

Suivi des communautés bactériennes résistantes aux antibiotiques dans des eaux urbaines à proximité du centre hospitalier de Montpellier

A. Almakki¹, E. Jumas-Bilak^{1,2}, P. Licznar-Fajardo¹

¹Equipe PHYSE (Pathogènes Hydriques Santé Environnements), UMR 5569 HydroSciences Montpellier, Université de Montpellier ; ²Département d'hygiène hospitalière, CHRU de Montpellier, Montpellier, France

Introduction et objectifs

Les pressions anthropiques exercées sur les écosystèmes aquatiques en modifiant le fonctionnement et impactent sur la dynamique des micro-organismes qui les composent. Ces écosystèmes deviennent alors des lieux d'évolution rapide des communautés microbiennes pouvant permettre l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques. La lutte contre l'émergence et la dissémination des résistances aux antibiotiques passe par une meilleure connaissance des réservoirs de communautés microbiennes résistantes, notamment des écosystèmes proches de l'homme. Les effluents d'eaux usées des hôpitaux, sources de micro-organismes pathogènes et résistants, sont traités. Toutefois, la contamination des zones aquatiques naturelles par les eaux de ruissellement à proximité des hôpitaux est peu étudiée.

L'objectif de cette étude est d'évaluer le niveau de résistance des communautés bactériennes cultivables et leur biodiversité et de suivre ces paramètres au cours du temps. Nous nous focaliserons particulièrement sur les bactéries pathogènes et multirésistantes, dans deux cours d'eau prenant leur source dans l'agglomération de Montpellier et traversant des zones urbanisées similaires : le Font d'Aurelle qui est canalisé sous l'hôpital, et le Verdanson qui coule à distance de l'hôpital.

Méthodes

Des échantillons d'eau sont prélevés tous les mois, en amont et en aval du centre hospitalier Lapeyronie de Montpellier sur le Font d'Aurelle :

- Site Font d'Aurelle avant l'hôpital Lapeyronie (FAVL)
- Site Font d'Aurelle après l'hôpital Lapeyronie (FAPL)

et sur le Verdanson :

- Site Verdanson amont (VAVL)
- Site Verdanson aval (VAPL)



Pour chaque échantillon d'eau :

1) Utilisation du kit Colilert® (Idexx) pour déterminer le niveau de **contamination d'origine fécale**



Puits jaunes = présence de coliformes



Puits fluorescents = présence de E. coli

2) Mise en culture sur milieu TSA + antibiotique pour déterminer le **niveau de tolérance des communautés cultivables vis-à-vis de différents antibiotiques**

TSA supplémenté avec chacun des antibiotiques testés : céfotaxime, ceftazidime, tétracycline, amoxicilline et ofloxacine
3 concentrations testées

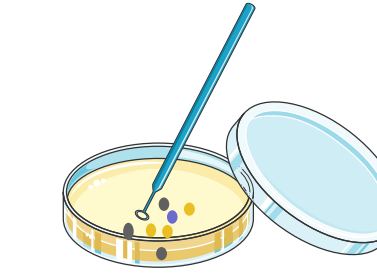


Incubation 72 h à 22°C

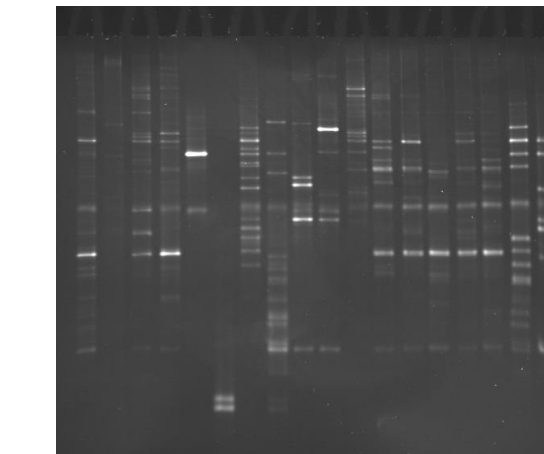


- Dénombrement des colonies
- Rapport nombre d'UFC (Unités Formant Colonies) sur milieu avec ATB / nombre d'UFC sur milieu sans ATB, calcul du pourcentage de tolérance par rapport à la communauté totale

3) Analyse du gène de l'ARNr 16S par PCR- TTGE (*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*) pour **décrire la microbiote cultivable total et tolérant** en fonction de l'antibiotique testé et de la concentration utilisée



- Prélèvement des communautés bactériennes
- Extraction d'ADN
- PCR ARNr16S (région V3) et migration TTGE

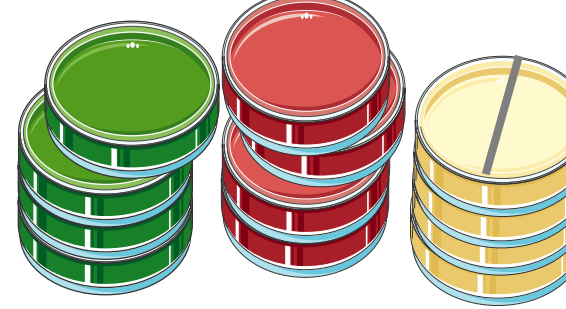


- Découpage des bandes
- Séquençage des amplicons pour identification des OTUs (*Operational Taxonomic Unit*)

Caractérisation des communautés bactériennes totales et tolérantes

4) Utilisation des milieux sélectifs spécifiquement utilisés à l'hôpital pour rechercher le portage de **bactéries multi-résistantes et pour rechercher les entérobactéries productrices de carbapénémases**

Milieu Drigalski + Ceftazidime (4 mg/l)
Milieu MacConkey + Cefotaxime (4 mg/l)
Milieu chromogène CARBA SMART® (biomerieux)



