

Transmission de la résistance chez l'animal et dans l'environnement

Isabelle Kempf,
ANSES, Ploufragan
Isabelle.kempf@anses.fr



16 & 17 Mars 2016

Résistance aux antibiotiques :
une approche intégrée
de l'environnement à l'Homme



ANTI-BIO

BIOCITECH, CITÉ DES ENTREPRISES DE SANTÉ ET DE BIOTECHNOLOGIES, ROMAINVILLE

• 1 - Transferts de résistance entre bactéries

1.1 - *In vitro* : transmission verticale et horizontale

3. Antimicrobial Resistance and Its Epidemiology 33

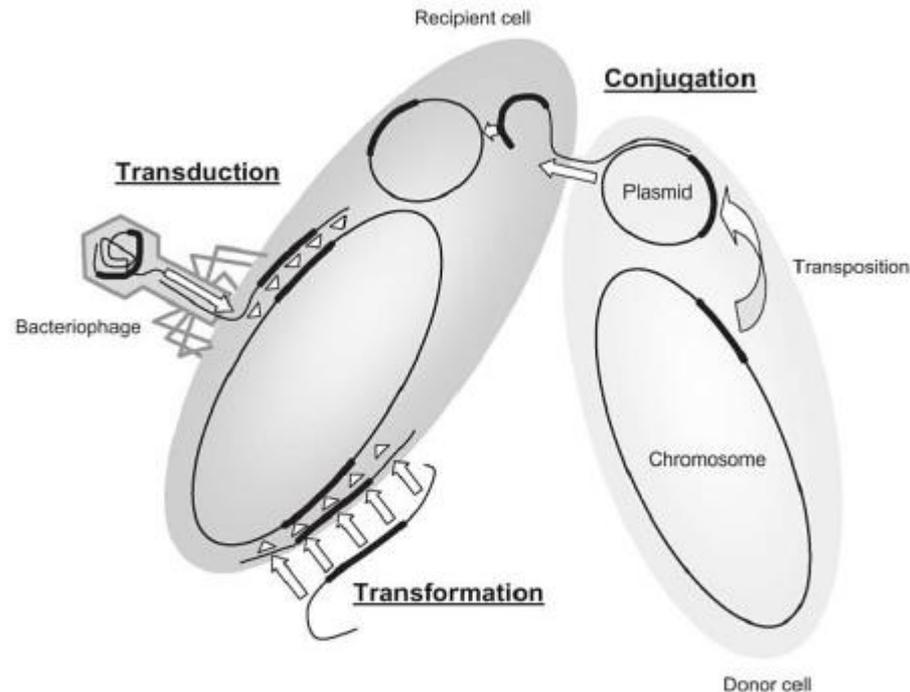


Figure 3.3. The three mechanisms of horizontal transfer of genetic material between bacteria. White arrows indicate the movement of genetic material and recombination events. Bold black lines represent antimicrobial resistance genes or gene clusters. In **transduction**, a bacteriophage injects its DNA into a bacterial cell and in the occurrence of a lysogenic phase, this DNA becomes integrated into the chromosome of the recipient cell. In **transformation**, naked DNA is taken up by a competent cell and may possibly recombine with homologous sequences in the recipient's genome. In **conjugation**, a plasmid is transferred from a donor bacterium (transfer is coupled with replication and a copy of the plasmid remains in the donor) to a recipient cell in which it can replicate. During its stay in various host bacteria, the plasmid may acquire a transposon carrying antimicrobial resistance genes.

Boerlin and White

• 1 - Transferts de résistance entre bactéries

- *Chez l'animal ?*



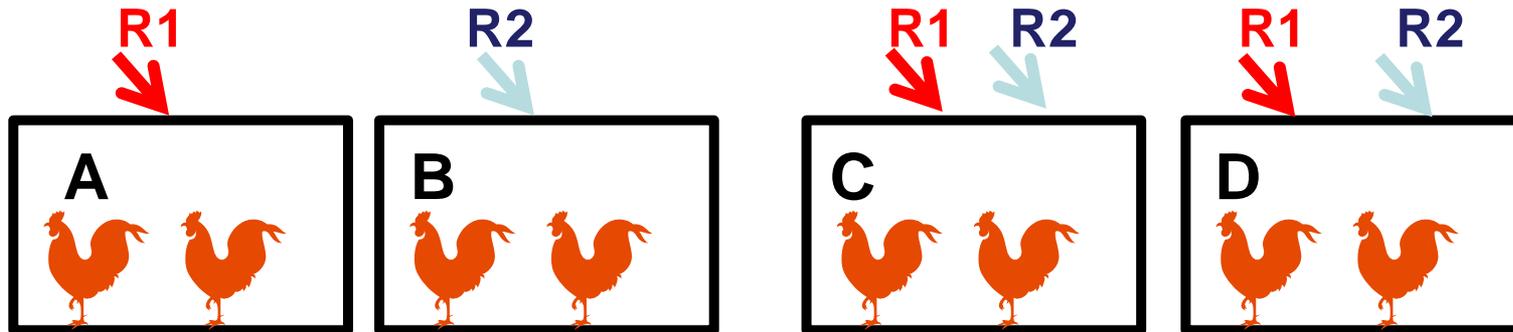
Etc...

