. coli* dans le monde entier, tant dans les communautés que dans les hôpitaux (Merida-Vieyra et al., 2016; Robin et al., 2017). Le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> est typiquement associé à des plasmides de type IncF, un groupe prédominant de grands plasmides conjugatifs qui portent et mobilisent de multiples déterminants de résistance et de virulence (Mahéroul et al., 2019). De nombreux plasmides ont été identifiés dans nos études, notamment les plasmides IncFIB, IncFII et col156. L’étude de Baron et collaborateurs (2020) a montré que la diversité des gènes et des plasmides d’*E. coli* AR isolés dans les rivières françaises était probablement liée aux différentes origines animales et humaines des bactéries isolées.

En Irlande, le séquençage génomique (WGS) d’un panel de 60 souches a révélé de nombreux types séquentiels (ST) différents circulant dans l’eau et les eaux usées, y compris *E. coli* avec ST131 (n=15), ST38 (n=8), ST10 (n=4) (Hooban et al., 2021). Dans notre étude, les *E. coli* ST131 (n=5) et ST38 (n=4) ont été identifiées mais pas le ST10. Des études de surveillance récentes ont montré que le ST131 était le plus répandu dans le monde et que sa prévalence globale variait entre 12,5 % et 30 % de tous les isolats cliniques d’*E. coli* tandis qu’elle atteint 70-80 % des isolats résistants aux fluoroquinolones et 50-60 % des isolats producteurs de BLSE (Peirano et al., 2014).

La quatrième étude s'est consacrée à la recherche de bactéries productrices de CP. Sur base du screening de différents types d'eau, 24 *E. coli* et 27 *K. pneumoniae* CRE ont pu être isolées à partir d'eau de surface et de continuums hospitaliers. Aucune souche n'a pu être isolée à partir d'eaux de baignade, ce qui témoigne de leur bonne qualité. Le travail d'isolement et de confirmation de l'espèce bactérienne a été fastidieux, surtout pour l'espèce *K. pneumoniae* pour laquelle il n'existe pas de milieu de culture sélectif. En Suède, Khan et collaborateurs (2018) n'ont pu isoler que deux *Klebsiella* CPE de l'environnement, ce qui démontre que le niveau de CPE reste faible en Suède. C'était d'ailleurs la première fois que des *Klebsiella* CPE étaient isolées de l'environnement en Suède car avant 2015 cela n'avait jamais été rapporté. Ils ont pu démontrer qu'une *K. oxytoca* ST172, productrice de *bla*<sub>VIM-1</sub>, isolée à partir d'une rivière suédoise était génotypiquement liée à deux isolats hospitaliers, ce qui suggérait sa dispersion du milieu hospitalier vers l'environnement aquatique.

Dans cette quatrième étude, des tests phénotypiques ont été comparés à des tests génotypiques visant à mettre en évidence les principaux gènes codant pour les CP (gènes *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>) ainsi qu'à des tests rapides immunochromatographiques. Les résultats obtenus avec ces 3 tests sont cohérents. Pour les 24 *E. coli* CRE, 20 souches dont 16 isolats provenant de l'effluent de l'hôpital A, possédaient le gène *bla*<sub>KPC</sub>. Les 4 autres *E. coli* CRE possédaient le gène *bla*<sub>OXA-48</sub>. Pour les 27 *K. pneumoniae* isolées, 11 isolats possédaient le gène *bla*<sub>KPC</sub>, 9 le gène *bla*<sub>OXA-48</sub>, un *bla*<sub>NDM</sub>, un *bla*<sub>VIM</sub> et 5 ne possédaient aucun des gènes testés.

Deux souches d'*E. coli* ST38 et une ST10 ont été isolées, comme déjà rapporté en Irlande (Hooban et al., 2021). Des *K. pneumoniae* ST11 (n=2), ST16 (n=1), ST512 (n=2), ST101 (n=1) qui sont des clones émergents responsables d'épidémies nosocomiales ont été identifiés (de Sales et al., 2022; Oteo et al., 2016). Les gènes de carbapénémases mis en évidence lors du séquençage (26 souches séquencées) sont *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=14), *bla*<sub>OXA-48</sub> (n=9), *bla*<sub>OXA-244</sub> (n=1), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=1) et *bla*<sub>NDM-5</sub> (n=1).

Cette quatrième étude a permis de démontrer que des *E. coli* et *K. pneumoniae* CPE sont retrouvées en Belgique dans l'environnement aquatique. En Belgique, les carbapénèmes sont actuellement prescrits en médecine humaine, uniquement à usage hospitalier. Leur utilisation n'est pas autorisée en médecine vétérinaire. L'origine des bactéries CPE isolées de cette étude est certainement humaine étant donné qu'elles affichent de grandes similitudes avec les isolats cliniques humains et qu'elles sont isolées le long de continuum hospitalier (cas de *E. coli* CRE de sérotype O18:H7 avec ST1463).

Malgré leur interdiction en médecine vétérinaire, la résistance aux carbapénèmes est rapportée chez des bactéries présentes chez les animaux (tant les animaux de compagnie que d'élevage), sans qu'une cause évidente puisse être citée. En Belgique, un seul cas de bactérie CPE a été recensé à ce jour chez des animaux vivants (chevaux). De plus, une souche d'*E. coli* productrice de la carbapénémase VIM-1 a été

décélée pour la première fois à la fin de l'année 2015 dans de la viande de porc. L'origine de la souche concernée n'a pas pu être déterminée (Garcia-Graells et al., 2020). Les bactéries CPE sont de plus en plus présentes chez les animaux, comme c'est le cas en France où le gène *bla<sub>OXA-48</sub>* a été identifié dans trois fèces de chiens (3/185, 1,6 %) ainsi que la propagation du plasmide *bla<sub>OXA-48</sub>/IncL* d'un *K. pneumoniae* à des isolats d'*E. coli* commensaux dans l'intestin des chiens. Le taux de portage d'entérobactéries BLSE positives chez les chiens urbains est de 6,5 %, ce qui est similaire aux taux de portage de BLSE dans la population humaine française (Haenni et al., 2022).

- Perspectives

L'AMR est l'une des plus grandes menaces pour la santé publique pour le présent et le proche avenir selon l'OMS. Outre les coûts humains, l'AMR induit également des coûts économiques importants, pour les hôpitaux, pour le système d'assurance maladie, ainsi que pour le secteur agricole : selon les estimations de l'OCDE, si rien n'est fait, le coût annuel de l'AMR en Belgique est estimé à 24 millions d'euros, mais ce coût cumulé pourrait atteindre 787 millions d'euros d'ici 2050 (SPF santé publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement, 2020). La lutte contre la résistance aux antimicrobiens est donc un défi majeur pour notre société tant en termes de décès évitables, durées d'hospitalisations, qu'en termes de coûts. Pour pouvoir continuer à soigner avec des antimicrobiens, il faudra contrôler voire diminuer les résistances chez les microorganismes. De plus, l'AMR peut affecter la confiance du public dans la sécurité des soins de santé, des aliments et de l'environnement, lorsque, par exemple, des organismes multirésistants se propagent par le biais d'infections associées aux soins de santé, de denrées alimentaires ou via l'environnement.

L'environnement aquatique joue un rôle crucial dans la dissémination de l'AMR car l'eau constitue l'une des principales voies de propagation de la résistance parmi les bactéries naturelles et, en même temps, un moyen direct et indirect de dissémination des organismes résistants aux antibiotiques parmi les populations humaines et animales (Baquero et al., 2008).

Il n'existe pas de volet réglementaire dans le domaine environnemental, bien que certains états membres de l'Union européenne aimeraient introduire le suivi de gènes de résistance dans la watch list (liste de vigilance des polluants émergents) de la directive cadre de l'eau (directive 2000/60/CE). Actuellement, il n'y a pas encore de seuil fixé pour l'exposition des risques et il n'existe pas de monitoring concernant l'AMR dans l'environnement en Belgique. Les résultats obtenus dans cette thèse montrent pourtant l'intérêt d'en réaliser.