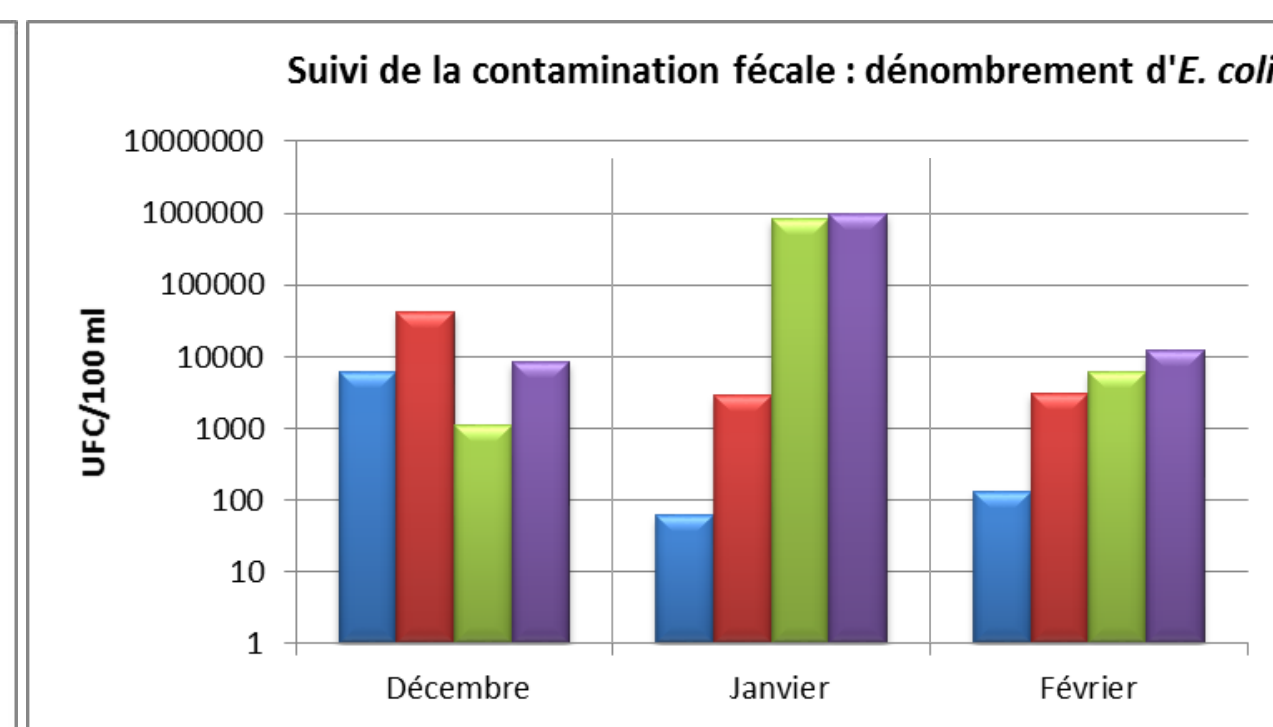
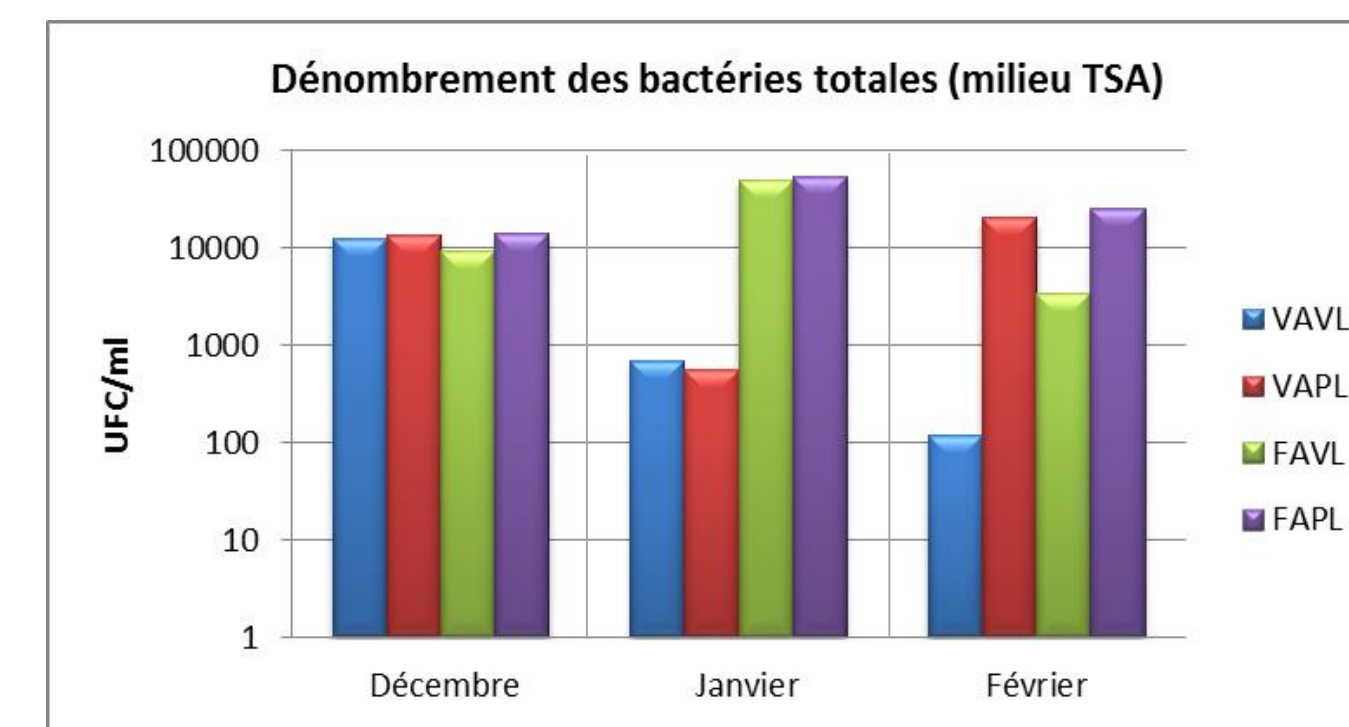
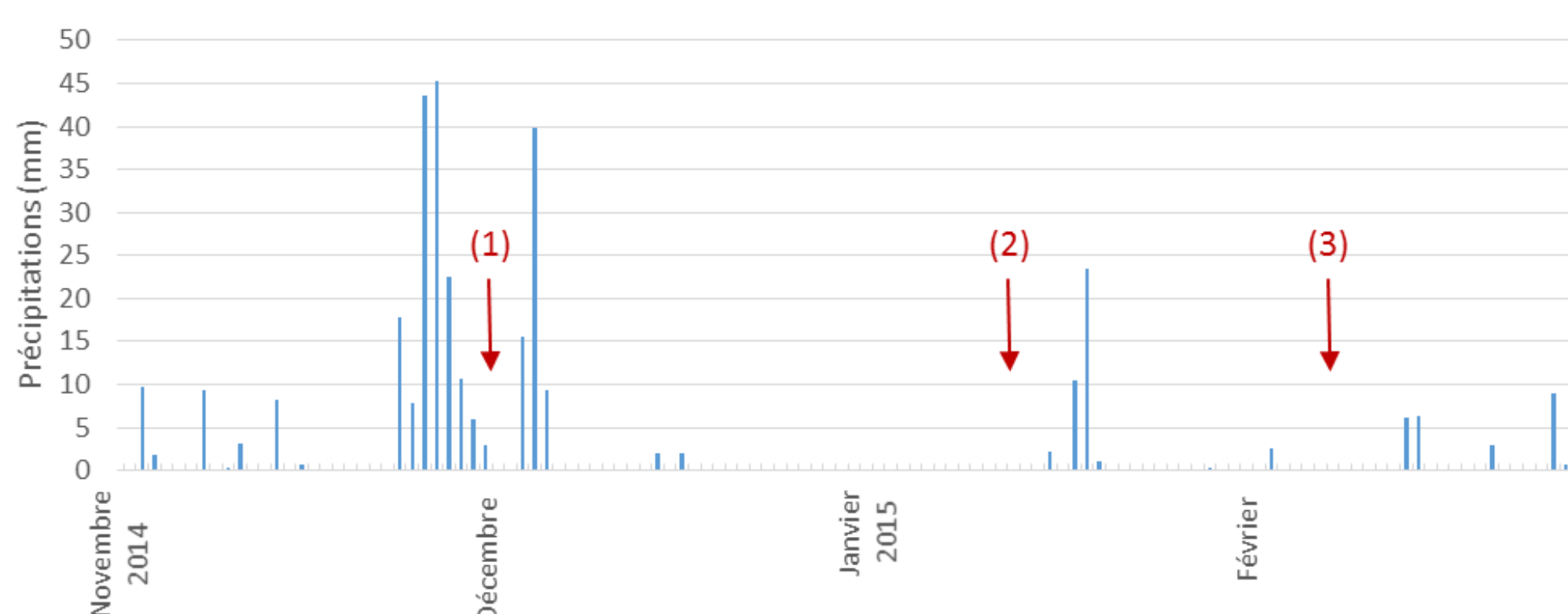
Incubation 24h à 37 °C

Sélection de morphotypes, identification par Maldi-TOF ou séquençage 16S, antibiogramme, ...