Transfert de résistance entre souches de *Campylobacter jejuni*



Souche Cj R1 TET^R (*tetO*) et AMP^S
Souche Cj R2 TET^S et AMP^R

Inoculation par voie orale

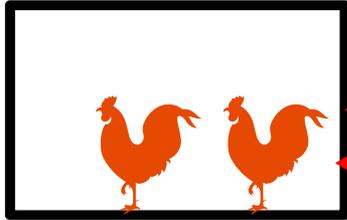


Prélèvements de matières fécales et analyse des souches de *C. jejuni*

- Isolateurs A : ré-isolement de R1
- Isolateur B : r-éisolement de R2
- Isolateurs C et D : réisolement de R1, R2 et de souches de *C. jejuni* résistante aux deux antibiotiques **R1+R2** (AMP^R et TET^R, *tetO*, profil RFLP de la souche R2)

Donc transfert de gènes de résistance entre deux bactéries de la même espèce, spontanément en absence de pression de sélection antibiotique

Transfert de résistance entre Entérobactéries



Inoculation par voie orale des poulets :

← *E. coli* R1 Rif^R **pMG252** (FOX, CHL, SUL, TMP, STR, KAN, TOB, GEN, NAL)

← *E. coli* R2 Rif^R **pMG298** (CTX, CHL, SUL, TMP, STR, KAN, TOB, GEN, TET, NAL)

Prélèvements de matières fécales et analyse des souches d'Entérobactéries

Sur milieux supplémentés (GEN, CTX ou FOX) : ré-isolément de R1 et R2

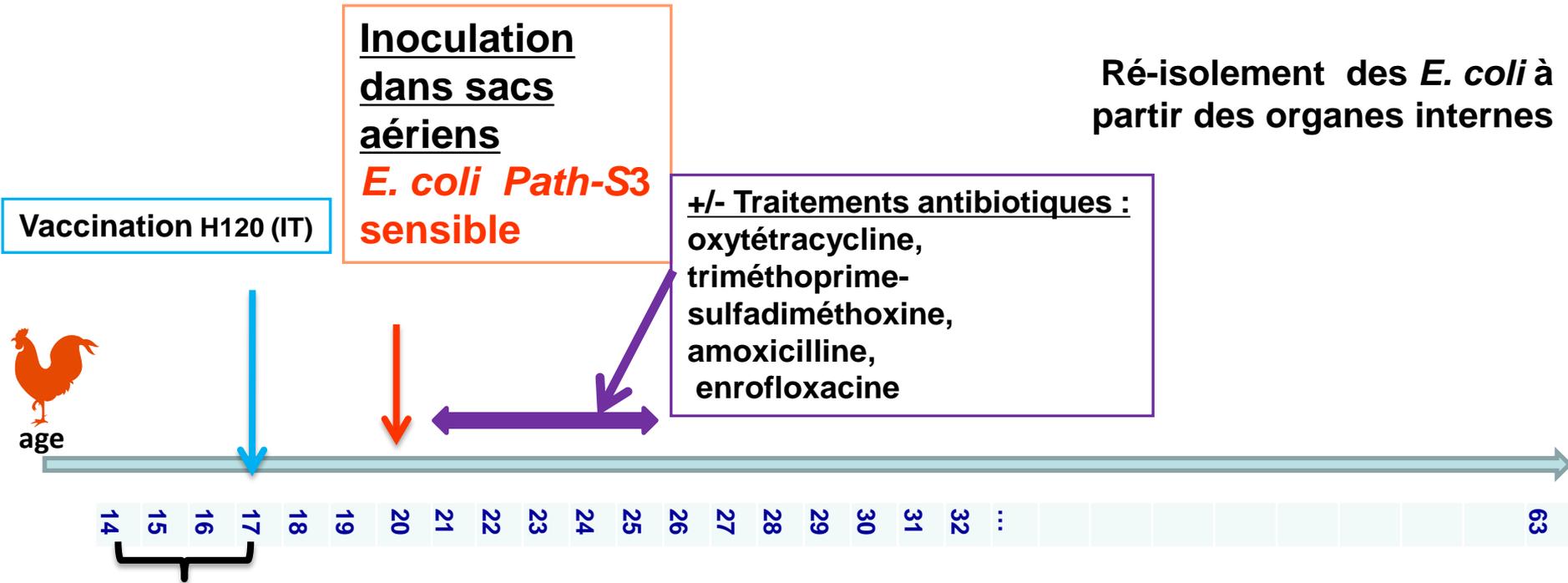
+ 36 jours après inoculation une autre souche de *E. coli* (non Rif^R, autre profil PFGE) ayant acquis toutes les résistances du plasmide pMG252,

+ à partir de J36 des isolats de *Klebsiella pneumoniae* ayant acquis les résistances du plasmide pMG298 sont isolés (de plus en plus souvent)

Donc, dans le microbiote, transfert de gènes de résistance entre deux bactéries de genres différents, spontanément en absence de pression de sélection antibiotique

Transfert de résistances lors de traitements antibiotiques :

E. coli



Inoculation par voie orale de souches de *E. coli* multi-résistantes (= portage)

E. coli R1 Rif^R pMG252 (FOX, CHL, SUL, TMP, STR, KAN, TOB, GEN et NAL)

E. coli R2 Rif^R pMG298 (CTX, CHL, SUL, TMP, STR, KAN, TOB, GEN, TET et NAL)

Transfert de résistances lors de traitements antibiotiques : *E. coli*

- Analyse de la sensibilité des souches isolées d'organes internes (sacs aériens, foie, rate, péricarde)
 - 222 isolats sensibles à tous les antibiotiques (=Path-S3)
 - 1 isolat obtenu à J27 des **sacs aériens** d'un oiseau traité par triméthoprimé-sulfamide a **acquis un plasmide** codant pour les résistances à **FOX, CHL, SUL, TMP, STR, KAN, TOB, GEN et NAL (pMG252) = Path-S3-MDR**

-> Acquisition par la souche **Path-S3** présente dans les organes internes de plasmides présents dans des bactéries du tube digestif ou de l'environnement !