La directive européenne 91/271, relative au traitement des eaux résiduaires urbaines est actuellement en révision. Celle-ci suggère le suivi de gènes de résistance en entrée de STEP (>100000 E.H.) pour réaliser

la surveillance épidémiologique des eaux usées. Ce suivi permettrait de connaître la prévalence de l'AMR dans des bassins versants en ciblant la population totale de la zone ainsi que refléter la diffusion de l'AMR au niveau communautaire (Urase et al., 2020). La détection d'agents pathogènes émergents pourrait se faire par ce biais, car les individus porteurs de ces agents pathogènes ne se rendent pas toujours à l'hôpital. Il convient donc de soutenir les projets pilotes visant à quantifier les gènes d'AMR dans les effluents des maisons de retraite, des hôpitaux et des points critiques de l'agriculture.

Ce travail suggère que les effluents hospitaliers sont une source majeure de dissémination de bactéries antibiorésistantes dans l'environnement. C'est pourquoi des stations d'épuration devraient être installées à la sortie des hôpitaux (ce qui n'est actuellement pas le cas partout), incluant des technologies visant à réduire les niveaux de BRA et GRA. En sortie de STEP également, il serait intéressant d'intégrer une étape de désinfection après les traitements plus conventionnels afin de réduire les teneurs en BRA et GRA rejetées dans l'environnement aquatique. Des techniques telles que l'ozonation, la chloration et la désinfection par UV sont parmi les plus testées et montrent des efficacités différentes en fonction de la cible considérée (Czekalski et al., 2016; Sharma et al., 2016; Sousa et al., 2017; Zheng et al., 2017). La désinfection UV, matérialisée par différentes lampes immergées, permet de tuer rapidement par dégradation de leur ADN une large gamme de pathogènes (bactéries, virus, algues, champignons) et de ne pas avoir de sous-produits. La technologie de coagulation pour réduire les GRA dans les effluents des STEP a également été étudiée et a obtenu des résultats prometteurs (Li et al., 2017) et les photocatalyseurs composites TiO<sub>2</sub> à base de graphène sous rayonnement solaire ont également montré une bonne élimination (Karaolia et al., 2018). Enfin, en appliquant la photocatalyse TiO<sub>2</sub> sous irradiation UV en combinaison avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de bonnes efficacités d'élimination des BRA et GRA (formes intracellulaires et extracellulaires) de la solution aqueuse ont été récemment rapportées (Guo et al., 2017). Cependant, la plupart de ces études ont été réalisées dans des conditions de laboratoire et nécessitent des recherches supplémentaires pour être testées à grande échelle. Malheureusement, aucune obligation légale n'existe actuellement ce qui n'incite pas à investir dans ce type de procédé.

Ce travail a concerné les espèces *E. coli* et *K. pneumoniae*, mais l'étude de l'antibiorésistance au sein d'autres espèces, telles que les entérocoques, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp.* ou d'autres entérobactéries serait intéressante.

Les analyses ont porté principalement sur la matrice eau (eau de surface, souterraine, de baignade, eaux usées et effluents hospitaliers). L'étude de la matrice que constitue les biofilms (périphytons) serait également intéressante à réaliser, car ils fixent la quasi-totalité des antibiotiques (et autres polluants) présents dans l'eau. Cette propriété fait des biofilms un indicateur intéressant de la qualité de l'eau (Matviichuk et al., 2023) qui pourraient être utilisés dans le cadre d'un monitoring ou d'une cartographie, notamment à des localisations éloignées des déversements (sortie de STEP) puisqu'il y a

un effet accumulateur. Toutefois, les connaissances sur l'effet des antibiotiques présents dans le biofilm sur la viabilité bactérienne et la propagation de l'AMR dans l'environnement sont encore lacunaires (Larsson et al., 2018).

L'étude de l'impact de la déviation des effluents dans des déversoirs d'orage lors d'évènements pluvieux serait également intéressant à estimer. Dans ce cas, les effluents ne sont pas pris en charge ni traités par les STEP. En Europe, 70% des canalisations seraient des systèmes combinés (eau usée/eau de pluie) avec déversoirs d'orage (Londong et al., 2023). La comparaison entre l'amont et l'aval des déversements dans le cours d'eau permettrait d'évaluer la contamination par les BRA et GRA lors de ces conditions climatiques, qui se présenteront de manière récurrente avec le changement climatique. Des systèmes de canalisations qui permettent la séparation entre eaux usées et eaux de pluie lors d'évènements pluvieux intenses sont développés (Londong et al., 2023), afin de déverser les eaux de pluie uniquement dans les cours d'eau sans traitement.

Pour conclure, la recherche concernant l'AMR dans l'environnement aquatique a encore de nombreuses perspectives et défis devant lui car même si l'environnement est le pan du « One health » le moins connu ou exploré, son rôle n'en reste pas moins important.

---

# Annexes

---

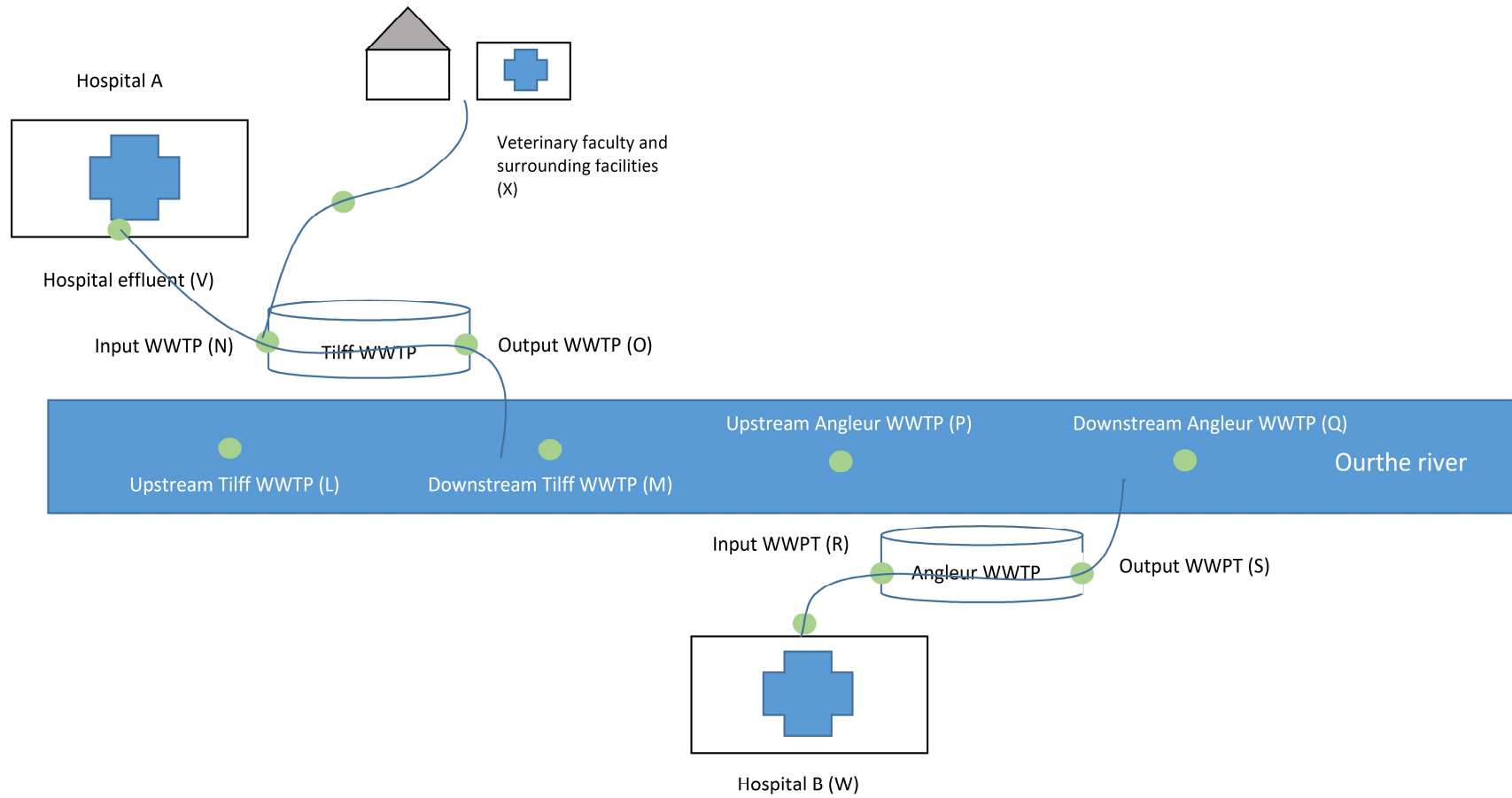
**Annexe 1 : Catégories d'antimicrobiens et agents antimicrobiens créées pour la définition de résistance multiple (multidrug resistance) chez les Entérobactéries (Magiorakos *et al.*, 2012)**