Résultats des 3 premières campagnes de prélèvements

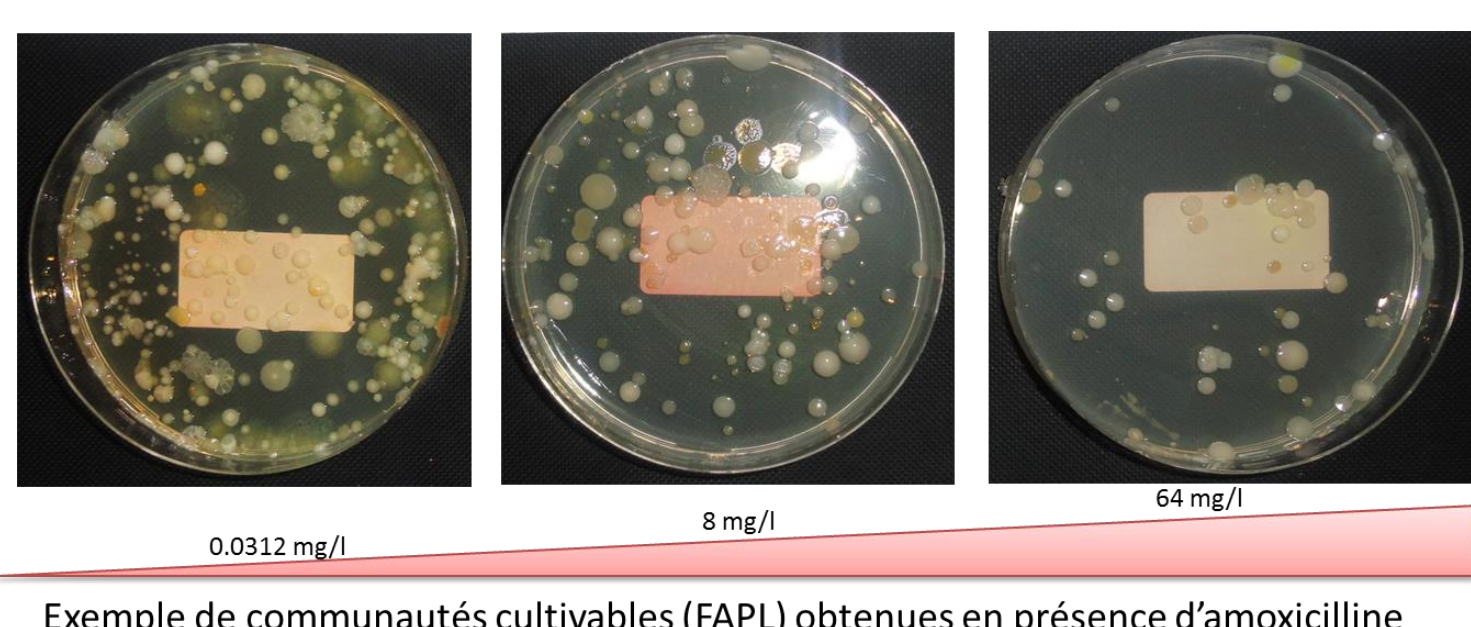
Pluviométrie et dates d'échantillonnages