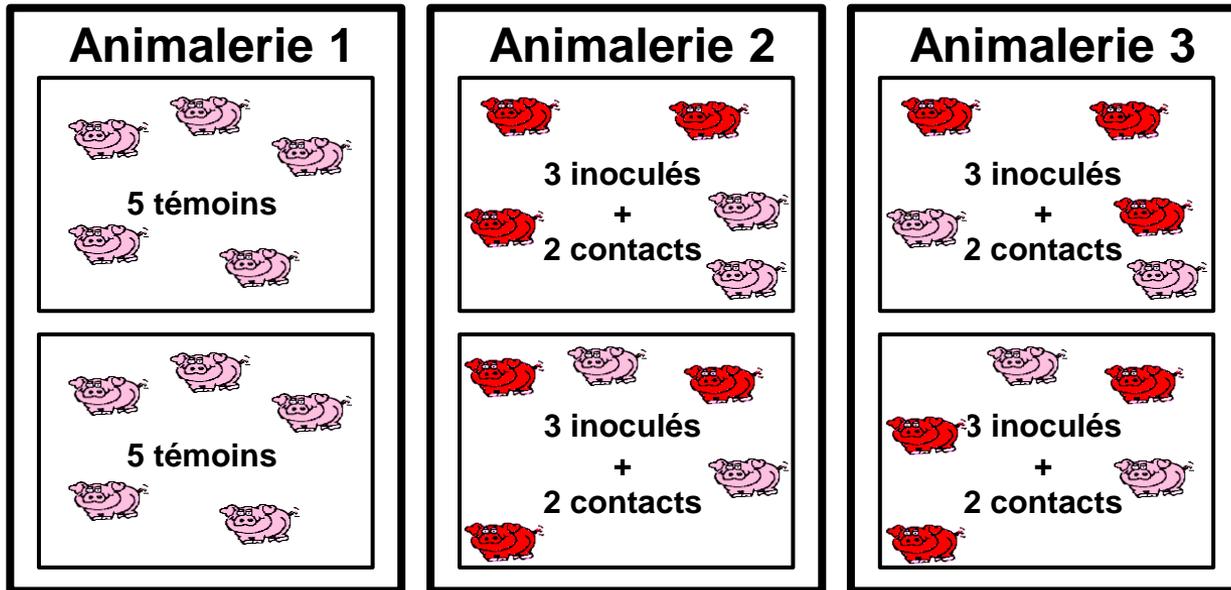
- **2 – Transmission horizontale de bactéries résistantes entre animaux**



Transmission entre animaux

Porcs inoculés ou non à T0 et T24h avec une souche *E. coli* résistante à rifampicine et cefotaxime

Mise en contact des contacts à J2

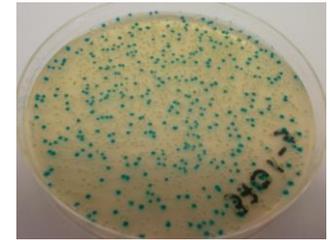
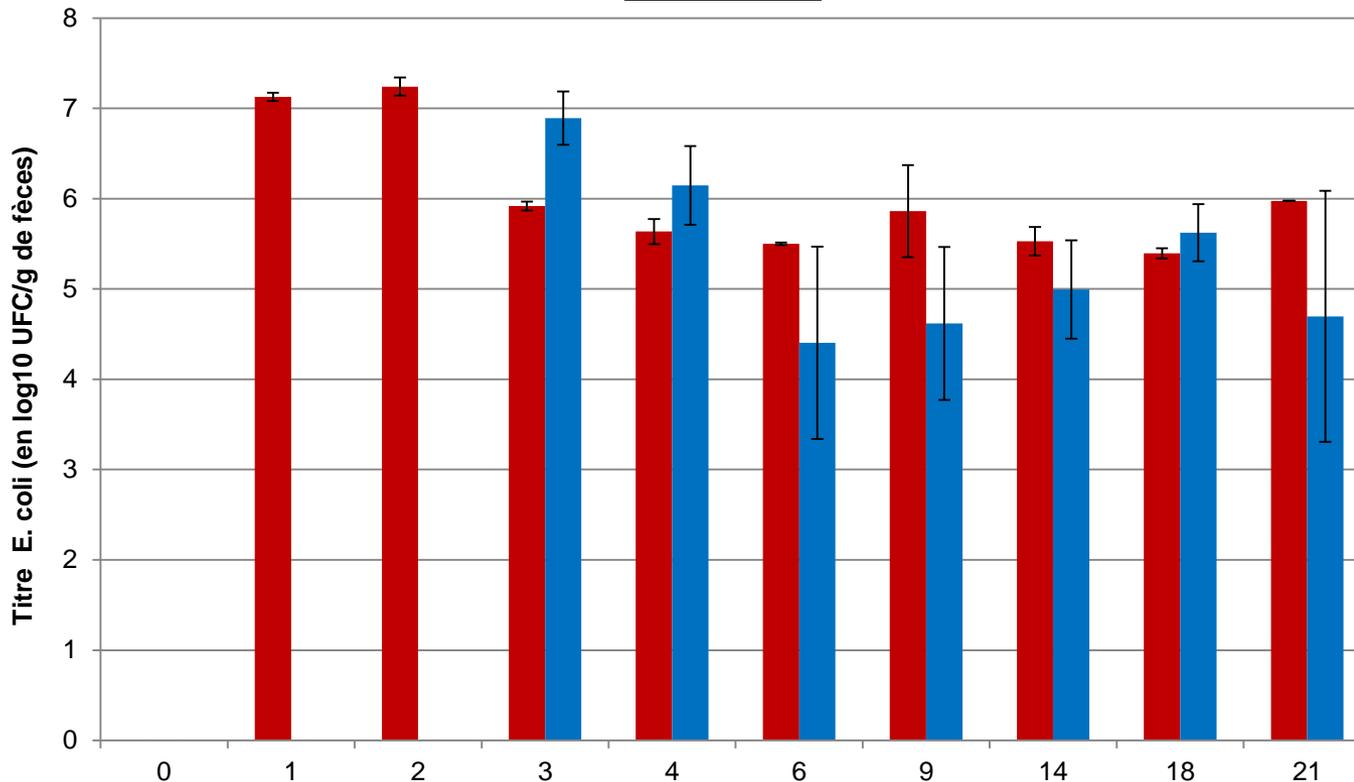


