



Projet Antibiobug : Etude des bactéries antibiorésistantes dans les cours d'eaux en Région wallonne

Plan ENVleS – financé par le SPW

Leslie Crettels

Ir. Gembloux Agro-Bio Tech
PhD student sciences vétérinaires Uliège

l.crettels@issep.be



Présentation de l'ISSeP

- **Laboratoire de référence** dans le domaine de la **surveillance de l'environnement** en Wallonie.
- Surveillance de **l'air ambiant, des eaux (eaux de surface, souterraine, baignade,...)**, étude des **sols** et caractérisation des **déchets**.

2 Sites
Liège & Colfontaine



~300 collaborateurs



~120 masters or >



~180 techniciens



~150 Méthodes accréditées
eau, air, sol & sédiment

~15000 Échantillons environnementaux
analysés au labo chaque année



060-TEST 060-PT
EN ISO/IEC EN ISO/IEC
17025:2005 17043:2010

>30 Projets de recherche
En surveillance de l'environnement,
Evaluation des risques environnement-santé

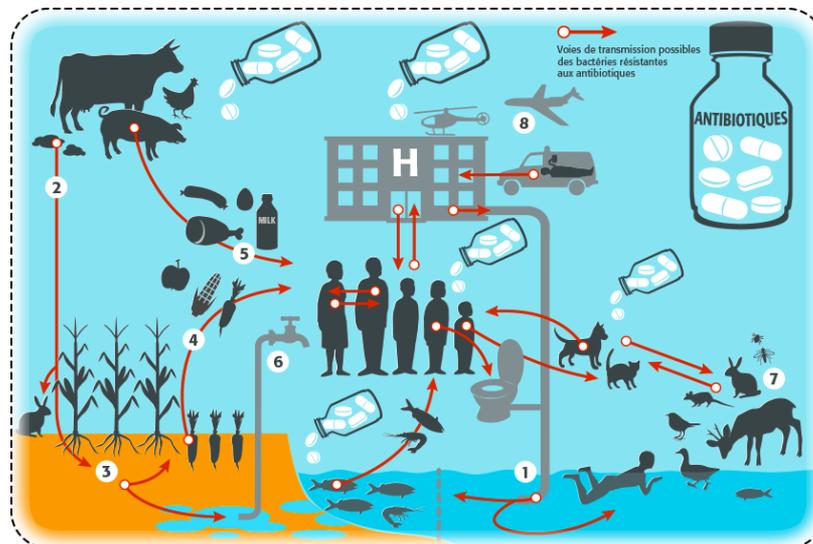


Objectifs du projet

Vérifier la présence de bactéries antibiorésistantes dans les cours d'eaux

Pour répondre à cet objectif :

- Mettre au point une méthodologie
- Sélectionner les cours d'eaux et effluents à analyser



- Choix de l'espèce bactérienne à surveiller

Veille bibliographique  sélection d'*Escherichia coli*

- Choix des antibiotiques (Ab) à tester

Critères :

- Le domaine d'utilisation : Ab à usage exclusivement vétérinaire, hospitalier et à usage mixte
- La famille d'Ab : couverture maximale des familles d'Ab
- Le volume des ventes : données INAMI pour 2017 (Classification ATC/DDD)
- Le référencement par l'EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

Exemple: liste des 20 antibiotiques les plus prescrits et remboursés par l'INAMI en milieu hospitalier belge en 2017 (source : base de données pharmanet) ; en gris, ceux sélectionnés pour notre étude :

CODE ATC	ANTIBIOTIQUES	FAMILLE	QUANTITÉ VENDUE EN 2017 (KG)
J01CR05	PIPERACILLINE ET INHIBITEURS D'ENZYMES	PÉNICILLINES	5825
J01CR02	AMOXICILLINE ET INHIBITEURS D'ENZYMES	PÉNICILLINES	2709
J01DB04	CEFAZOLINE	CÉPHALOSPORINE 1G	1637
J01CF05	FLUCLOXACILLINE	PÉNICILLINES	758
J01DH02	MÉROPÉNÈME	CARBAPÉNÈME (BÉTA-LACTAMINE)	598
J01DD02	CEFTAZIDIME	CÉPHALOSPORINE 3G	496
J01DD04	CEFTRIAZONE	CÉPHALOSPORINE 3G	462
J01CE01	BENZYL PENICILLINE	PÉNICILLINES	392
J01CA04	AMOXICILLINE	PÉNICILLINES	392
J01CA17	TEMOCILLINE	PÉNICILLINES	314
J01MA02	CIPROFLOXACINE	FLUOROQUINONES	308
J01XA01	VANCOMYCINE	GLYCOPEPTIDES	307
J01CA01	AMPICILLINE	PÉNICILLINES	251
J01FF01	CLINDAMYCINE	LINCOSAMIDES	198
J01EE01	SULFAMETHOXAZOLE ET TRIMETHOPRIME	SULFAMIDÉS + DIAMINOPYRIMIDINES	190
J01DE01	CEFEPIME	CÉPHALOSPORINE 4G	183
J01XX01	FOSFOMYCINE	ACIDES PHOSPHONIQUES	177
J01DC02	CEFUROXIME	CÉPHALOSPORINE 2G	159
J01XD01	METRONIDAZOLE	IMIDAZOLÉS	156