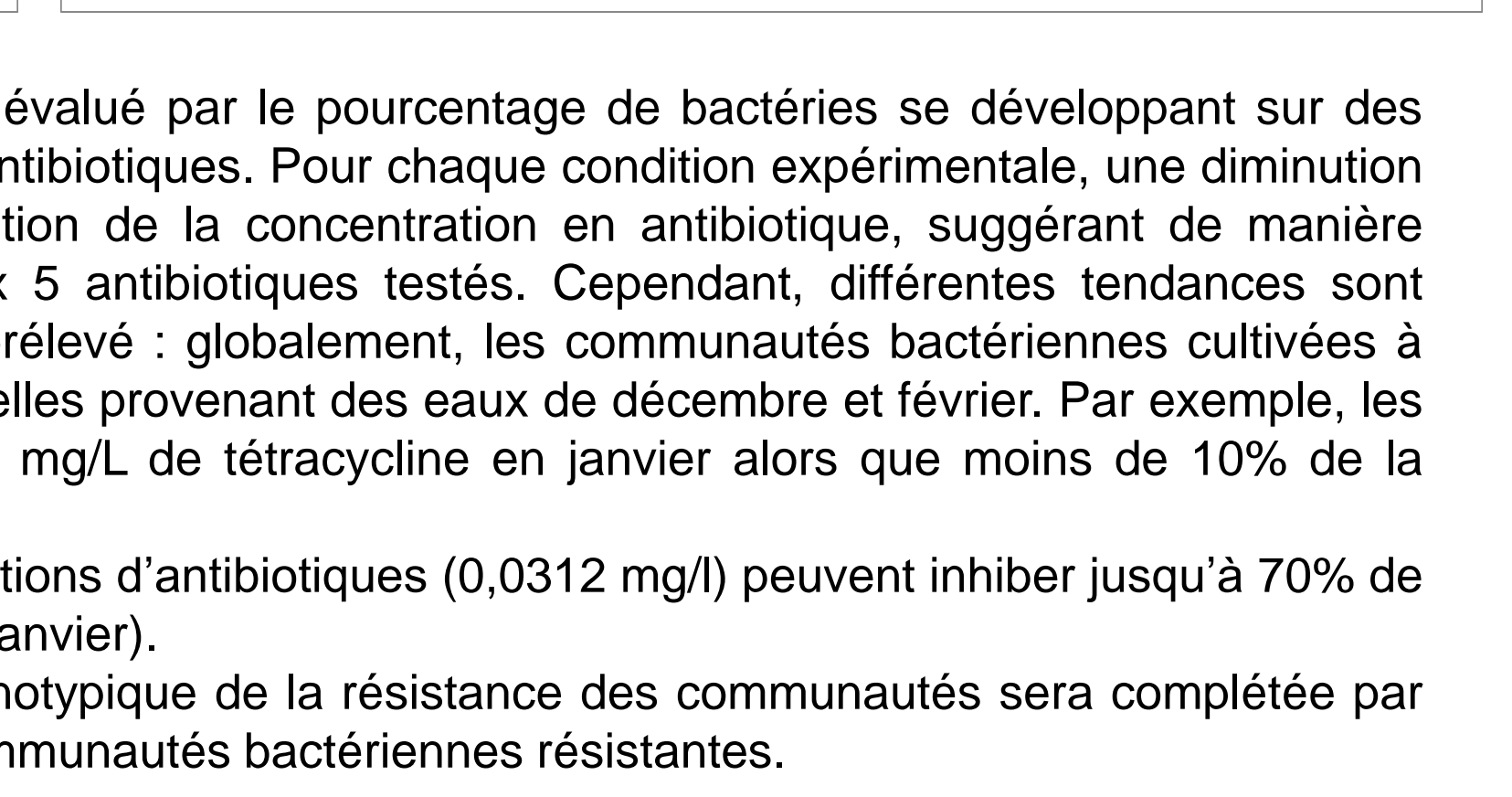
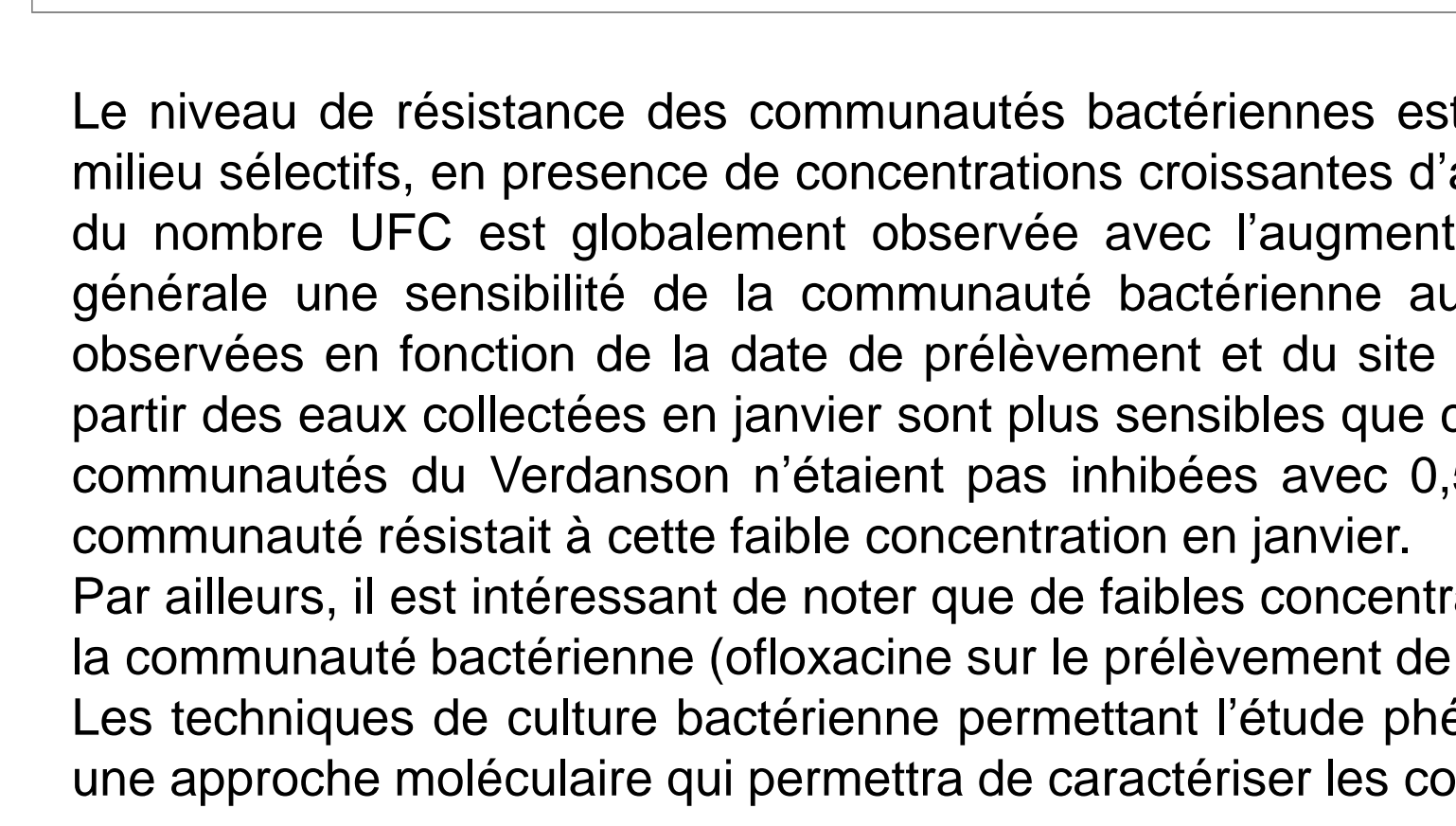
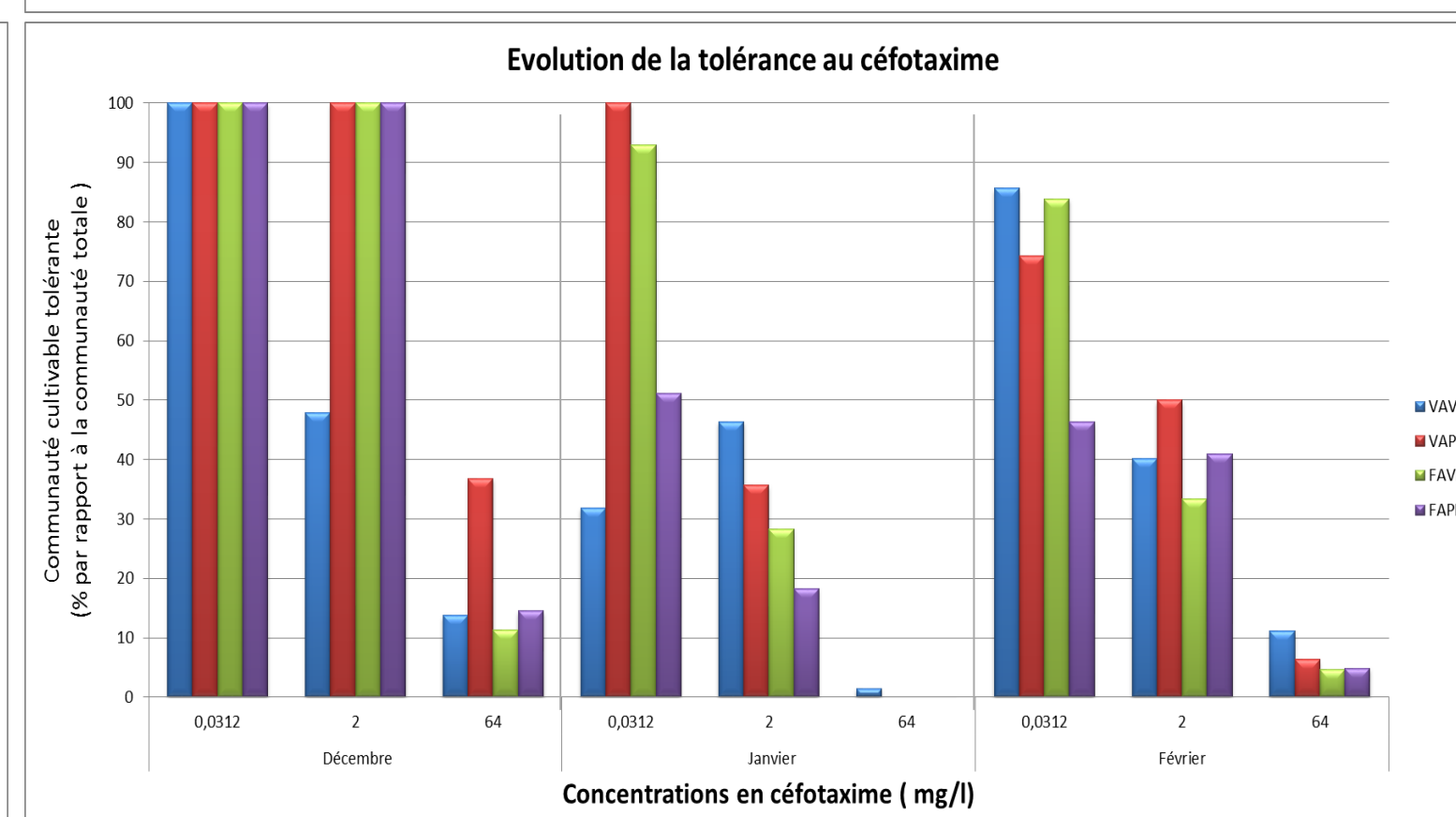
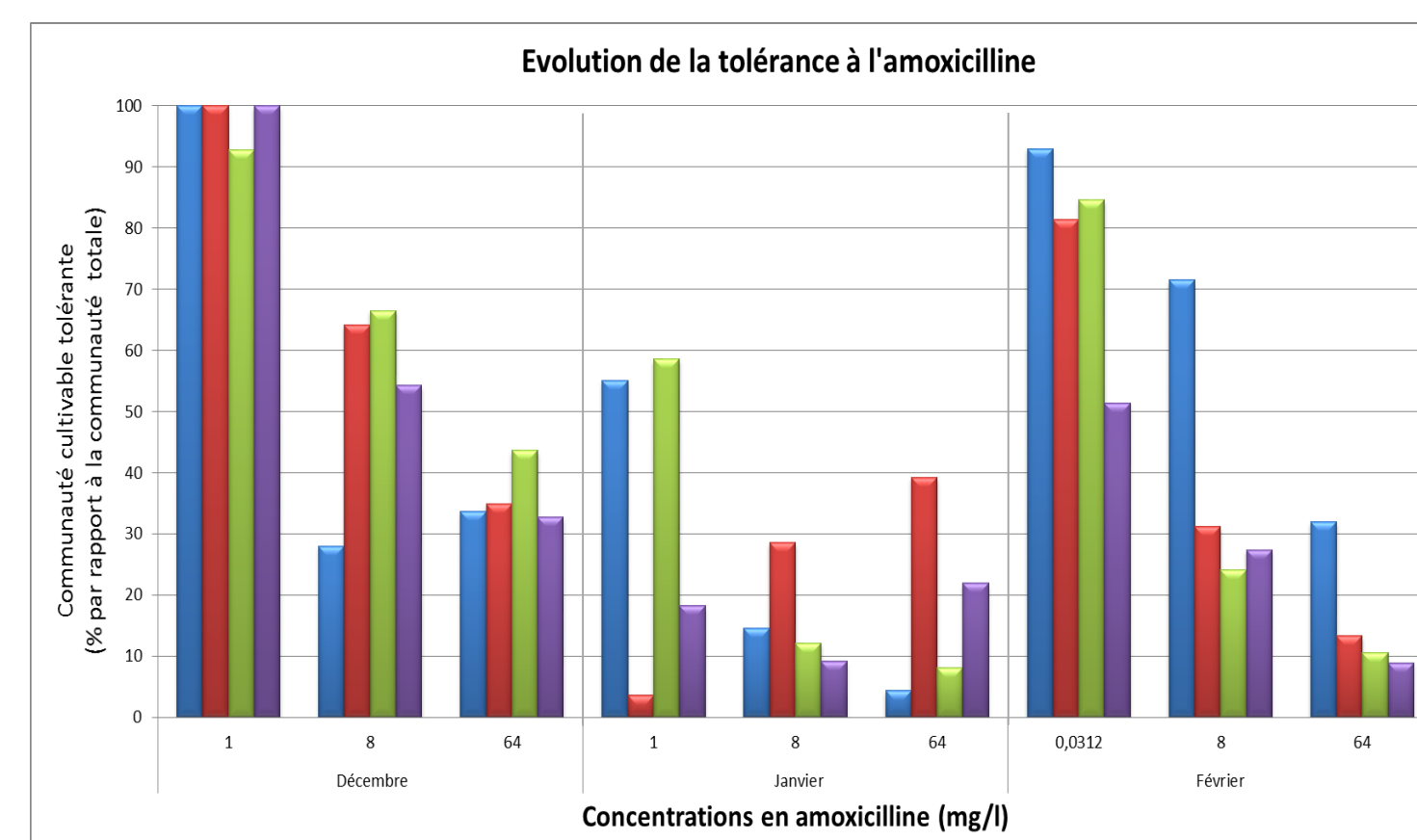
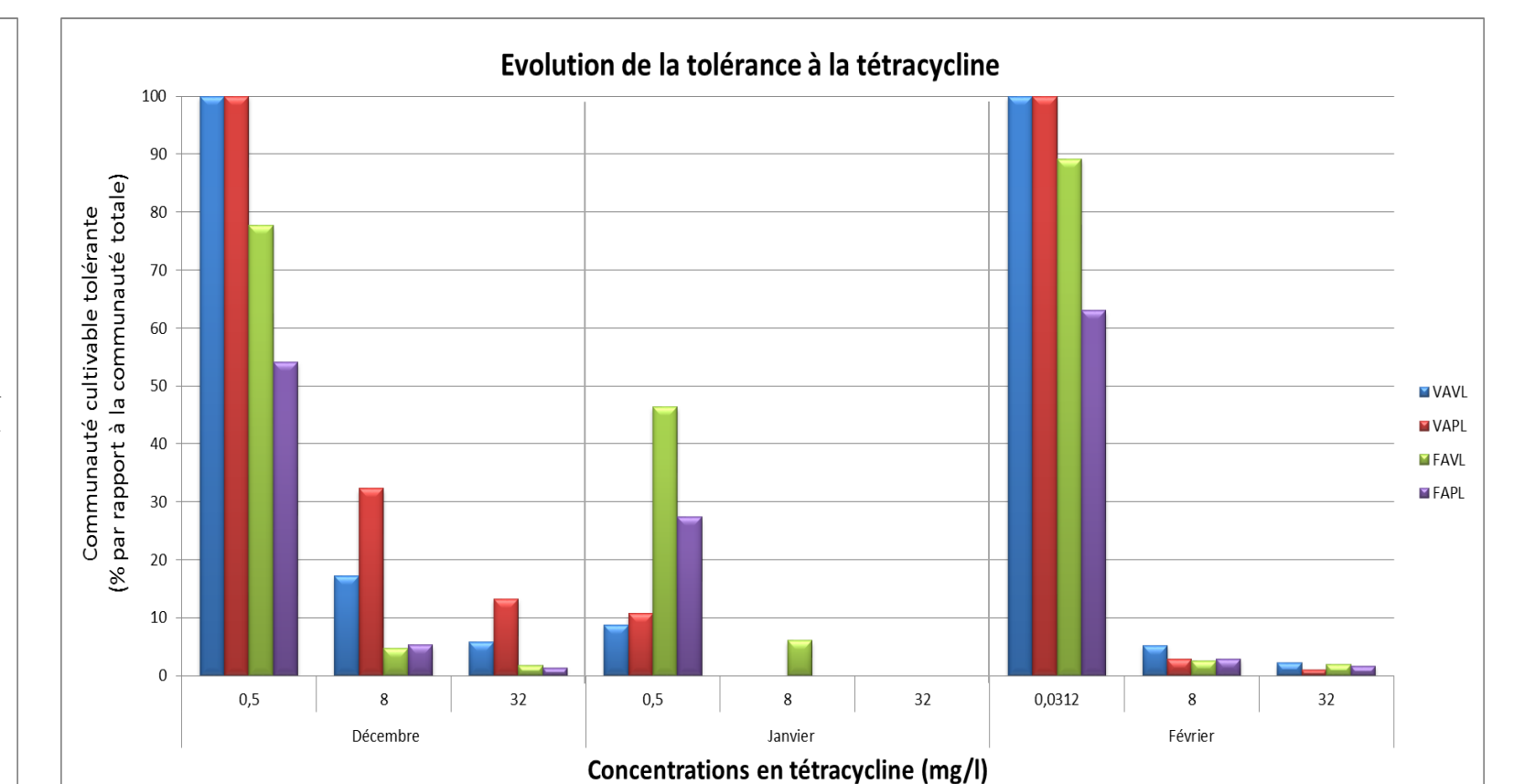