Prélèvements de matières fécales, dénombrement sur milieu avec rifampicine et cefotaxime



Transmission entre animaux

Titre *E. coli* sur milieu supplémenté en rifampicine et cefotaxime



■ Inoculés
■ Contacts

↑
↑
Inoculations



Mise en contact des porcs inoculés et naïfs

Tous les porcs contacts excrètent des *E. coli* résistants à la rifampicine et au CTX dès le lendemain de la mise en contact

Transmission entre animaux : une souche résistante diffuse t-elle moins qu'une souche sensible ?

- Comparaison de la diffusion chez le poulet d'une souche de *Campylobacter coli* sensible et de son mutant résistant aux macrolides

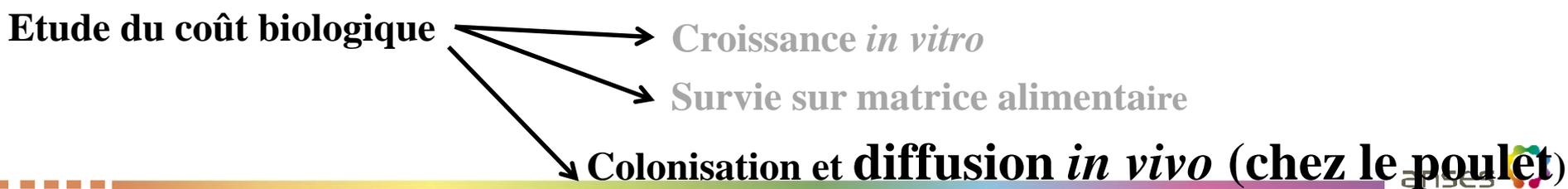
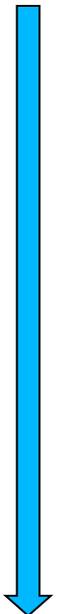
Transmission entre animaux : démarche expérimentale

Souche *C. coli* sensible

Sélection des mutants de *C. coli* résistants à l'érythromycine



Souches	<i>rrlA</i>	<i>rrlB</i>	<i>rrlC</i>	<i>rplD</i>	<i>rplV</i>	CMI (µg/ml)					
						ERY	TYL	AZM	CIP	AMP	TET
454 (Sensible)	-	-	-	-	-	8	32	32	0.5	8	>16
454R (Mutant R)	A2075G	A2075G	A2075G	-	-	>64	>1024	>512	0.5	8	>16



Transmission entre animaux : colonisation et diffusion de *C. coli* chez le poulet