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)	Species with intrinsic resistance to antimicrobial agents or categories (51) <sup>a</sup>
Aminoglycosides	Gentamicin		<i>Providencia rettgeri</i> ( <i>P. rettgeri</i> ), <i>Providencia stuartii</i> ( <i>P. stuartii</i> )
	Tobramycin		<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Amikacin		
	Netilmicin		<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Anti-MRSA cephalosporins	Ceftaroline (approved only for <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> )		
Antipseudomonal penicillins + $\beta$ -lactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid		<i>Escherichia hermannii</i> ( <i>E. hermannii</i> )
	Piperacillin-tazobactam		<i>E. hermannii</i>
Carbapenems	Ertapenem		
	Imipenem		
	Meropenem		
	Doripenem		
Non-extended spectrum cephalosporins; 1st and 2nd generation cephalosporins	Cefazolin		<i>Citrobacter freundii</i> ( <i>C. freundii</i> ), <i>Enterobacter aerogenes</i> ( <i>E. aerogenes</i> ), <i>Enterobacter cloacae</i> ( <i>E. cloacae</i> ), <i>Hafnia alvei</i> ( <i>H. alvei</i> ), <i>Morganella morganii</i> ( <i>M. morganii</i> ), <i>Proteus penneri</i> ( <i>P. penneri</i> ), <i>Proteus vulgaris</i> ( <i>P. vulgaris</i> ), <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>Serratia marcescens</i> ( <i>S. marcescens</i> )
	Cefuroxime		<i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. marcescens</i>
Extended-spectrum cephalosporins; 3rd and 4th generation cephalosporins	Cefotaxime or ceftriaxone		
	Cefazidime		
	Cefepime		
Cephamecins	Cefoxitin		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i>
	Cefotetan		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i>
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin		
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulphamethoxazole		
Glycylcyclines	Tigecycline		<i>M. morganii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> ( <i>P. mirabilis</i> ), <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Monobactams	Aztreonam		
Penicillins	Ampicillin		<i>Citrobacter koseri</i> ( <i>C. koseri</i> ), <i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>H. alvei</i> , <i>Klebsiellae</i> spp., <i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
Penicillins + $\beta$ -lactamase inhibitors	Amoxicillin-clavulanic acid		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>M. morganii</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
	Ampicillin-sulbactam		<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>S. marcescens</i>
Phenicol	Chloramphenicol		
Phosphonic acids	Fosfomicin		
Polymyxins	Colistin		<i>M. morganii</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>



Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)	Species with intrinsic resistance to antimicrobial agents or categories (51) <sup>a</sup>
Tetracyclines	Tetracycline		<i>M. morganii</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Doxycycline		<i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Minocycline		<i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
<p>Criteria for defining MDR, XDR and PDR in <i>Enterobacteriaceae</i>  MDR: non-susceptible to <math>\geq 1</math> agent in <math>\geq 3</math> antimicrobial categories.  XDR: non-susceptible to <math>\geq 1</math> agent in all but <math>\leq 2</math> categories.  PDR: non-susceptible to all antimicrobial agents listed.</p> <p><sup>a</sup>When a species has intrinsic resistance to an antimicrobial agent or to the whole category, that agent or category must be removed from the list in this table prior to applying the criteria for the definitions and should not be counted when calculating the number of agents or categories to which the bacterial isolate is non-susceptible.  <a href="http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx">http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx</a>.</p>			

## Annexe 2 : Schéma des points échantillonnés lors de l'étude 3



---

# Bibliographie

---

- Afunwa, R.A., Ezeanyinka, J., Afunwa, E.C., Udeh, A.S., Oli, A.N., Unachukwu, M., 2020. Multiple Antibiotic Resistant Index of Gram-Negative Bacteria from Bird Droppings in Two Commercial Poultries in Enugu, Nigeria. *Open Journal of Medical Microbiology* 10, 171–181. <https://doi.org/10.4236/ojmm.2020.104015>
- Alekshun, M.N., Levy, S.B., 2007a. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128, 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
- Allen Burton, G., Gunnison, D., Lanza, G., 1987. Survival of pathogenic bacteria in various freshwater sediments. *Applied and environmental microbiology* 53, 633–638. <https://doi.org/10.1128/aem.53.4.633-638.1987>
- Amarasiri, M., Sano, D., Suzuki, S., 2020. Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 50, 2016–2059. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1692611>
- Anses, 2020. Antibiorésistance et environnement. État et causes possibles de la contamination des milieux en France par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques. Avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective.
- Aubertheau, E., Stalder, T., Mondamert, L., Ploy, M.-C., Dagot, C., Labanowski, J., 2017. Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. *Science of The Total Environment* 579, 1387–1398. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.136>
- Baquero, F., Martínez, J.-L., Cantón, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology, Energy biotechnology / Environmental biotechnology* 19, 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- Baron, S., Le Devendec, L., Lucas, P., Larvor, E., Jové, T., Kempf, I., 2020. Characterisation of plasmids harbouring extended-spectrum cephalosporin resistance genes in *Escherichia coli* from French rivers. *Veterinary Microbiology* 243, 108619. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108619>
- Basavaraju, M., Gunashree, B.S., 2023. *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics, in: Starčić Erjavec, M. (Ed.), *Escherichia Coli - Old and New Insights*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105508>

- Beghain, J., Bridier-Nahmias, A., Le Nagard, H., Denamur, E., Clermont, O., 2018. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genom* 4, e000192. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192>
- BELMAP, 2023. Rapport BELMAP - One health report on antibiotic use and resistance in Belgium.
- Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M.H., Zheng, C., 2019. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental Research* 169, 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>
- Bentham, R., Whiley, H., 2018. Quantitative Microbial Risk Assessment and Opportunist Waterborne Infections—Are There Too Many Gaps to Fill? *IJERPH* 15, 1150. <https://doi.org/10.3390/ijerph15061150>
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., Petit, F., 2013. Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. *Appl Environ Microbiol* 79, 4684–4693. <https://doi.org/10.1128/AEM.00698-13>
- Bessa, L.J., Barbosa-Vasconcelos, A., Mendes, Â., Vaz-Pires, P., Martins da Costa, P., 2014. High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in river water, upstream and downstream of a wastewater treatment plant. *Journal of Water and Health* 12, 426–435. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.160>
- Bevan, E.R., Jones, A.M., Hawkey, P.M., 2017. Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72, 2145–2155. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx146>
- Bialek-Davenet, S., Criscuolo, A., Ailloud, F., Passet, V., Jones, L., Delannoy-Vieillard, A.-S., Garin, B., Le Hello, S., Arlet, G., Nicolas-Chanoine, M.-H., Decré, D., Brisse, S., 2014. Genomic Definition of Hypervirulent and Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clonal Groups. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1812–1820. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140206>
- Blaak, H., de Kruijf, P., Hamidjaja, R.A., van Hoek, A.H.A.M., de Roda Husman, A.M., Schets, F.M., 2014. Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Veterinary Microbiology* 171, 448–459. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.007>

- Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R.A., Schets, F.M., de Roda Husman, A.M., 2015. Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Dutch Surface Water and Wastewater. *PLoS One* 10, e0127752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127752>
- Blaak, H., van Rooijen, S.R., Schuijt, M.S., Docters van Leeuwen, A.E., Italiaander, R., van den Berg, H.H.J.L., Lodder-Verschoor, F., Schets, F.M., de Roda Husman, A.M., 2011. Prevalence of antibiotic resistant bacteria in the rivers Meuse, Rhine, and New Meuse (RIVM report No. 703719071/2011). National Institute for Public Health and the Environment. Ministry of Health, Welfare and Sport.
- Boerlin, P., Reid-Smith, R.J., 2008. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Animal Health Research Reviews* 9, 115–126. <https://doi.org/10.1017/S146625230800159X>
- Bollache, L., Bardet, E., Depret, G., Motreuil, S., Neuwirth, C., Moreau, J., Hartmann, A., 2018. Dissemination of CTX-M-Producing *Escherichia coli* in Freshwater Fishes From a French Watershed (Burgundy). *Front Microbiol* 9, 3239. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03239>
- Bonomo, R.A., Burd, E.M., Conly, J., Limbago, B.M., Poirel, L., Segre, J.A., Westblade, L.F., 2018. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases* 66, 1290–1297. <https://doi.org/10.1093/cid/cix893>
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., Grimont, P., 2009. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. *PLoS ONE* 4, e4982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982>
- Brisse, S., Passet, V., Haugaard, A.B., Babosan, A., Kassis-Chikhani, N., Struve, C., Decré, D., 2020. wzi Gene Sequencing, a Rapid Method for Determination of Capsular Type for *Klebsiella* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 4073–4078. <https://doi.org/10.1128/jcm.01924-13>
- Brisse, S., Verhoef, J., 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 915–924. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-915>
- Bush, K., Bradford, P.A., 2020. Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev* 33, e00047-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>

- Bush, K., Bradford, P.A., 2016.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C.M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., Karaolia, P., Schwartz, T., Alexander, J., Merlin, C., Garelick, H., Schmitt, H., de Vries, D., Schwermer, C.U., Méric, S., Ozkal, C.B., Pons, M.-N., Kneis, D., Berendonk, T.U., 2019. Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Research* 162, 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.039>
- Cahill, N., O'Connor, L., Mahon, B., Varley, Á., McGrath, E., Ryan, P., Cormican, M., Brehony, C., Jolley, K.A., Maiden, M.C., Brisse, S., Morris, D., 2019. Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing Enterobacterales? *Sci Total Environ* 672, 618–624. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.428>
- Cain, A.K., Hall, R.M., 2012. Evolution of IncHI2 plasmids via acquisition of transposons carrying antibiotic resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67, 1121–1127. <https://doi.org/10.1093/jac/dks004>
- Cantón, R., Coque, T.M., 2006. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology* 9, 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>
- Carenco, P., 2017. Antibiorésistance et biocides. Informations du réseau national de prévention des infections associées aux soins. *Bulletin CCLin-Arlin*. 9.
- Castanheira, M., Simner, P.J., Bradford, P.A., 2021. Extended-spectrum  $\beta$  -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance* 3, dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>
- Cavallo, J.-D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., Garrabé, E., 2004. Bêtalactamines. *EMC - Maladies Infectieuses* 1, 129–202. <https://doi.org/10.1016/j.emcmi.2004.03.003>
- CBIP [WWW Document], 2023 (accessed 9.25.23). <https://www.cbip.be/fr/chapters/12?frag=9449>
- Charles, P.-E., Dargent, A., Andreu, P., 2017. Nouvelles molécules anti-infectieuses. Quelle place en médecine intensive réanimation pour le tédizolide, la ceftaroline et le ceftobiprole? *Méd. Intensive Réa*. <https://doi.org/10.1007/s13546-017-1271-2>

- Chen, P.-A., Hung, C.-H., Huang, P.-C., Chen, J.-R., Huang, I.-F., Chen, W.-L., Chiou, Y.-H., Hung, W.-Y., Wang, J.-L., Cheng, M.-F., 2016. Characteristics of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Multiple Rivers in Southern Taiwan. *Appl Environ Microbiol* 82, 1889–1897. <https://doi.org/10.1128/AEM.03222-15>
- Cherak, Z., Loucif, L., Moussi, A., Rolain, J.-M., 2021. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in aquatic environments: a review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 25, 287–309. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.03.024>
- Cho, K.H., Cha, S.M., Kang, J.-H., Lee, S.W., Park, Y., Kim, J.-W., Kim, J.H., 2010. Meteorological effects on the levels of fecal indicator bacteria in an urban stream: A modeling approach. *Water Research* 44, 2189–2202. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.051>
- Choi, M., Hegerle, N., Nkeze, J., Sen, Shaichi, Jamindar, S., Nasrin, S., Sen, Sunil, Permala-Booth, J., Sinclair, J., Tapia, M.D., Johnson, J.K., Mamadou, S., Thaden, J.T., Fowler, V.G., Aguilar, A., Terán, E., Decre, D., Morel, F., Krogfelt, K.A., Brauner, A., Protonotariou, E., Christaki, E., Shindo, Y., Lin, Y.-T., Kwa, A.L., Shakoor, S., Singh-Moodley, A., Perovic, O., Jacobs, J., Lunguya, O., Simon, R., Cross, A.S., Tennant, S.M., 2020. The Diversity of Lipopolysaccharide (O) and Capsular Polysaccharide (K) Antigens of Invasive *Klebsiella pneumoniae* in a Multi-Country Collection. *Frontiers in Microbiology* 11.
- Chu, B.T.T., Petrovich, M.L., Chaudhary, A., Wright, D., Murphy, B., Wells, G., Poretsky, R., 2018. Metagenomics Reveals the Impact of Wastewater Treatment Plants on the Dispersal of Microorganisms and Genes in Aquatic Sediments. *Appl Environ Microbiol* 84, e02168-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02168-17>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl Environ Microbiol* 66, 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports* 5, 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Collignon, P., Kennedy, K.J., 2015. Long-term persistence of multidrug-resistant Enterobacteriaceae after travel. *Clin Infect Dis* 61, 1766–1767. <https://doi.org/10.1093/cid/civ703>