INAMI:

Ab hospitalier belge

Ab officine belge

Ab officine wallonne

+

Rapport Belvet-sac :

Ab à usage vétérinaire

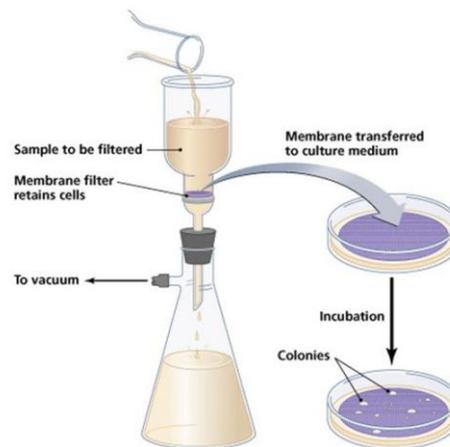
Liste des 12 antibiotiques sélectionnés:

Domaine d'utilisation	Antibiotique	Famille
Exclusivement vétérinaire	Florfénicol (FFC, 30 µg)	Phénicol
	Enrofloxacin (ENR, 5 µg)	Fluoroquinolone
Exclusivement hospitalier	Pipéracilline/Tazobactam (TZP, 30/6 µg)	Pénicilline (β-lactamine) + Inhibiteur de β-lactamase
	Ceftazidime (CAZ, 10 µg)	Céphalosporine 3 ^{ème} G (β-lactamine)
	Méropénème (MEM, 10 µg)	Carbapénème (β-lactamine)
	Ertapénème (ETP, 10 µg)	Carbapénème (β-lactamine)
Hospitalier et domestique	Céfuroxime (CXM, 30 µg)	Céphalosporine 2 ^{ème} G (β-lactamine)
	Ciprofloxacine (CIP, 5 µg)	Fluoroquinolone
Hospitalier, domestique et vétérinaire	Gentamicine (surtout vétérinaire) (CN, 10 µg)	Aminoglycoside
	Ampicilline (AMP, 10 µg)	Pénicilline (β-lactamine)
	Amoxicilline/acide clavulanique (AMC, 20/10 µg)	Pénicilline (β-lactamine) + Inhibiteur de β-lactamase
	Sulfaméthoxazole/Triméthoprime (co-trimoxazole) (SXT, 23.75/1.25 µg)	Sulfamidés + diaminopyridine

- Mise en œuvre et validation d'un test d'antibiorésistance de référence

1) ISOLEMENT DE SOUCHE D'*E. COLI* À PARTIR D'ÉCHANTILLONS D'EAU

- ✓ 1^{ère} filtration sur membrane : dilution?, milieu TBX ($37 \pm 2^\circ\text{C}$ - $21 \pm 3\text{h}$)
- ✓ 2^{ème} filtration sur membrane: 2 dilutions successives sur milieu TBX et « TBX + AMX» ($37 \pm 2^\circ\text{C}$ - $21 \pm 3\text{h}$) :



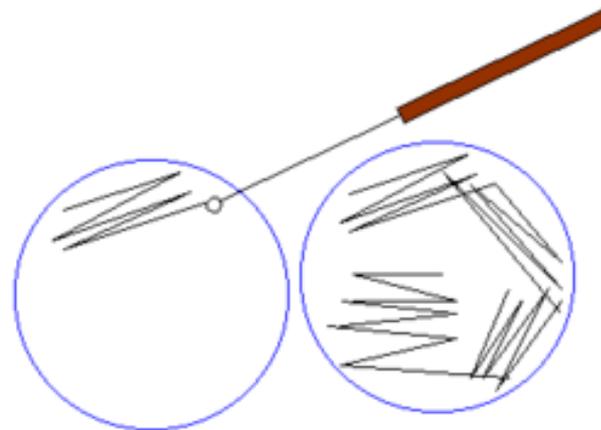
Source : <https://slideplayer.fr/slide/3696265/>