Inoculation par la souche **S**



10 poulets inoculés
+
5 poulets NON
inoculés

* Poulets EOPS

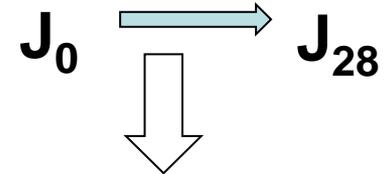
indemnes de *Campylobacter*

Inoculation par le Mutant **R**



10 poulets inoculés
+
5 poulets NON
inoculés

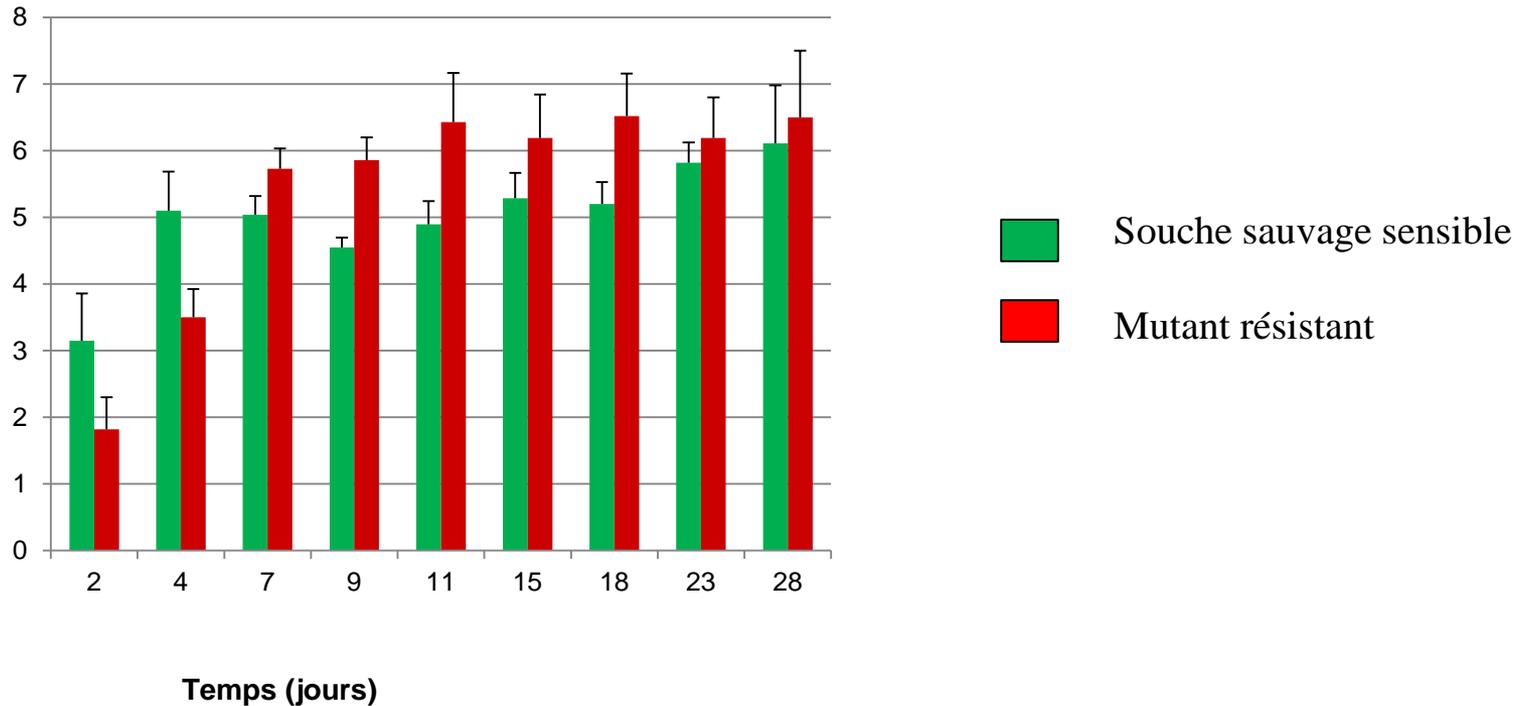
Prélèvements fécaux



Analyses des titres (S et R)

Transmission entre animaux : colonisation et diffusion de *C. coli* chez le poulet

Log₁₀ CFU/g

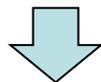


Aucune différence de colonisation n'a été observée entre la souche sensible et son mutant résistant

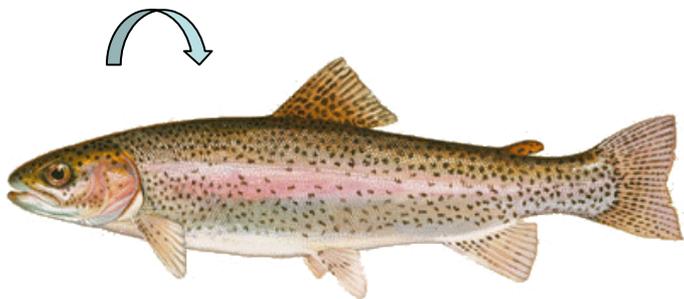
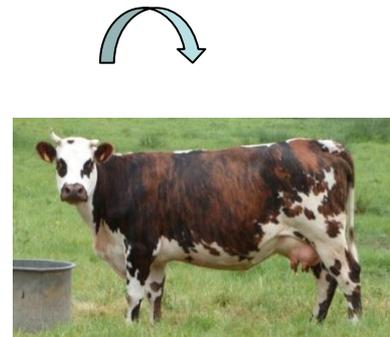
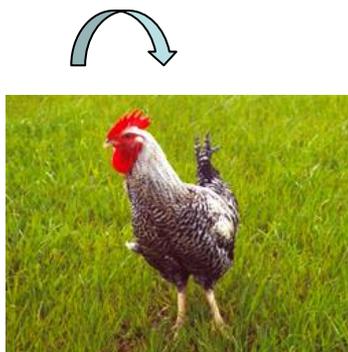
Transmission entre animaux : colonisation et diffusion de *C. coli* chez le poulet

Paramètres de diffusion β calculés sur la base d'un modèle mathématique SIS (Susceptible – Infectious – Susceptible)

<i>C. coli</i>	Sensible	$\beta : 2,4 (0,84 - 6,89)$
	Résistant	$\beta : 2,4 (0,86 - 6,98)$



Pour *C. coli* : Coefficients de diffusion identiques de la souche sensible et de son mutant résistant