- Costanzo, S.D., Murby, J., Bates, J., 2005. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin, Catchment to Reef: Water Quality Issues in the Great Barrier Reef Region* 51, 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.10.038>
- Czekalski, N., Imminger, S., Salhi, E., Veljkovic, M., Kleffel, K., Drissner, D., Hammes, F., Bürgmann, H., von Gunten, U., 2016. Inactivation of Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes by Ozone: From Laboratory Experiments to Full-Scale Wastewater Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 50, 11862–11871. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02640>
- Dallman, T.J., Greig, D.R., Gharbia, S.E., Jenkins, C., 2021. Phylogenetic structure of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from sub-lineage to SNPs. *Microbial Genomics* 7. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000544>
- Danner, M.-C., Robertson, A., Behrends, V., Reiss, J., 2019. Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. *Science of The Total Environment* 664, 793–804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.406>
- David, S., Reuter, S., Harris, S.R., Glasner, C., Feltwell, T., Argimon, S., Abudahab, K., Goater, R., Giani, T., Errico, G., Aspbury, M., Sjunnebo, S., the EuSCAPE Working Group, Koraqi, A., Lacej, D., Apfalter, P., Hartl, R., Glupczynski, Y., Huang, T.-D., Strateva, T., Marteva-Proevska, Y., Andrasevic, A.T., Butic, I., Pieridou-Bagatzouni, D., Maikanti-Charalampous, P., Hrabak, J., Zemlickova, H., Hammerum, A., Jakobsen, L., Ivanova, M., Pavelkovich, A., Jalava, J., Österblad, M., Dortet, L., Vaux, S., Kaase, M., Gatermann, S.G., Vatopoulos, A., Tryfinopoulou, K., Tóth, Á., Jánvári, L., Boo, T.W., McGrath, E., Carmeli, Y., Adler, A., Pantosti, A., Monaco, M., Raka, L., Kurti, A., Balode, A., Saule, M., Miciuleviciene, J., Mierauskaite, A., Perrin-Weniger, M., Reichert, P., Nestorova, N., Debattista, S., Mijovic, G., Lopicic, M., Samuelsen, Ø., Haldorsen, B., Zabicka, D., Literacka, E., Caniça, M., Manageiro, V., Kaftandzиеva, A., Trajkovska-Dokic, E., Damian, M., Lixandru, B., Jelesic, Z., Trudic, A., Niks, M., Schreterova, E., Pirs, M., Cerar, T., Oteo, J., Aracil, B., Giske, C., Sjöström, K., Gür, D., Cakar, A., Woodford, N., Hopkins, K., Wiuff, C., Brown, D.J., the ESGEM Study Group, Feil, E.J., Rossolini, G.M., Aanensen, D.M., Grundmann, H., 2019. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol* 4, 1919–1929. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0492-8>
- Davies, J., Spiegelman, G.B., Yim, G., 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology* 9, 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.006>

- De Laveleye, M., Huang, T.D., Bogaerts, P., Berhin, C., Bauraing, C., Sacré, P., Noel, A., Glupczynski, Y., on behalf of the multicenter study group, 2017. Increasing incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Belgian hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36, 139–146. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2782-x>
- De Sales, R.O., Leaden, L., Migliorini, L.B., Severino, P., 2022. A Comprehensive Genomic Analysis of the Emergent *Klebsiella pneumoniae* ST16 Lineage: Virulence, Antimicrobial Resistance and a Comparison with the Clinically Relevant ST11 Strain. *Pathogens* 11, 1394. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121394>
- Denis, F., 2007. Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier-Masson, Issy-les-Moulineaux.
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P.A.D., Brisse, S., 2005. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4178–4182. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4178-4182.2005>
- Döhla, M., Sib, E., Dericks, B., Grobe, S., Behringer, K., Frechen, M., Simon, K., Färber, H., Lenz, F., Parcina, M., Skutlarek, D., Voigt, A., Felder, C., Exner, M., Schmithausen, R.M., 2020. Assessment of the Prevalence of Antibiotic-Resistant Bacteria and the Concentration of Antibiotics in EU Bathing Waters in Western Germany. *Expo Health* 12, 323–334. <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00313-z>
- ECDC, 2020. Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net).
- ECDC, EFSA and EMA, 2017. ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. *EFS2* 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5017>
- EUCAST, 2017. Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance (No. version 2.0).
- Fevre, C., Passet, V., Weill, F.-X., Grimont, P.A.D., Brisse, S., 2005. Variants of the *Klebsiella pneumoniae* OKP Chromosomal Beta-Lactamase Are Divided into Two Main Groups, OKP-A and OKP-B. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 5149–5152. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5149-5152.2005>
- Finley, R.L., Collignon, P., Larsson, D.G.J., McEwen, S.A., Li, X.-Z., Gaze, W.H., Reid-Smith, R., Timinouni, M., Graham, D.W., Topp, E., 2013. The Scourge of Antibiotic Resistance: The

- Important Role of the Environment. *Clinical Infectious Diseases* 57, 704–710. <https://doi.org/10.1093/cid/cit355>
- Follador, R., Heinz, E., Wyres, K.L., Ellington, M.J., Kowarik, M., Holt, K.E., Thomson, N.R., 2016. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microbial Genomics* 2. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000073>
- G. Lequeux, 2016. RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES Comment est elle déterminée? Quelle utilisation de ces données par le praticien?
- Garcia-Graells, C., Berbers, B., Verhaegen, B., Vanneste, K., Marchal, K., Roosens, N.H.C., Botteldoorn, N., De Keersmaecker, S.C.J., 2020. First detection of a plasmid located carbapenem resistant *bla*<sub>VIM-1</sub> gene in *E. coli* isolated from meat products at retail in Belgium in 2015. *International Journal of Food Microbiology* 324, 108624. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108624>
- Ghaderpour, A., Ho, W.S., Chew, L.-L., Bong, C.W., Chong, V.C., Thong, K.-L., Chai, L.C., 2015. Diverse and abundant multi-drug resistant *E. coli* in Matang mangrove estuaries, Malaysia. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00977>
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.-G., 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J* 9, 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>
- Goh, E.-B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M.G., Davies, J., 2002. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17025–17030. <https://doi.org/10.1073/pnas.252607699>
- Gomez-Simmonds, A., Uhlemann, A.-C., 2017. Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases* 215, S18–S27. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw378>
- Gonzalez-Ferrer, S., Peñaloza, H.F., Budnick, J.A., Bain, W.G., Nordstrom, H.R., Lee, J.S., Van Tyne, D., 2021. Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. *Infect Immun* 89, e00693-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00693-20>
- Grall, N., Andremont, A., Armand-Lefèvre, L., 2011. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *Journal des Anti-infectieux* 13, 87–102. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2011.03.005>

- Griffith, J.F., Weisberg, S.B., Arnold, B.F., Cao, Y., Schiff, K.C., Colford, J.M., 2016. Epidemiologic evaluation of multiple alternate microbial water quality monitoring indicators at three California beaches. *Water Research* 94, 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.036>
- Guérin, V., 2021. Résistances aux  $\beta$ -lactamines chez *Escherichia coli* d'origine bovine : évolution phénotypique et bases génétiques (Thèse). Uliège.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathog* 7, e1002158. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- Guo, C., Wang, K., Hou, S., Wan, L., Lv, J., Zhang, Y., Qu, X., Chen, S., Xu, J., 2017. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and/or TiO<sub>2</sub> photocatalysis under UV irradiation for the removal of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes. *Journal of Hazardous Materials* 323, 710–718. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.041>
- Guo, C.-H., Liu, Y.-Q., Li, Y., Duan, X.-X., Yang, T.-Y., Li, F.-Y., Zou, M., Liu, B.-T., 2023. High prevalence and genomic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and colistin-resistant Enterobacteriaceae from large-scale rivers in China. *Environmental Pollution* 331, 121869. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121869>
- Guyomard-Rabenirina, S., Dartron, C., Falord, M., Sadikalay, S., Ducat, C., Richard, V., Breurec, S., Gros, O., Talarmin, A., 2017. Resistance to antimicrobial drugs in different surface waters and wastewaters of Guadeloupe. *PLoS ONE* 12, e0173155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173155>
- Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C.P., 2014. Quantitative microbial risk assessment, Second edition. ed. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Haberecht, H.B., Nealon, N.J., Gilliland, J.R., Holder, A.V., Runyan, C., Oppel, R.C., Ibrahim, H.M., Mueller, L., Schrupp, F., Vilchez, S., Antony, L., Scaria, J., Ryan, E.P., 2019. Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* from Environmental Waters in Northern Colorado. *Journal of Environmental and Public Health* 2019, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/3862949>
- Haenni, M., Métayer, V., Lupo, A., Drapeau, A., Madec, J.-Y., 2022. Spread of the *bla*<sub>OXA-48</sub> /IncL Plasmid within and between Dogs in City Parks, France. *Microbiol Spectr* 10, e00403-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00403-22>