- ✓ Repiquage d'au maximum 10 *E. coli* caractéristiques provenant d'une boîte de pétri TBX et «TBX+AMX» par échantillon sur milieu TBX (37± 2°C - 21 ±3h)



TBX ou TBX+AMX

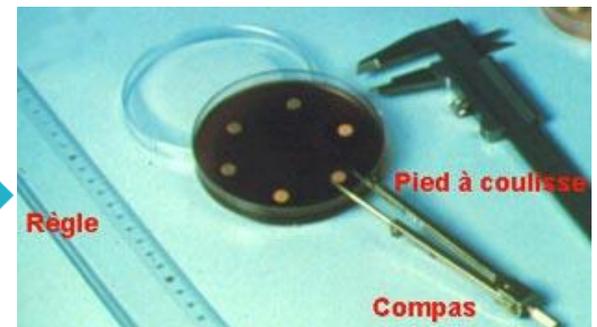
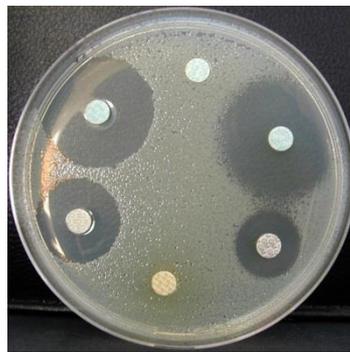
Max. 10 *E. coli*



TBX

2) TEST PAR DIFFUSION D'ANTIBIOTIQUES SUR GÉLOSE (SELON EUCAST)

- Préparation de l'inoculum (turbidité 0,5 McFarland sauf Ab vétérinaires)
- Inoculation des géloses de Mueller-Hinton
- Dépôt des disques imprégnés d'antibiotique
- Incubation des boîtes de Pétri (35±2°C - 20±4h pour *E. coli*)
- Lecture des boîtes après incubation
- Mesure des zones d'inhibition et catégorisation clinique
- Contrôle qualité (souche ATTC 25922) → cartes de contrôle/Ab



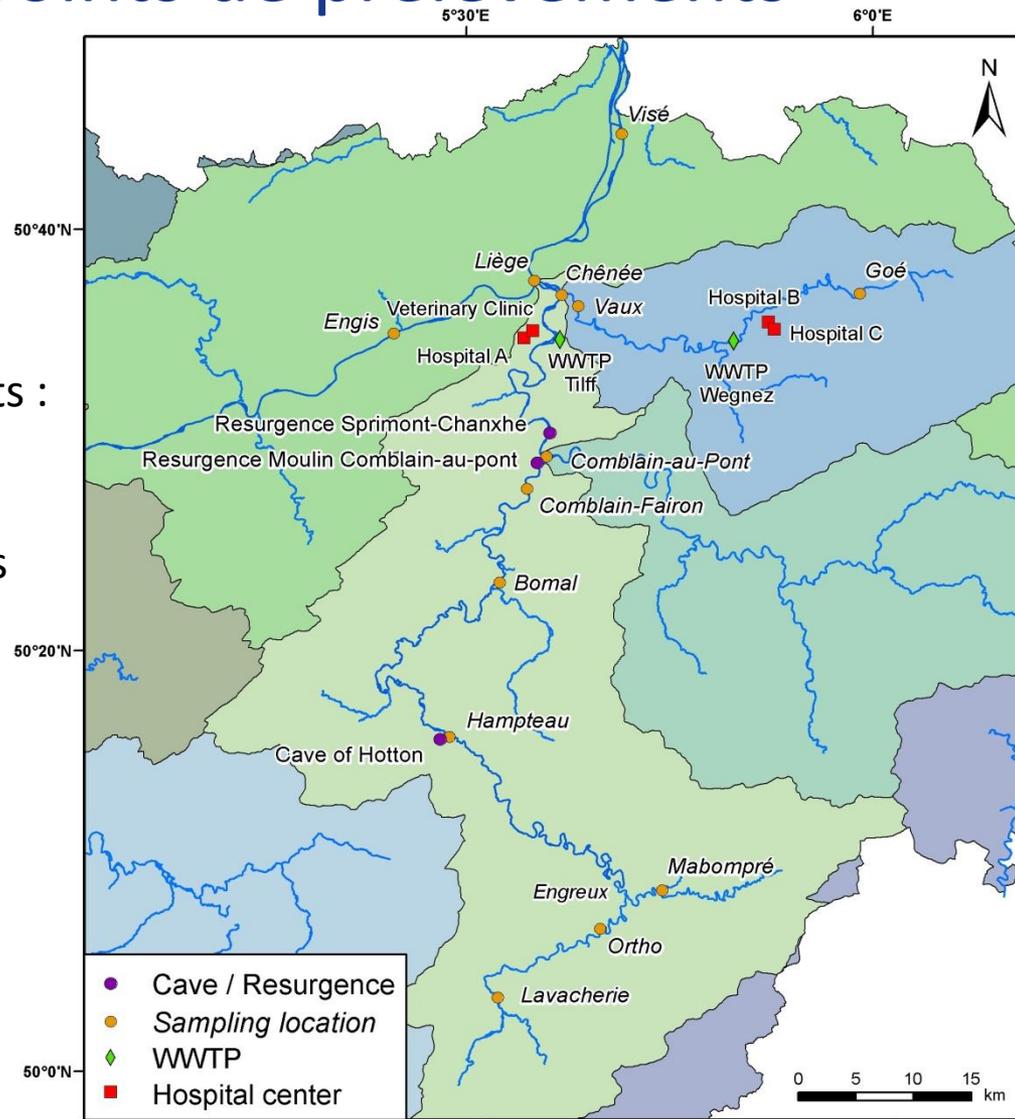
- ✓ Mesure des diamètres d'inhibition et catégorisation clinique S, I, R (nouvelle définition EUCAST depuis 01/2019):