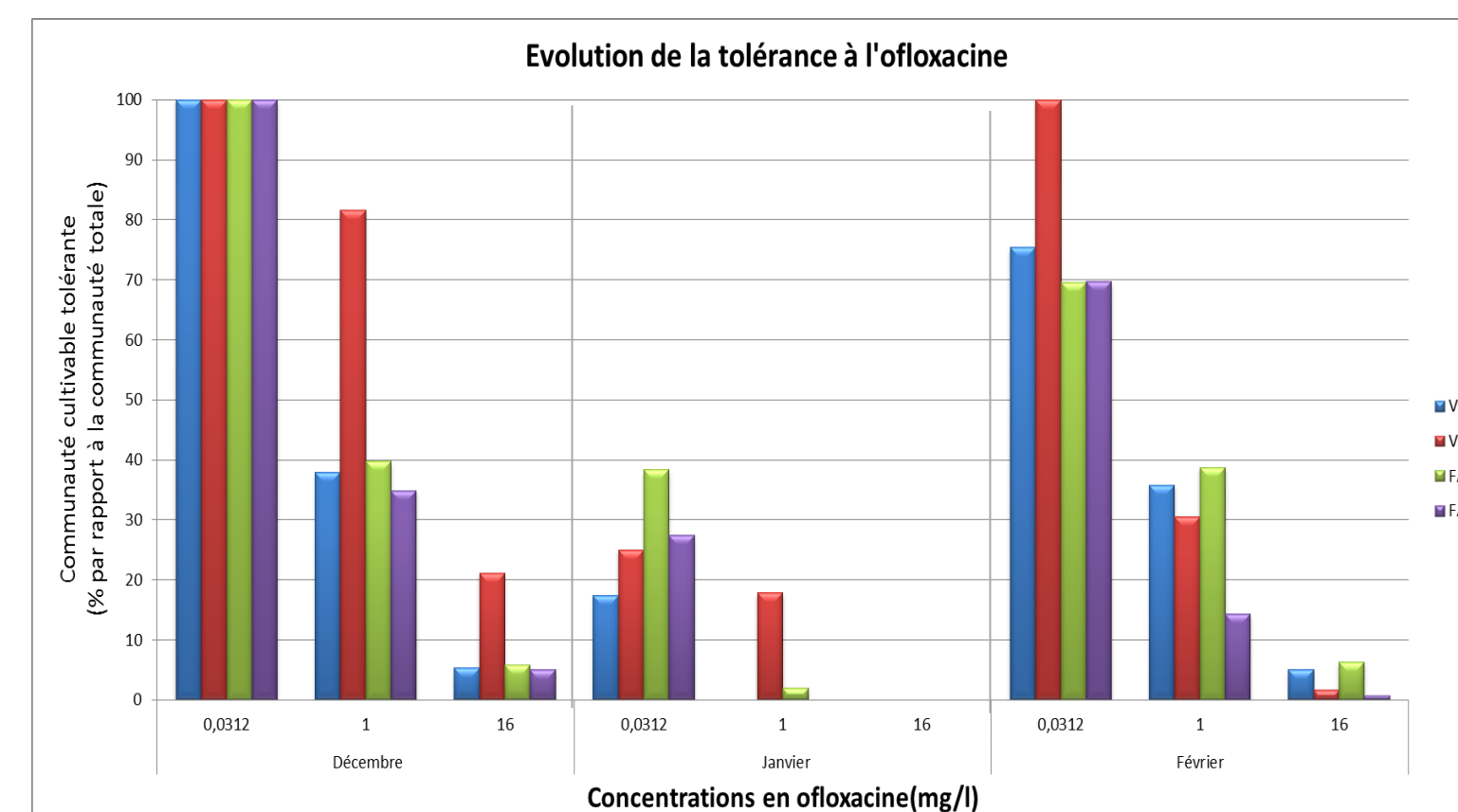
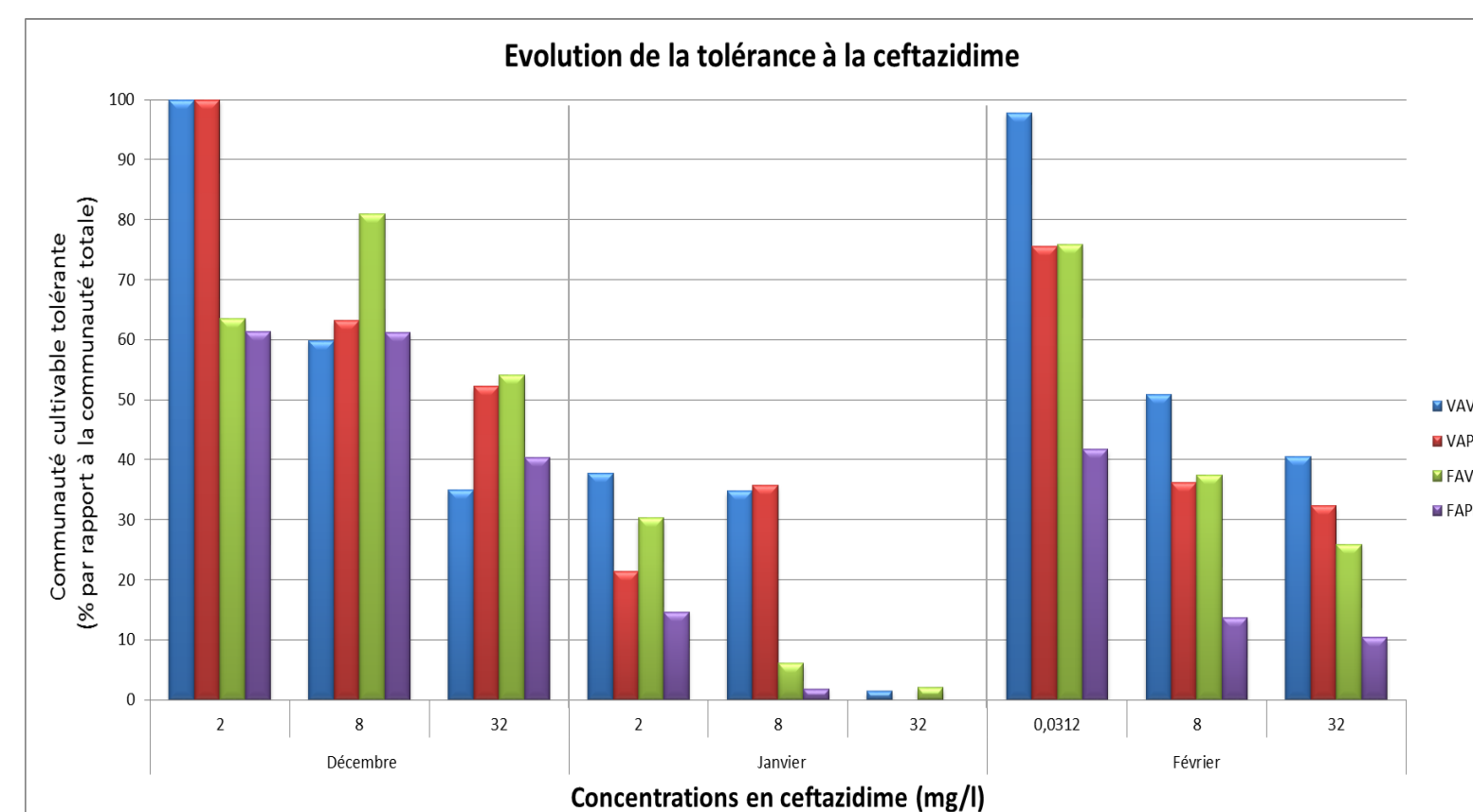
Les campagnes de prélèvements à un rythme mensuel permettront un suivi dynamique de la charge bactérienne totale des eaux circulant dans l'environnement péri-hospitalier. Le dénombrement de la bactérie *E. coli* donne des indications sur la qualité sanitaire des eaux.