- Hassen, B., Abbassi, M.S., Benlabidi, S., Ruiz-Ripa, L., Mama, O.M., Ibrahim, C., Hassen, A., Hammami, S., Torres, C., 2020. Genetic characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from wastewater and river water in Tunisia: predominance of CTX-M-15 and high genetic diversity. *Environ Sci Pollut Res* 27, 44368–44377. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10326-w>
- Hassoun-Kheir, N., Stabholz, Y., Kreft, J.-U., de la Cruz, R., Romalde, J.L., Nesme, J., Sørensen, S.J., Smets, B.F., Graham, D., Paul, M., 2020. Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *Science of The Total Environment* 743, 140804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140804>
- Henriot, C.P., Martak, D., Cuenot, Q., Loup, C., Masclaux, H., Gillet, F., Bertrand, X., Hocquet, D., Bornette, G., 2019. Occurrence and ecological determinants of the contamination of floodplain wetlands with *Klebsiella pneumoniae* and pathogenic or antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Ecology* 95, fiz097. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz097>
- Herrig, I., Fleischmann, S., Regnery, J., Wesp, J., Reifferscheid, G., Manz, W., 2020. Prevalence and seasonal dynamics of blaCTX-M antibiotic resistance genes and fecal indicator organisms in the lower Lahn River, Germany. *PLoS ONE* 15, e0232289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232289>
- Holt, K.E., Wertheim, H., Zadoks, R.N., Baker, S., Whitehouse, C.A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T.R., Hsu, L.Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M.B., Edwards, D.J., Nguyen, K.V., Nguyen, T.V., Dao, T.T., Mensink, M., Minh, V.L., Nhu, N.T.K., Schultz, C., Kuntaman, K., Newton, P.N., Moore, C.E., Strugnell, R.A., Thomson, N.R., 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, E3574–E3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>
- Hooban, B., Fitzhenry, K., Cahill, N., Joyce, A., O' Connor, L., Bray, J.E., Brisse, S., Passet, V., Abbas Syed, R., Cormican, M., Morris, D., 2021. A Point Prevalence Survey of Antibiotic Resistance in the Irish Environment, 2018–2019. *Environment International* 152, 106466. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106466>
- Hooban, B., Joyce, A., Fitzhenry, K., Chique, C., Morris, D., 2020. The role of the natural aquatic environment in the dissemination of extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase

- encoding genes: A scoping review. *Water Research* 180, 115880. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115880>
- Hu, J., Shi, J., Chang, H., Li, D., Yang, M., Kamagata, Y., 2008. Phenotyping and Genotyping of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolated from a Natural River Basin. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3415–3420. <https://doi.org/10.1021/es7026746>
- Iovleva, A., Doi, Y., 2017. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinics in Laboratory Medicine, Emerging Pathogens* 37, 303–315. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.005>
- Jørgensen, S.B., Søråas, A.V., Arnesen, L.S., Leegaard, T.M., Sundsfjord, A., Jenum, P.A., 2017. A comparison of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* from clinical, recreational water and wastewater samples associated in time and location. *PLoS ONE* 12, e0186576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186576>
- Kadykalo, S., Thomas, J., Parmley, E.J., Pintar, K., Fleury, M., 2020. Antimicrobial resistance of *Salmonella* and generic *Escherichia coli* isolated from surface water samples used for recreation and a source of drinking water in southwestern Ontario, Canada. *Zoonoses Public Health* 67, 566–575. <https://doi.org/10.1111/zph.12720>
- Karaolia, P., Michael-Kordatou, I., Hapeshi, E., Drosou, C., Bertakis, Y., Christofilos, D., Armatas, G.S., Sygellou, L., Schwartz, T., Xekoukoulotakis, N.P., Fatta-Kassinos, D., 2018. Removal of antibiotics, antibiotic-resistant bacteria and their associated genes by graphene-based TiO<sub>2</sub> composite photocatalysts under solar radiation in urban wastewaters. *Applied Catalysis B: Environmental* 224, 810–824. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.11.020>
- Kennedy, K., Collignon, P., 2010. Colonisation with *Escherichia coli* resistant to “critically important” antibiotics: a high risk for international travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29, 1501–1506. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1031-y>
- Khan, F.A., Hellmark, B., Ehricht, R., Söderquist, B., Jass, J., 2018. Related carbapenemase-producing *Klebsiella* isolates detected in both a hospital and associated aquatic environment in Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37, 2241–2251. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3365-9>
- Kowalska-Krochmal, B., Dudek-Wicher, R., 2021. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* 10, 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>

- Krumperman, P.H., 1983. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foodst. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 46, 6.
- Kubera, Ł., 2021. Spread Patterns of Antibiotic Resistance in Faecal Indicator Bacteria Contaminating an Urbanized Section of the Brda River. Microb Ecol 81, 592–600. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01624-4>
- Kwak, Y.-K., Colque, P., Byfors, S., Giske, C.G., Möllby, R., Kühn, I., 2015. Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm during 1 year: does it reflect the resistance trends in the society? International Journal of Antimicrobial Agents 45, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.09.016>
- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., Petit, F., 2009. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). FEMS Microbiology Ecology 68, 118–130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00655.x>
- Larsson, D.G.J., Andreumont, A., Bengtsson-Palme, J., Brandt, K.K., de Roda Husman, A.M., Fagerstedt, P., Fick, J., Flach, C.-F., Gaze, W.H., Kuroda, M., Kvint, K., Laxminarayan, R., Manaia, C.M., Nielsen, K.M., Plant, L., Ploy, M.-C., Segovia, C., Simonet, P., Smalla, K., Snape, J., Topp, E., van Hengel, A.J., Verner-Jeffreys, D.W., Virta, M.P.J., Wellington, E.M., Wernersson, A.-S., 2018. Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. Environment International 117, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.041>
- Lenart-Boroń, A., 2017. Antimicrobial resistance and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* from major rivers in Podhale, southern Poland. Int. J. Environ. Sci. Technol. 14, 241–250. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1155-4>
- Lenart-Boroń, A.M., Kulik, K., Jelonkiewicz, E., 2020. Antimicrobial resistance and ESBL genes in *E. coli* isolated in proximity to a sewage treatment plant. Journal of Environmental Science and Health, Part A 55, 1571–1580. <https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1826774>
- Leonard, A.F.C., Zhang, L., Balfour, A.J., Garside, R., Gaze, W.H., 2015. Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. Environment International 82, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.02.013>

- Leonard, A.F.C., Zhang, L., Balfour, A.J., Garside, R., Hawkey, P.M., Murray, A.K., Ukoumunne, O.C., Gaze, W.H., 2018. Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environment International* 114, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.003>
- Li, N., Sheng, G.-P., Lu, Y.-Z., Zeng, R.J., Yu, H.-Q., 2017. Removal of antibiotic resistance genes from wastewater treatment plant effluent by coagulation. *Water Research* 111, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.010>
- Lions, J., Hartmann, A., Togola, A., Duyck, G., Fabre, M., Neuwirth, C., 2018. Exposition des eaux souterraines peu profondes à *Escherichia coli* résistant aux antibiotiques: approche hydrochimique pour identifier les sources et les voies de transfert. *La Houille Blanche* 5–12. <https://doi.org/10.1051/lhb/2018036>
- Liu, H., Zhou, H., Li, Q., Peng, Q., Zhao, Q., Wang, J., Liu, X., 2018. Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from the rivers and lakes in Northwest China. *BMC Microbiol* 18, 125. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1270-0>
- Livermore, D.M., 2003. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. *Clinical Infectious Diseases* 36, S11–S23. <https://doi.org/10.1086/344654>
- Londong, J., Barth, M., Söbke, H., 2023. Reducing antimicrobial resistances by source separation of domestic wastewater. *Front. Environ. Health* 2. <https://doi.org/10.3389/fenvh.2023.1151898>
- Łuczkiwicz, A., Jankowska, K., Fudala-Książek, S., Olańczuk-Neyman, K., 2010. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Research* 44, 5089–5097. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.007>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mahéroul, A.-C., Kemble, H., Magnan, M., Gachet, B., Roche, D., Le Nagard, H., Tenaillon, O., Denamur, E., Branger, C., Landraud, L., 2019. Advantage of the F2:A1:B- IncF Pandemic