DOMAINE D'UTILISATION	ANTIBIOTIQUE	CONTENU DU DISQUE (µg)	DIAMÈTRE D'INHIBITION (mm)		
			S ≥	R <	ATU
EXCLUSIVEMENT VÉTÉRINAIRE	FLORFÉNICOL	30	19	15	
	ENROFLOXACINE	5	19	19	
EXCLUSIVEMENT HOSPITALIER	PIPÉRACILLINE/TAZOBACTAM	30/6	20	17	17-19
	CEFTAZIDIME	10	22	19	
	MÉROPÉNÈME	10	22	16	
	ERTAPÉNÈME	10	25	22	
HOSPITALIER ET DOMESTIQUE	CÉFUROXIME	30	19	19	
	CIPROFLOXACINE	5	25	22	22-24
HOSPITALIER, DOMESTIQUE ET VÉTÉRINAIRE	GENTAMICINE (SURTOUT VÉTÉRINAIRE)	10	17	14	
	AMPICILLINE	10	14	14	
	AMOXICILLINE/ACIDE CLAVULANIQUE	20-10	19	19	19-20
	SULFAMÉTHOXAZOLE ET TRIMÉTHOPRIME (CO-TRIMOXAZOLE)	23,75-1,25	14	11	

• Choix des points de prélèvements

24 points de prélèvements :

- 17 ESU
- 3 ESO
- 4 effluents hospitaliers



Prélèvement sur l'Ourthe en amont de la STEP de Tilff :



Prélèvement à l'hôpital B:



Prélèvement à l'hôpital A :



Deux campagnes de prélèvement ont été réalisées (mai et octobre 2019) :

✓ **1^{ère} campagne de prélèvement :**

- du 13 au 22 mai 2019 (isolement des *E. coli*)
- 24 points prélevés au total
- a permis l'isolement de 473 souches d'*Escherichia coli*
- les analyses (antibiogrammes) ont été réalisées du 03 juin au 9 août 2019 (10 semaines)

✓ **2^{ème} campagne de prélèvement :**

- du 30 septembre au 11 octobre 2019 (isolement des *E. coli*)
- 24 points prélevés au total (même points de prélèvement que la campagne 1)
- a permis l'isolement de 465 souches d'*Escherichia coli*
- les analyses (antibiogrammes) ont été réalisées du 14 octobre au 13 décembre 2019 (9 semaines)