= transmission horizontale

3- Transmission verticale entre générations

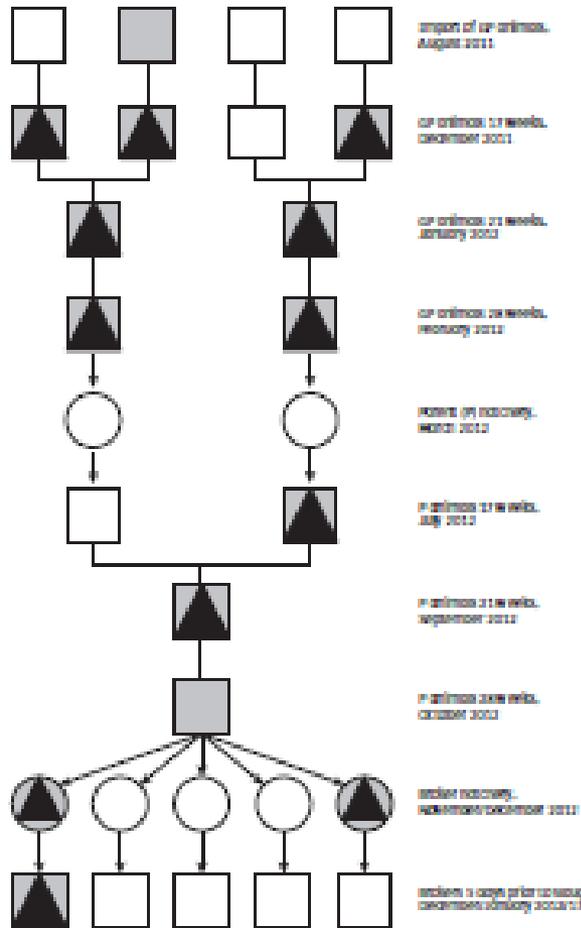
- **Mammifères**

- Callens et al, 2015, Belloc et al, 2005
- Le niveau de résistance de la flore du porcelet dépend du niveau de résistance de la truie et de l'usage des antibiotiques chez la truie

- **Oiseaux**

- Démonstration de *E. coli* pathogènes et résistants identiques entre reproducteurs et poussins (contaminations des coquilles, environnement du couvoir...)

Transmission verticale et à distance



Suède :
Importation des grands –parentaux
porteurs d'une souche de *E. coli*
résistant aux C3G

-  Litière, fond de boîte
-  Environnement couvoir
-   *E. coli* résistant aux C3G
-  Clone résistant (MLVA)

Figure 2. Evolution of the different sampling locations and dates for E. coli MLVA. All clones isolated (shaded) or not isolated (not shaded) and as before the evolution of the clones belonging to the clonal lineage MLVA C3. Black triangle is a clone resistant to C3G. Squares (filled or open) denote litter and boxes in different environments of samples of field sites. Note that the clonal lineage found in the field is only through the period. The legend can be found in the text for longer to understand it. E. coli MLVA C3. The clonal lineage preceding that followed by the legend.

4- Transmission inter-espèces

Animal → Homme par voie alimentaire

Salmonella

Campylobacter

Entérobactéries :

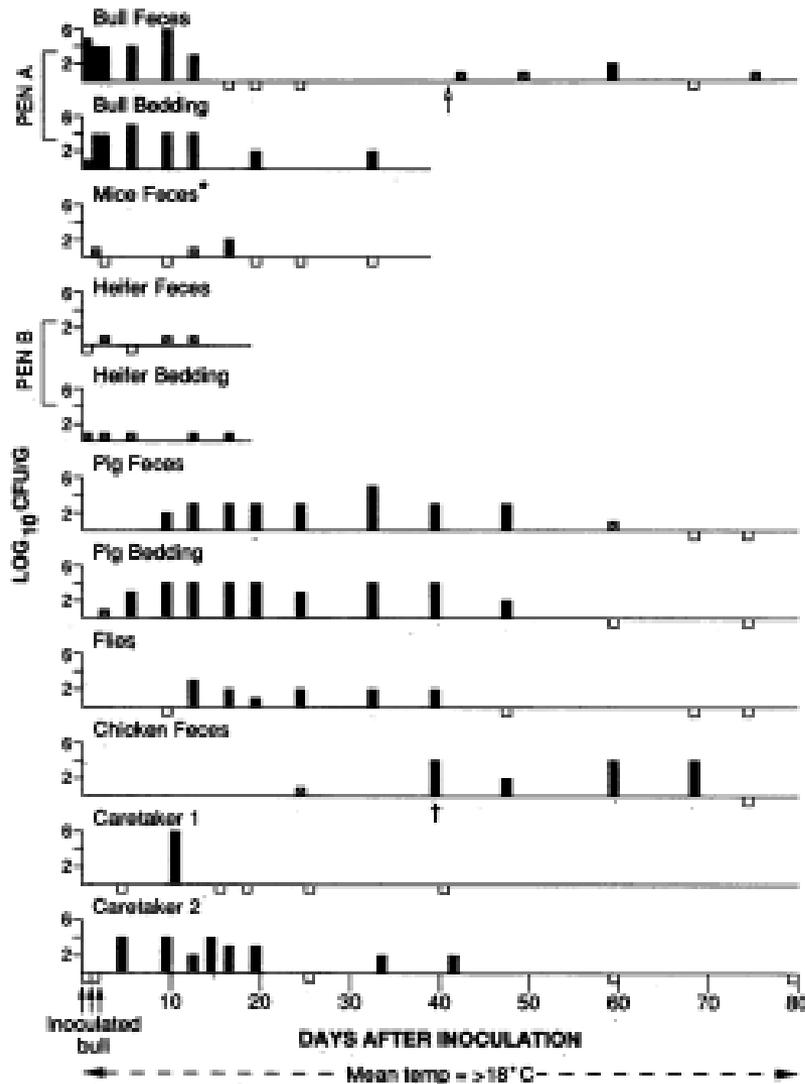
- Plasmides de résistance aux C3G similaires chez *E. coli* (poulets sains), *Salmonella* de viande de poulets) et cas de salmonellose humaine (*CloECKaert et al, 2010*)
- Transfert spontané d'un plasmide de résistance aux C3G d'un *E. coli* de volaille vers des *E. coli* humains en fermenteur (*Smet et al, 2010*)

4- Transmission inter-espèces animales et vers l'environnement

Inoculation d'un taureau avec une souche *E. coli* résistante d'origine bovine

Ré-isolément à partir

- du taureau, de la génisse
- des litières
- de souris en cage (sans contact direct)
- De porcs (bâtiment adjacent)
- De poulets en cage
- De coqs en liberté
- Des mouches
- Des soigneurs...