Pour les 3 campagnes réalisées, nous observons des variations, **à la fois dans le temps et selon les sites avec une contamination fécale généralement plus élevée au point de prélèvement amont (AVL), comparativement au point aval (AVL).**

Ces données devront être confirmées et seront mises en relation avec des données hydroclimatiques et hydrologiques (Température de l'eau, débit,...).



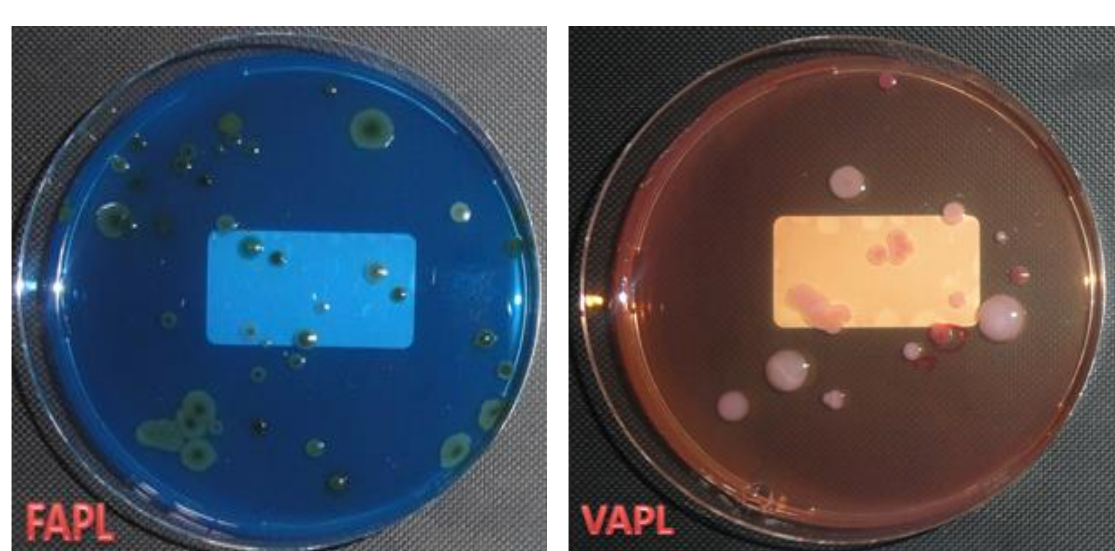
Exemple de communautés cultivables (FAPL) obtenues en présence d'amoxicilline



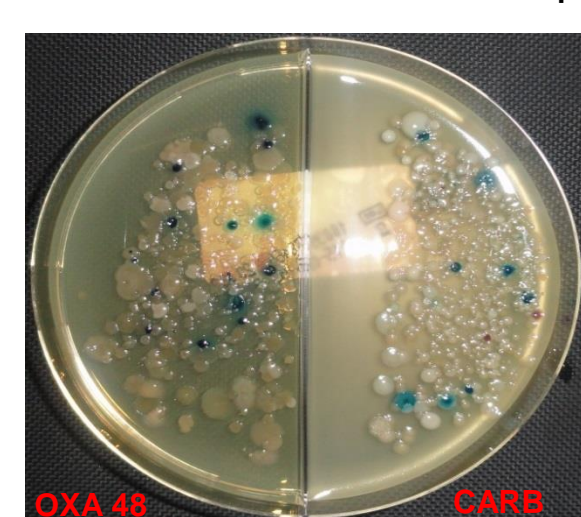
Le niveau de résistance des communautés bactériennes est évalué par le pourcentage de bactéries se développant sur des milieux sélectifs, en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques. Pour chaque condition expérimentale, une diminution du nombre UFC est globalement observée avec l'augmentation de la concentration en antibiotique, suggérant de manière générale une sensibilité de la communauté bactérienne aux 5 antibiotiques testés. Cependant, différentes tendances sont observées en fonction de la date de prélèvement et du site prélevé : globalement, les communautés bactériennes cultivées à partir des eaux collectées en janvier sont plus sensibles que celles provenant des eaux de décembre et février. Par exemple, les communautés du Verdanson n'étaient pas inhibées avec 0,5 mg/L de tétracycline en janvier alors que moins de 10% de la communauté résistait à cette faible concentration en janvier.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que de faibles concentrations d'antibiotiques (0,0312 mg/l) peuvent inhiber jusqu'à 70% de la communauté bactérienne (ofloxacine sur le prélèvement de janvier). Les techniques de culture bactérienne permettant l'étude phénotypique de la résistance des communautés sera complétée par une approche moléculaire qui permettra de caractériser les communautés bactériennes résistantes.