- Dénombrement des *E. coli* – 1^{ère} campagne

Code	Code Station	Localisation	<i>E. coli</i> /100 ml		Résistance à l'AMX (%) = ("TBX+AMX"/TBX) x 100
			TBX	TBX+AMX	
A	3290	Engis	$3,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	49
B	3294	Liège	$1,1 \times 10^3$	$3,4 \times 10^2$	30
C	3315	Visé	$1,1 \times 10^3$	$5,1 \times 10^2$	47
D	50109	Lavacherie	$6,9 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	17
E	11211	Ortho	95	19	20
F	11221	Mabompré	$1,3 \times 10^2$	25	20
G	4271	Hampteau	$1,8 \times 10^2$	50	28
H	15006	Comblain-Fairon	$2,9 \times 10^2$	86	30
I	4325	Angleur	$1,2 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$	40
J	50049	Bomal	$8,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	18
K	4430	Comblain-au-pont	$1,5 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$	20
L	4630	Vaux-sous-chèvremont	$6,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	27
M	-	Hôpital A	$1,1 \times 10^7$	$9,4 \times 10^6$	88
N	-	Faculté vétérinaire	$5,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	32
O	-	Amont STEP Tilff	$1,2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	29
P	-	Aval STEP Tilff	$1,3 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$	25
Q	-	Hôpital B	$7,5 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	31
R	-	Hôpital C	$2,1 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$	26
S	-	Amont STEP Wegnez	$2,8 \times 10^4$	$8,5 \times 10^3$	31
T	-	Aval STEP Wegnez	$2,0 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	22
U	4550	Goé	$2,7 \times 10^3$	$8,5 \times 10^2$	32
V	31318	Résurgence Sprimont-Chanxhe	$5,5 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	31
W	31317	Résurgence Comblain-au-Pont	$1,6 \times 10^3$	$4,9 \times 10^2$	31
X	31506	Grotte d'Hotton	$4,4 \times 10^2$	95	22

Ce sont dans les effluents d'hôpitaux que le nombre d'*E. coli* dénombré est le plus élevé.

Pour l'hôpital A, le taux de résistance de *E. coli* à l'AMX atteint 88%.

Des *E. coli* antibiorésistants ont été observés à chacun des 24 points de prélèvement hormis à Bomal sur le TBX.

- Dénombrement des *E. coli* – 2^{ème} campagne

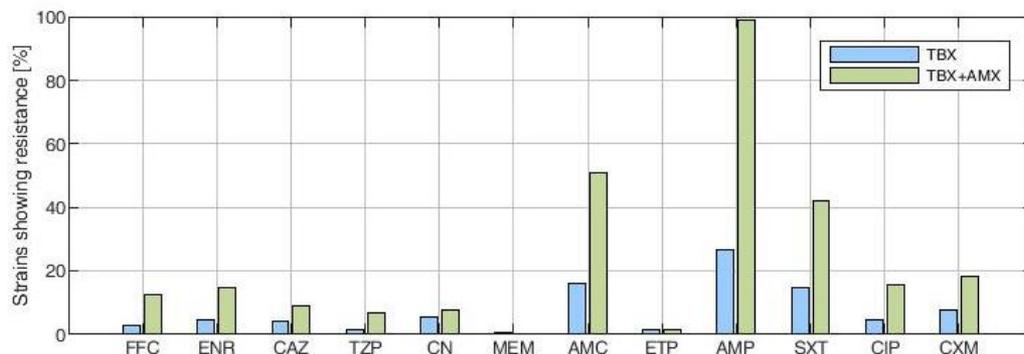
Code	Code station	Localisation	<i>E. coli</i> /100 ml		Résistance à l'AMX (%) = ("TBX+AMX"/TBX) x 100
			TBX	TBX+AMX	
A	3290	Engis	79	27	34
B	3294	Pont de Fragnée	6 x 10 ³	1,6 x 10 ³	27
C	3315	Visé	5,8 x 10 ²	1,8 x 10 ²	31
D	50109	Lavacherie	5,5 x 10 ³	8,2 x 10 ²	15
E	11211	Ortho	1,8 x 10 ³	2 x 10 ²	11
F	11221	Mabompré	3,1 x 10 ³	4,1 x 10 ²	13
G	4271	Hampteau	2,2 x 10 ³	5,2 x 10 ²	24
H	15006	Comblain-Fairon	5,5 x 10 ³	1,8 x 10 ³	33
I	4325	Angleur	6,3 x 10 ³	1,7 x 10 ³	28
J	50049	Bomal	4,2 x 10 ³	8,2 x 10 ²	20
K	4430	Comblain-au-pont	5,7 x 10 ³	1,5 x 10 ³	25
L	4630	Vaux-sous-chèvremont	9,5 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	17
M	-	Hôpital A	2,2 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	84
N	-	Faculté vétérinaire	3,3 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁶	78
O	-	Avant STEP Tilff	4,5 x 10 ³	1,2 x 10 ³	28
P	-	Après STEP Tilff	6,3 x 10 ³	1,5 x 10 ³	24
Q	-	Hôpital B	4,4 x 10 ⁶	7,8 x 10 ⁵	18
R	-	Hôpital C	1,2 x 10 ⁶	9,5 x 10 ⁵	77
S	-	Avant STEP Wegnez	2,8 x 10 ⁴	5,6 x 10 ³	20
T	-	Après STEP Wegnez	9,2 x 10 ³	3 x 10 ³	33
U	4550	Goé	4,2 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	28
V	31318	Résurgence Sprimont-Chanxhe	2,3 x 10 ³	7,7 x 10 ²	34
W	31317	Résurgence Comblain-au-Pont	68	3	4
X	31506	Grotte de Hotton	3,9 x 10 ²	62	16