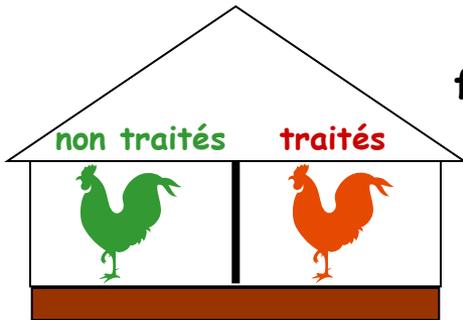


Marshall et al, PNAS 1990

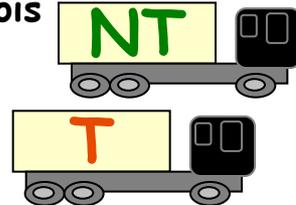
Transfert vers l'environnement

(Pourcher et al, STO 2014)

ANSES Ploufragan



fientes + copeaux de bois



CA. Kerguéhennec



épandage 8 T /ha

6 parcelles:

3 avec fumier T

3 avec fumier NT



1 échantillon =
5 carottes de 100g

J-36

J-13 à -8

J-1

J0

7

13

20

27

34

44

56

97 jours



à 24 jours :
enrofloxacin
10 mg/kg pdt 5 j



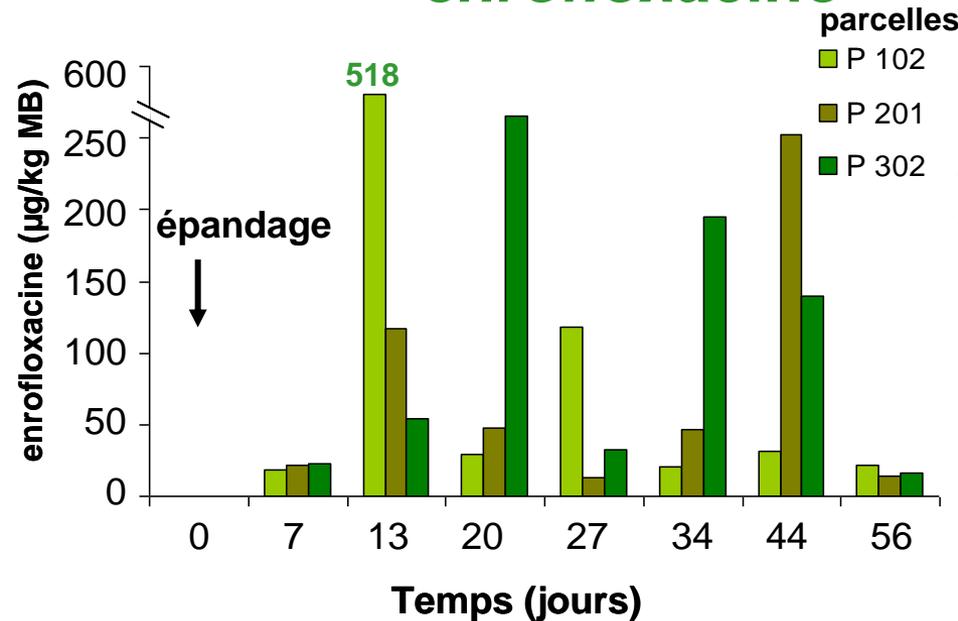
Mesure de la concentration en fluoroquinolones :
enrofloxacin et son métabolite la ciprofloxacine

Dénombrement des Entérobactéries résistantes à la
ciprofloxacine

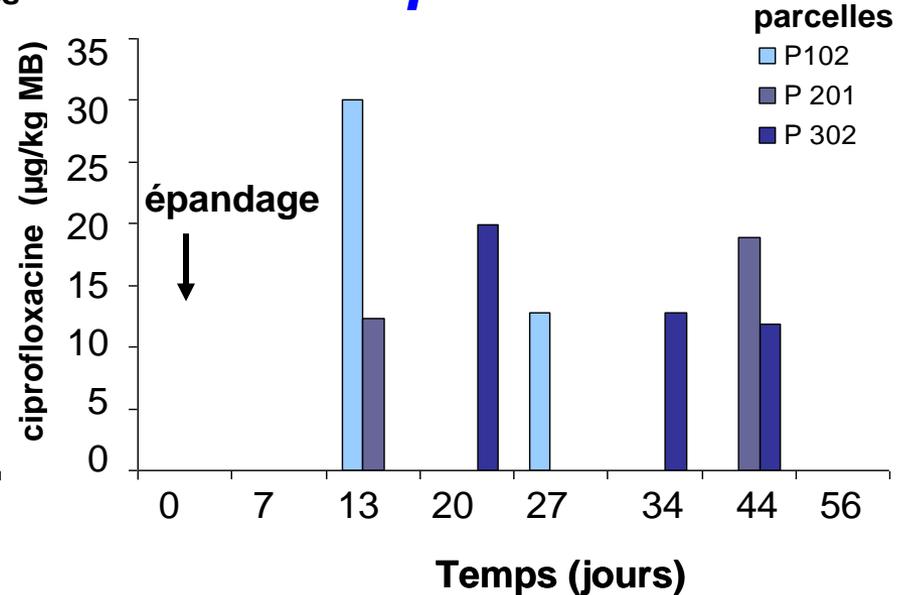
Transfert vers l'environnement

(Pourcher et al, STO 2014)