- Plasmid over IncC Plasmids in In Vitro Acquisition and Evolution of blaCTX-M Gene-Bearing Plasmids in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e01130-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01130-19>
- Mainil J., Van Bost S., 2004. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : IV) Souches nécrotoxigènes. *Ann. Méd. Vét.* 148, 121–132.
- Martak, D., Henriot, C.P., Broussier, M., Couchoud, C., Valot, B., Richard, M., Couchot, J., Bornette, G., Hocquet, D., Bertrand, X., 2020. High Prevalence of Human-Associated *Escherichia coli* in Wetlands Located in Eastern France. *Front Microbiol* 11, 552566. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.552566>
- Matviichuk, O., Mondamert, L., Geffroy, C., Dagot, C., Labanowski, J., 2023. Life in an unsuspected antibiotics world: River biofilms. *Water Research* 231, 119611. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119611>
- Meeus, P., Grypdonck, L., Dalcq, V., Swine, B., Falleur, M.D., Declercq, K., Beauport, D., 2024. Consommation de médicaments en officine publique - Analyse de la répartition et de l'évolution de la consommation en volumes et en dépenses par assuré en Belgique pour l'année 2022. INAMI - RIZIV.
- Merida-Vieyra, J., De Colsa, A., Calderon Castañeda, Y., Arzate Barbosa, P., Aquino Andrade, A., 2016. First Report of Group CTX-M-9 Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Pediatric Patients in Mexico. *PLoS One* 11, e0168608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168608>
- Mills, M.C., Lee, J., 2019. The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environmental Pollution* 255, 113143. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113143>
- Montero, L., Irazabal, J., Cardenas, P., Graham, J.P., Trueba, G., 2021. Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing-*Escherichia coli* Isolated From Irrigation Waters and Produce in Ecuador. *Front. Microbiol.* 12, 709418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709418>
- Moulin-Schouleur, M., Répérant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D., Schouler, C., 2007. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains of Avian and Human Origin: Link between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3366–3376. <https://doi.org/10.1128/JCM.00037-07>

- Munir, M., Wong, K., Xagorarakis, I., 2011. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Research* 45, 681–693. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.033>
- Munoz-Price, L.S., Poirel, L., Bonomo, R.A., Schwaber, M.J., Daikos, G.L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M.K., Kumarasamy, K., Livermore, D.M., Maya, J.J., Nordmann, P., Patel, J.B., Paterson, D.L., Pitout, J., Villegas, M.V., Wang, H., Woodford, N., Quinn, J.P., 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 13, 785–796. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)
- Muylaert, A., Mainil, J. g., 2012. Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét.* 156, 109–123.
- Nappier, S.P., Liguori, K., Ichida, A.M., Stewart, J.R., Jones, K.R., 2020. Antibiotic Resistance in Recreational Waters: State of the Science. *IJERPH* 17, 8034. <https://doi.org/10.3390/ijerph17218034>
- Nascimento, T., Cantamessa, R., Melo, L., Fernandes, M.R., Fraga, E., Dropa, M., Sato, M.I.Z., Cerdeira, L., Lincopan, N., 2017. International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. *Science of The Total Environment* 598, 910–915. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.207>
- Nikaido, H., 2009. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 119–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>
- Nordmann, P., Carrer, A., 2010. Les carbapénèmases des entérobactéries. *Archives de Pédiatrie* 17, S154–S162. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(10\)70918-0](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(10)70918-0)
- Nott, K., Gillet, M., Carbonnelle, P., Frippiat, C., Moutier, M., Ronkart, S., Delloye, F., Brahy, V., 2018. Recherche des substances émergentes dans les eaux et intéressant la santé publique et l'environnement. Programme de Recherche « IMHOTEP » (Inventaire des Matières Hormonales et Organiques en Traces dans les Eaux Patrimoniales et Potabilisables).
- Oberlé, K., 2012. Devenir des antibiotiques et des populations d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus* spp. dans les hydrosystèmes de surface. Université de Rouen.
- Official Journal of the European Union, 2006. DIRECTIVE 2006/7/EC.

- O'Flaherty, E., Solimini, A., Pantanella, F., Cummins, E., 2019. The potential human exposure to antibiotic resistant-*Escherichia coli* through recreational water. *Science of The Total Environment* 650, 786–795. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.018>
- OMS, 2016. Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens. Organisation mondiale de la Santé, Genève.
- Orskov, F., Orskov, I., 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* 38, 699–704.
- Oteo, J., Pérez-Vázquez, M., Bautista, V., Ortega, A., Zamarrón, P., Saez, D., Fernández-Romero, S., Lara, N., Ramiro, R., Aracil, B., Campos, J., 2016. The spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Spain: WGS analysis of the emerging high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 and ST512/KPC-3. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 3392–3399. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw321>
- Paczosa, M.K., Mecsas, J., 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80, 629–661. <https://doi.org/10.1128/membr.00078-15>
- Pallares-Vega, R., Blaak, H., van der Plaats, R., de Roda Husman, A.M., Hernandez Leal, L., van Loosdrecht, M.C.M., Weissbrodt, D.G., Schmitt, H., 2019. Determinants of presence and removal of antibiotic resistance genes during WWTP treatment: A cross-sectional study. *Water Research* 161, 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.100>
- Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A., 2011. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/aac.00296-11>
- Parte, A.C., 2014. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucl. Acids Res.* 42, D613–D616. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1111>
- Peirano, G., Bradford, P., Kazmierczak, K.M., Badal, R.E., Hackel, M., Hoban, D.J., Pitout, J.D.D., 2014. Global Incidence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* ST131 - Volume 20, Number 11—November 2014 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC. *Emerging Infectious Diseases* 20. <https://doi.org/10.3201/eid2011.141388>

- Peirano, G., Pitout, J.D.D., 2019. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs* 79, 1529–1541. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01180-3>
- Peirano, G., Pitout, J.D.D., 2010. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* 35, 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003>
- Pepper, I.L., Brooks, J.P., Gerba, C.P., 2018. Antibiotic Resistant Bacteria in Municipal Wastes: Is There Reason for Concern? *Environ. Sci. Technol.* 52, 3949–3959. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04360>
- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., Denamur, E., 1999. The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. *Infect Immun* 67, 546–553. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.2.546-553.1999>
- Pitout, J.D., Laupland, K.B., 2008. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases* 8, 159–166. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0)
- Pitout, J.D.D., DeVinney, R., 2017. *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination. <https://doi.org/10.12688/fl000research.10609.1>
- Pitout, J.D.D., Nordmann, P., Laupland, K.B., Poirel, L., 2005. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, 52–59. <https://doi.org/10.1093/jac/dki166>
- Ploy, M., Denis, F., Lambert, T., 2000. Les intégrons : un système original de capture de gènes chez les bactéries. *Med Sci (Paris)* 16, 255. <https://doi.org/10.4267/10608/1631>
- Podschun, R., Ullmann, U., 1998. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev* 11, 589–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
- Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., Nordmann, P., 2004. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 15–22. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>

- Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., 2008. Genetic support of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 75–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01865.x>
- Pokharel, P., Dhakal, S., Dozois, C.M., 2023. The Diversity of *Escherichia coli* Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. *Microorganisms* 11, 344. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020344>
- Polianciuc, S.I., Gurzău, A.E., Kiss, B., Ștefan, M.G., Loghin, F., 2020. Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Med Pharm Rep* 93, 231–240. <https://doi.org/10.15386/mpr-1742>
- Proia, L., Anzil, A., Borrego, C., Farrè, M., Llorca, M., Sanchis, J., Bogaerts, P., Balcázar, J.L., Servais, P., 2018. Occurrence and persistence of carbapenemases genes in hospital and wastewater treatment plants and propagation in the receiving river. *Journal of Hazardous Materials* 358, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.06.058>
- Quainoo, S., Coolen, J.P.M., Van Hijum, S.A.F.T., Huynen, M.A., Melchers, W.J.G., Van Schaik, W., Wertheim, H.F.L., 2017. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clin Microbiol Rev* 30, 1015–1063. <https://doi.org/10.1128/CMR.00016-17>
- Quellec, F.L., 2015. Bon usage des carbapénèmes: mise en place d'une évaluation des pratiques professionnelles comparant deux années de prescriptions. *Sciences pharmaceutiques dumas*-01212350.
- Quinn, P.J., 2011. *Veterinary microbiology and microbial disease*, 2nd ed. ed. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Ramírez Castillo, F.Y., Avelar González, F.J., Garneau, P., Márquez Díaz, F., Guerrero Barrera, A.L., Harel, J., 2013. Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Front. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00147>
- Reinthal, F.F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., Melkes, A., Posch, J., Winter, I., Zarfel, G., 2010. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Research* 44, 1981–1985. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.052>
- Robin, F., Beyrouthy, R., Bonacorsi, S., Aissa, N., Bret, L., Brieu, N., Cattoir, V., Chapuis, A., Chardon, H., Degand, N., Doucet-Populaire, F., Dubois, V., Fortineau, N., Grillon, A., Lanotte, P., Leyssene, D., Patry, I., Podglajen, I., Recule, C., Ros, A., Colomb-Cotin, M., Ponties, V.,

- Ploy, M.C., Bonnet, R., 2017. Inventory of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in France as Assessed by a Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother* 61, e01911-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01911-16>
- Rodriguez-villalobos, H., Struelens, M.-J., 2006. Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation* 15, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.03.006>
- Rossoni, R.D., Ribeiro, F. de C., dos Santos, H.F.S., dos Santos, J.D., Oliveira, N. de S., Dutra, M.T. dos S., de Lapena, S.A.B., Junqueira, J.C., 2019. *Galleria mellonella* as an experimental model to study human oral pathogens. *Archives of Oral Biology* 101, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.03.002>
- Roux, A., Ghigo, J.-M., 2006. Les biofilms bactériens. *bavf* 159, 261–268. <https://doi.org/10.4267/2042/47842>
- Russo, T.A., Marr, C.M., 2019. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology Reviews* 32, 10.1128/cmr.00001-19. <https://doi.org/10.1128/cmr.00001-19>
- Schets, F.M., Schijven, J.F., de Roda Husman, A.M., 2011. Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. *Water Research* 45, 2392–2400. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.01.025>
- Schijven, J.F., Blaak, H., Schets, F.M., de Roda Husman, A.M., 2015. Fate of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Faecal Sources in Surface Water and Probability of Human Exposure through Swimming. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11825–11833. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01888>
- Serrano, I., Verdial, C., Tavares, L., Oliveira, M., 2023. The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation. *Antibiotics* 12, 505. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030505>
- Servais, P., Passerat, J., 2009. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of The Total Environment* 408, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.09.042>
- Sharma, V.K., Johnson, N., Cizmas, L., McDonald, T.J., Kim, H., 2016. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere* 150, 702–714. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.084>

- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P.C., de la Cruz, F., 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 434–452. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Song, W., Park, M.-J., Jeong, S., Shin, D.H., Kim, J.-S., Kim, H.S., Kim, H.-S., Lee, N., Hong, J.S., Jeong, S.H., 2020. Rapid Identification of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae From Culture: Evaluation of the RESIST-4 O.K.N.V. Multiplex Lateral Flow Assay. *Annals of Laboratory Medicine* 40, 259–263. <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.3.259>
- Sousa, J.M., Macedo, G., Pedrosa, M., Becerra-Castro, C., Castro-Silva, S., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2017. Ozonation and UV254 nm radiation for the removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from urban wastewater. *Journal of Hazardous Materials, Special Issue on Emerging Contaminants in engineered and natural environment* 323, 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.096>
- SPF santé publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement, 2020. Plan d'action national belge "One Health" de lutte contre la résistance aux antimicrobiens 2020-2024.
- Stalder, T., Barraud, O., Jové, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2014. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J* 8, 768–777. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.189>
- Taylor, N.G.H., Verner-Jeffreys, D.W., Baker-Austin, C., 2011. Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends in Ecology & Evolution* 26, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.004>
- Teixeira, P., Tacão, M., Pureza, L., Gonçalves, J., Silva, A., Cruz-Schneider, M.P., Henriques, I., 2020. Occurrence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a Portuguese river: blaNDM, blaKPC and blaGES among the detected genes. *Environ Pollut* 260, 113913. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113913>
- Tooke, C.L., Hinchliffe, P., Bragginton, E.C., Colenso, C.K., Hirvonen, V.H.A., Takebayashi, Y., Spencer, J., 2019.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology* 431, 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Tsai, C.J.-Y., Loh, J.M.S., Proft, T., 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7, 214–229. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>

- Tyagi, N., Kumar, A., 2021. Evaluation of recreational risks due to exposure of antibiotic-resistance bacteria from environmental water: A proposed framework. *Journal of Environmental Management* 279, 111626. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111626>
- Urase, T., Okazaki, M., Tsutsui, H., 2020. Prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in treated wastewater: a comparison with nosocomial infection surveillance. *Journal of Water and Health* 18, 899–910. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.014>
- Van Elsas, J.D., Semenov, A.V., Costa, R., Trevors, J.T., 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J* 5, 173–183. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.80>
- Walsh, T.R., Weeks, J., Livermore, D.M., Toleman, M.A., 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases* 11, 355–362. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70059-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70059-7)
- Westrell, T., Schönning, C., Stenström, T.A., Ashbolt, N.J., 2004. QMRA (quantitative microbial risk assessment) and HACCP (hazard analysis and critical control points) for management of pathogens in wastewater and sewage sludge treatment and reuse. *Water Science and Technology* 50, 23–30. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0079>
- White, A., Hughes, J.M., 2019. Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. *EcoHealth* 16, 404–409. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01415-5>
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6578–6583.
- Wilson, H., Török, M.E., 2018. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microbial Genomics* 4. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000197>
- World Health Organization, 2016. *Quantitative Microbial Risk Assessment: Application for Water Safety Management*. World Health Organization, Geneva.
- Wyres, K.L., Lam, M.M.C., Holt, K.E., 2020. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol* 18, 344–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>



- Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T.R., 2009. Characterization of a New Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 5046–5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
- Zhang, B., Hu, R., Liang, Q., Liang, S., Li, Q., Bai, J., Ding, M., Zhang, F., Zhou, Y., 2022. Comparison of Two Distinct Subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* ST16 Co-Occurring in a Single Patient. *Microbiology Spectrum* 10, e02624-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02624-21>
- Zhao, X., Miao, Y., Adam, F.E.A., Zhao, H., Zhou, Z., Su, M., Li, R., Yang, B., Lv, Z., Xiao, S., Wang, X., Wang, J., Yang, Z., 2022. ESBLs-producing *Escherichia coli* from sheep-origin: Genome-wide virulence genes identification and in vivo virulence assessment in mice and *Galleria mellonella*. *Transboundary Emerging Dis* 69, 3606–3617. <https://doi.org/10.1111/tbed.14729>
- Zheng, J., Su, C., Zhou, J., Xu, L., Qian, Y., Chen, H., 2017. Effects and mechanisms of ultraviolet, chlorination, and ozone disinfection on antibiotic resistance genes in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants. *Chemical Engineering Journal* 317, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.076>



**Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège**

**4000 Liège (Belgique)**

D/2024/0480/7

ISBN 978-2-87543-213-1