Pour l'hôpital A, le taux de résistance de *E. coli* à l'AMX atteint 84%. Ce taux atteint 78% pour la faculté vétérinaire et 77% pour l'hôpital C.

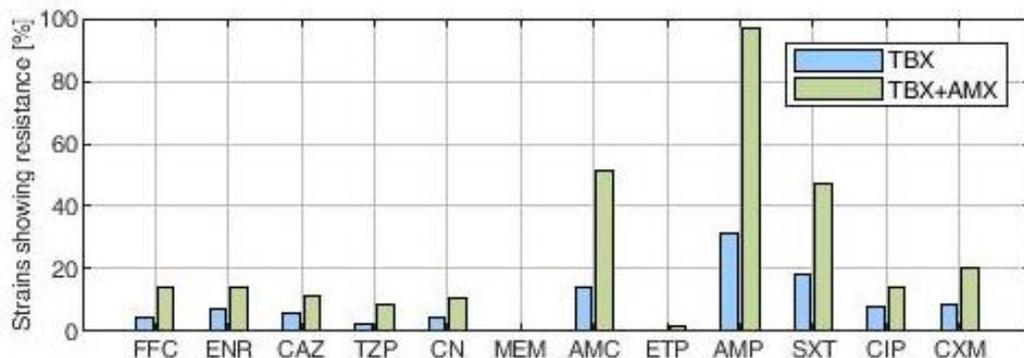
Des bactéries antibiorésistantes ont été observées à chacun des 24 points de prélèvement hormis à Mabompré et en amont de la STEP de Tilff sur du TBX.

- Taux de résistance par antibiotique et milieu de culture

Campagne 1 :



Campagne 2 :



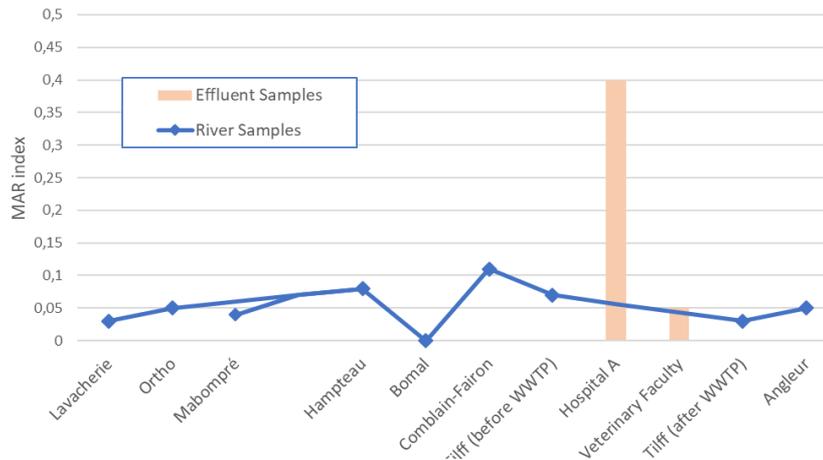
- Sur **TBX** et **TBX+AMX** :
AMP > AMC > SXT
- Peu de souches résistantes à MEM et ETP (carbapénèmes)
- Taux de résistance à ENR et CIP fort proches