enrofloxacin

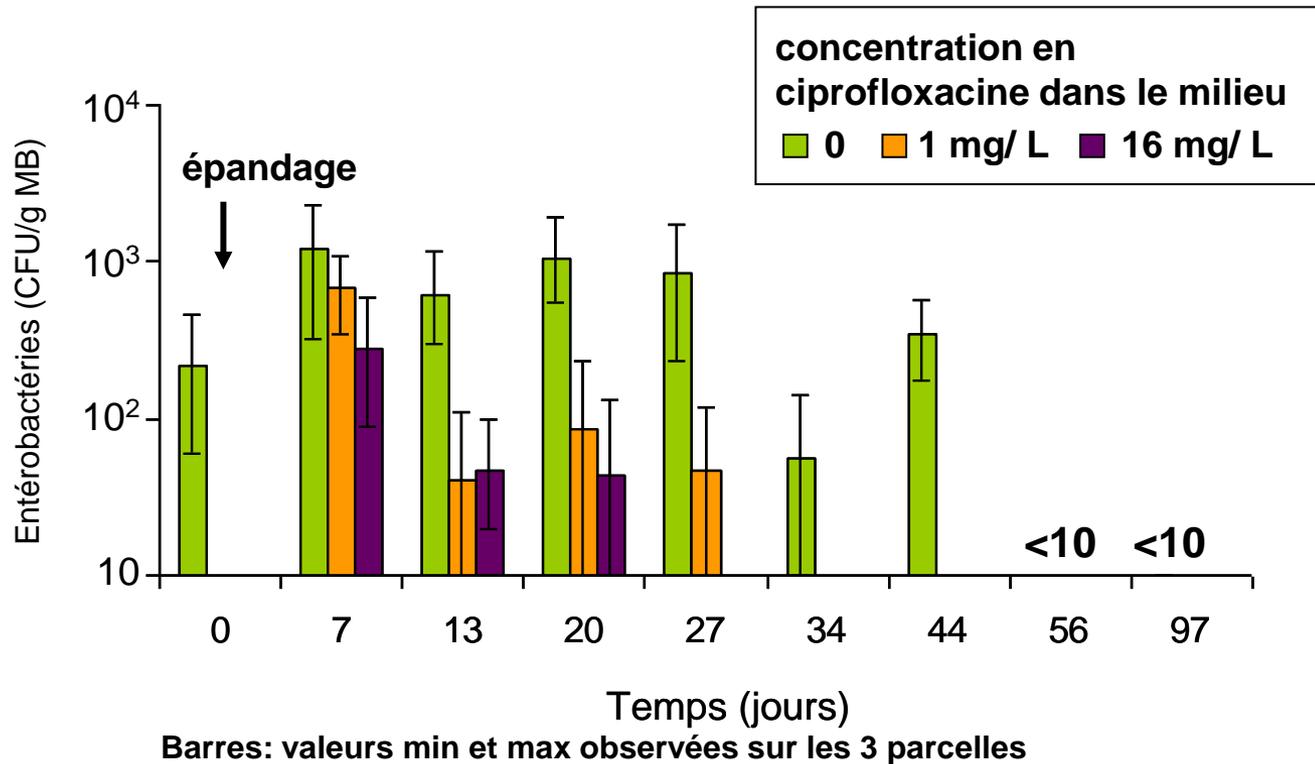


ciprofloxacin



- fortes variations des teneurs en FQ ⇒ hétérogénéité du sol et du fumier
- enrofloxacin : quantifiable pdt 2 mois à des teneurs de l'ordre de 250 µg /Kg
⇒ persistance de l'antibiotique dans les sols

Transfert vers l'environnement (Pourcher et al, STO 2014)



➤ Des Entérobactéries résistantes sont observées sur le sol pendant un mois

Conclusion

- Transmission de gènes, de plasmides... entre bactéries
- Transmission entre animaux d'espèce différentes, de générations différentes et vers l'environnement
- Transmission par la chaîne alimentaire, par contact direct ou indirect, par l'environnement (sols, eaux...)
- Importance du microbiote

- = Phénomène multi-échelle, peu de frontières d'espèces, pas de frontières géographiques

Biosécurité +++

Solutions innovantes pour contrecarrer cette transmission !

• Merci aux collaborateurs

- **Anses** : M. Amelot, M. Andraud, L. Avrain, S. Baron, A. Boudier, S. Bougeard, A. Dheilley, E. Jouy, M. Fleury, L. Le Devendec, G. Mourand, S. Zeitouni
- **Irstea** : P. Dabert, AM Pourcher
- **CRAB** : P. Cotinet
- **Université d'Angers** : A. Jadas-Hécart



écoantibio2017

Réduire l'utilisation des antibiotiques vétérinaires :
diminuer, c'est possible