Exemple de communautés bactériennes cultivables sélectionnées sur milieux sélectifs : Drigalski-CAZ (4 mg/l) et MacConkey-CTX (4 mg/l)

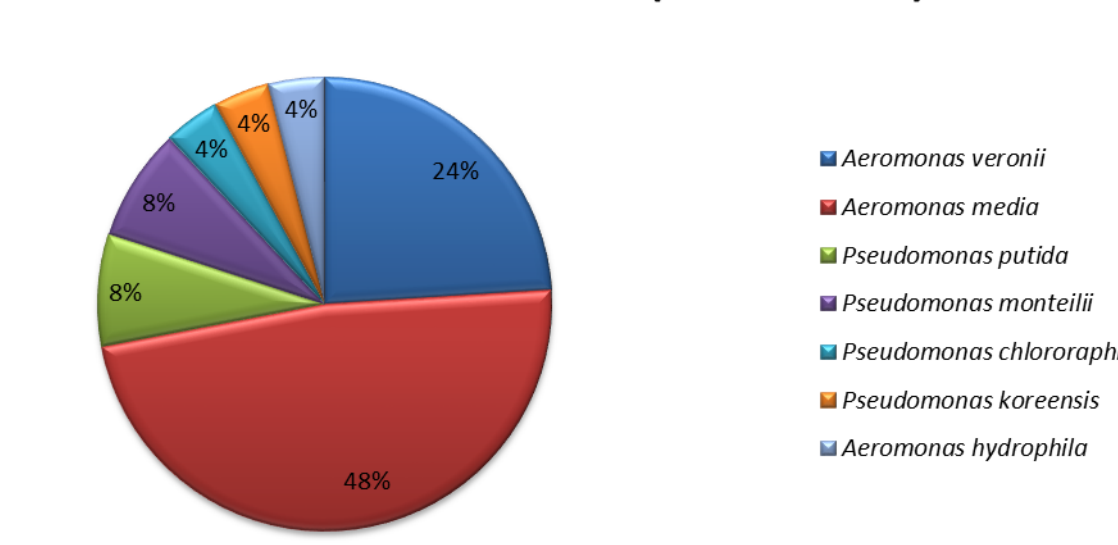


Exemple de communauté sélectionnée sur milieu chromogène CARBA SMART, utilisé pour le dépistage des entérobactéries productrices de carbapénémases (de type OXA-48 ou KPC et metallo-carbapénémase)

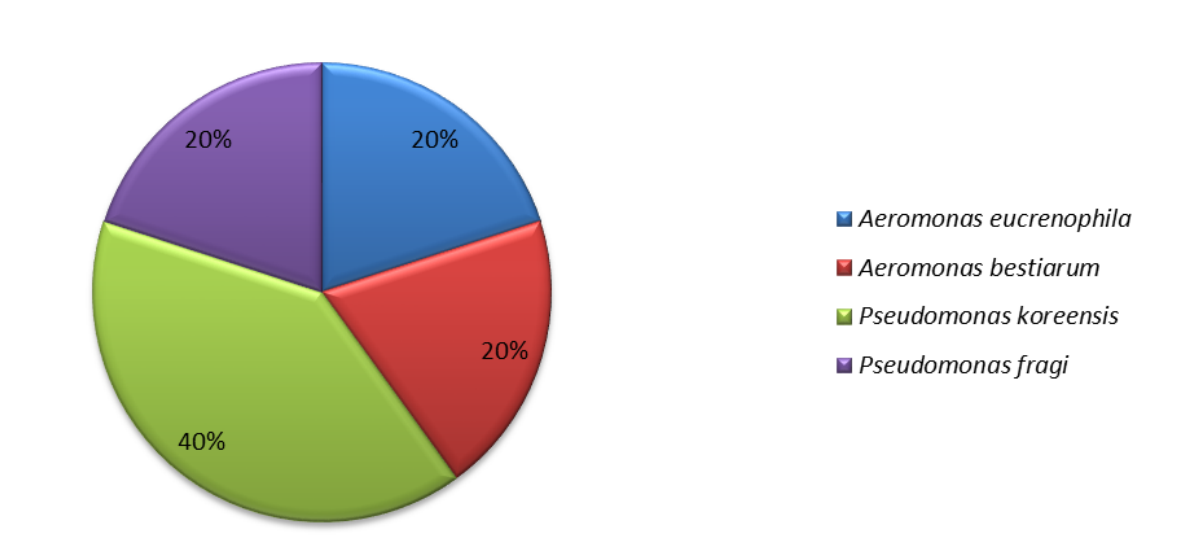


Les morphotypes isolés sur les milieux sélectifs utilisés en clinique pour rechercher les bactéries multirésistantes seront identifiés. Par exemple, la majorité des isolats identifiés à partir du milieu CARBA SMART (sites FAPL et FAVL, février) sont *Aeromonas* sp. et *Pseudomonas* sp. L'identification des autres morphotypes sera poursuivie et certaines espèces, connues en pathologie humaine seront plus particulièrement caractérisées (Antibiogrammes, recherche de gènes de résistance ou d'éléments génétiques mobiles,...)

Espèces identifiées (n = 25) sur milieu OXA48
Prélèvement FAPL de février (n total > 200)

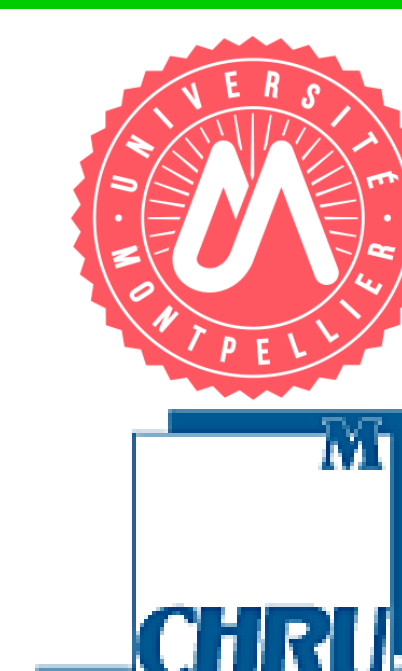


Espèces identifiées (n = 5) sur milieu CARB
Prélèvement FAVL de février (n total = 156)



Conclusions

Ces premiers résultats montrent une forte présence de coliformes et de bactéries multirésistantes dans les cours d'eau urbains. L'impact des antibiotiques sur les communautés cultivables, variable selon les sites, montre que notre approche est discriminante pour l'étude des communautés résistantes dans l'environnement. Les campagnes poursuivies durant une année sont complétées par une caractérisation de l'eau : débit, pH, température, matières en suspension,... et les résultats seront confrontés aux données d'épidémiologie de la résistance en médecine humaine et vétérinaire pour mieux préciser le risque sanitaire associé au pathobiome et au résistome environnemental urbain.



UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

HSM
HydroSciences Montpellier

ohm
Observatoires Hommes-Milieux