- Pourcentage de souches résistantes à au moins 1, 2 et 3 antibiotiques par type de milieu pour les 2 campagnes d'analyse

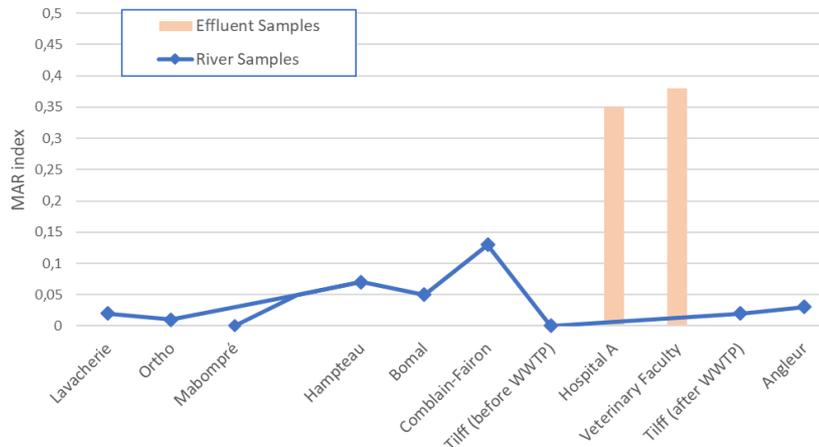
%age de souche résistantes	TBX			TBX+AMX		
	Campagne 1	Campagne 2	moyenne	Campagne 1	Campagne 2	moyenne
A au moins 1 antibiotique	32,2	33,3	32,7	100	99,6	99,8
A au moins 2 antibiotiques	23,8	25,5	24,6	74,8	76,6	75,7
A au moins 3 antibiotiques (multirésistantes)	13,8	17,6	15,7	39,7	46	42,8

- Evolution du Multiple antimicrobial resistance (MAR) index le long de l'Ourthe

Campagne 1 :



Campagne 2 :



$$\text{MAR index} = \frac{a}{b * c}$$

↑
 Nb total de résistance
 ↓ ↓
 Nb d'isolats Nb d'Ab testés

➔ Le MAR index varie de 0 à 1

Le graphique montre que l'impact du déversement des effluents hospitaliers de l'hôpital A et de la faculté vétérinaire n'est pas clairement démontré car il n'y a pas de variation conséquente dans le taux d'*E. coli* antibiorésistants mesuré avant et après la STEP de Tilff sur l'Ourthe.

Conclusions

- 938 souches d'*E. coli* ont été isolées sur les milieux TBX et TBX+AMX et leur résistance testée à 12 antibiotiques sélectionnés
 - ➡ l'ajout de l'AMX a permis de sélectionner plus facilement des *E. coli* antibiorésistants
- 2 campagnes d'analyses avec 24 points de prélèvement dans le bassin de l'Ourthe (+ Vesdre + Amblève + Meuse) ont eu lieu :
 - ➡ présence de *E. coli* antibiorésistants à tous les points de prélèvements
 - ➡ une différence liée à la saison n'a pu être démontrée
- Pour les 2 campagnes, taux de résistance fort proches ;
 - ➡ AMP>AMC>SXT pour le milieu TBX et TBX+AMX
 - ➡ peu de résistance aux carbapénèmes (ETP et MEM)

- Au niveau des techniques : réaliser des tests génotypiques et du séquençage pour savoir ce qui est inscrit dans les gènes et réellement exprimé.
- Autre bactérie à étudier (ex : *Klebsiella pneumoniae*)
- Elargir l'étude géographiquement et à plusieurs types d'eau (eau souterraine (puits), eau de baignade (lac), entrée/sortie STEP, boue de STEP,...)
- Au niveau réglementaire : pas encore de seuil de risque fixé (législation)

➡ Nouveaux projets en cours en microbiologie à l'ISSeP :

- Le projet EBLSE a débuté en juillet 2020 pour 2 ans et cible les *E. coli* productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) dans les cours d'eau wallons, en partenariat avec le service de bactériologie de la faculté des sciences vétérinaires de l'Uliège:
 - Réalisation de tests phénotypiques (antibiogramme) et génotypiques (PCR)
 - Réalisation de séquençage afin de connaître le résistome complet
- Le projet Antibio bug 2 a débuté en janvier 2021 pour 1 an et cible les *E. coli* antibiorésistants de 9 sites de baignade wallons

Merci pour votre attention !